



# Mecanismes moleculars implicats en la secreció de peptíds en cèl·lules glials del sistema nerviós central

Sonia Paco Mercader

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

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

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



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA

Departament de Biologia Cel·lular

**MECANISMES MOLECULARS IMPLICATS EN LA SECRECIÓ DE PÈPTIDS EN CÈL·LULES  
GLIALS DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL**

Tesi presentada per  
**Sonia Paco Mercader**

Per optar al grau de  
**DOCTORA**

Director: Dr. Fernando Aguado Tomás

Programa de doctorat de Biologia Cel·lular i Molecular  
Bienni: 2005-2007

Vist-i-plau del director,

La interessada,

Dr. Fernando Aguado Tomás

Sonia Paco Mercader

Barcelona,  
Novembre 2011



**CONTINGUTS**

---



## Índex

---

Índex de figures.....	vi
Índex de taules .....	vii
Abreviatures.....	viii

---

INTRODUCCIÓ .....	1
1. Composició cel·lular del SNC.....	3
1.1. Neurones .....	3
1.2. Cèl·lules glials.....	3
1.2.1. Oligodendròcits .....	3
1.2.2. Astròcits .....	5
1.2.3. Micròglia .....	5
1.2.4. Cèl·lules endimàries.....	6
1.2.5. Cèl·lules NG2 .....	6
2. Desenvolupament dels astròcits.....	7
2.1. De la neurogènesi a la gliogènesi.....	9
2.2. Diversitat astrogènica.....	10
2.2.1. Heterogeneïtat regional .....	11
2.2.2. Heterogeneïtat fenotípica .....	12
3. Funcions dels astròcits.....	14
3.1. Desenvolupament.....	15
3.1.1. Els astròcits com a elements stem.....	15
3.1.2. Guia axonal .....	15
3.1.3. Regulació de la sinaptogènesi.....	15
3.2. Funció estructural.....	16
3.2.1. Formació de la barrera hematoencefàlica.....	17
3.3. Funció metabòlica.....	17

3.3.1.	Regulació de la micro circulació cerebral .....	17
3.3.2.	Suport metabòlic a les neurones .....	18
3.4.	Funció homeostàtica .....	19
3.4.1.	Homeòstasi d'ions .....	19
3.4.2.	Homeòstasi de l'aigua .....	19
3.4.3.	Homeòstasi del pH.....	19
3.4.4.	Homeòstasi de neurotransmissors .....	19
3.4.5.	Funció antioxidant .....	20
3.5.	Funció de senyalització.....	20
3.5.1.	Senyalització dins del sincici astrocitari: fisiologia astrocitària .....	21
3.5.2.	Alliberació de neurotransmissors.....	23
3.5.3.	Modulació de la transmissió i la plasticitat sinàptica.....	23
3.6.	Resposta glial al dany .....	23
3.6.1.	Canvis morfològics i d'expressió de l'astrocitosi .....	24
3.6.2.	Factors d'activació i vies implicades.....	25
4.	Secreció.....	27
4.1.	Tipus de vesícules de secreció .....	28
4.1.1.	Vesícules constitutives .....	28
4.1.2.	Grànuls de secreció.....	29
4.1.3.	Vesícules sinàptiques o SLMVs.....	29
4.1.4.	Lisosomes secretors o LROs .....	29
4.2.	Principis del transport vesicular .....	30
4.2.1.	Molècules de recobriment .....	30
4.2.2.	Proteïnes adaptadores.....	30
4.2.3.	Senyals de classificació.....	31
4.3.	Transport a la membrana plasmàtica .....	36
4.3.1.	Proteïnes de transport.....	36
4.3.2.	Rab GTPases .....	36
4.3.3.	Proteïnes SNAREs.....	37

---

5.	Secreció en els astròcits .....	40
5.1.	Mecanismes de secreció en astròcits .....	40
5.1.1.	Secreció no exocítica en astròcits.....	41
5.1.2.	Exocitosi en astròcits.....	43

---

OBJECTIUS.....	49
----------------	----

---

RESULTATS .....	53
CAPÍTOL I: La senyalització per AMP cíclic reprimeix l'activació i promou la maduració en els astròcits.....	55
CAPÍTOL II: L'AMP cíclic regula l'expressió de proteïnes exocítiques i potencia la secreció regulada de pèptids en astròcits en cultiu.....	81
CAPÍTOL III: Secretogranina III és una granina astrocitària que es sobreexpressa en glia reactiva.....	97

---

DISCUSSIÓ.....	111
----------------	-----

---

CONCLUSIONS .....	127
-------------------	-----

---

BIBLIOGRAFIA .....	131
--------------------	-----

---

ANNEX.....	149
Informe del director .....	151

---

Agraïments.....	153
-----------------	-----

---



## Índex de figures

FIGURA 1. Les prolongacions dels oligodendròcits envolten els axons per formar la beina de mielina. ....	4
FIGURA 2. Relació de la micròglia amb les cèl·lules hematopoètiques i les cèl·lules del sistema nerviós central. ....	7
FIGURA 3. Patró de gliogènesi a l'embrió i a les zones progenitores en l'adult. ....	8
FIGURA 4. Reproducció esquemàtica dels principals tipus d'astròcits i cèl·lules endimials i la seva localització a les diferents capes/ regions específiques del sistema nerviós central. ....	11
FIGURA 5. Microdominis anatòmics formats per les cèl·lules gials. ....	16
FIGURA 6. Els astròcits proporcionen suport metabòlic a les neurones. ....	18
FIGURA 7. Sinapsi tripartita. ....	20
FIGURA 8. Fonts de calci dins l'astròcit. ....	22
FIGURA 9. Esquema dels canvis morfològics i d'expressió de l'astrocitosi al llarg del temps. ...	24
FIGURA 10. Esquema on es mostren els factors que indueixen l'astrocitosi i les principals vies moleculars activades. ....	26
FIGURA 11. Vies de secreció en les cèl·lules eucariotes. ....	28
FIGURA 12. Mecanismes de classificació als grànuls densos. ....	34
FIGURA 13. Vies de secreció i biogènesi de grànuls densos en cèl·lules (neuro)endocrines. ...	35
FIGURA 14. Exemple funcional de la fusió de grànuls mitjançada per proteïnes SNARE. ....	38
FIGURA 15. Mecanismes d'exocitosi de neurotransmissors no exocítica i híbrida. calci. ....	43
FIGURA 16. Les SLMVs es situen en els terminals dels astròcits pròxims a les membranes neuronals que contenen receptors NMDA. ....	45
FIGURA 17. Microscopia electrònica on es mostra la localització de CGB i SgII en vesícules similars als grànuls de secreció (grànuls densos) en astròcits en teixit. ....	47
FIGURA 18. Expressió de proteïnes exocítiques en cèl·lules en cultiu. ....	114
FIGURA 19. Proteïnes implicades en l'exocitosi de neurones, astròcits i micròglia. ....	115
FIGURA 20. La micròglia sobreexpressa algunes proteïnes SNARE en el tractament amb citocines pro inflammatòries. ....	116
FIGURA 21. L'alliberació de TNF- $\alpha$ es produeix de forma ràpida i depenent de transport vesicular i proteïnes SNARE. ....	117
FIGURA 22. Dependència de les proteïnes SNARE en l'alliberació de SgII regulada per calci en astròcits. ....	120
FIGURA 23. El marcatge de SgIII en plaques senils en humans està associat amb neurites distròfiques i amb astròcits activats. ....	125

---

## Índex de taules

TAULA 1. Fenotips dels astròcits i marcadors usats per identificar-los. ....	13
TAULA 2. Funcions de les cèl·lules astroglials. ....	14
TAULA 3. Classificació dels membres de la família SNARE. ....	37

**Abreviatures**

Aldh1L1	Aldehid deshidrogenasa família 1, membre L1 ( <i>Aldehyde Dehydrogenase 1 family, member L1</i> )
AMPA	( <i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> )
AMPc	Adenosina 3'-5'- Monofosfat cíclica
ANP	Pèptid natriurètic atrial ( <i>Atrial Natriuretic Peptide</i> )
AP	Proteïnes adaptadores ( <i>Adaptor Protein</i> )
ATP	Adenosina trifosfat
BDNF	Factor neurotròfic derivat del cervell ( <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> )
CD	( <i>Cluster of Differentiation</i> )
CgA	Cromogranina A ( <i>Chromogranin A</i> )
CgB	Cromogranina B ( <i>Chromogranin B</i> )
CNTF	Factor neurotròfic ciliar ( <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i> )
CPE	Carboxipeptidasa E ( <i>Carboxipeptidase E</i> )
CRE	Element de resposta al cAMP ( <i>cAMP response element</i> )
CREB	Proteïna d'unió al element de resposta al AMPc ( <i>cAMP response element-binding protein</i> )
CT-1	Cardiotrofina-1 ( <i>Cardiotrophin-1</i> )
EAA	Aminoàcid excitador ( <i>Excitatory Amino Acid</i> )
EGF	Factor de creixement epidèrmic ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
ER	Reticle endoplasmàtic ( <i>Endoplasmic Reticulum</i> )
FGF	Factor de creixement de fibroblasts ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
GABA	Àcid gamma aminobutíric ( <i>gamma-aminobutyric acid</i> )
GDNF	Factor neurotròfic derivat de cèl·lules glials ( <i>Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor</i> )
GFAP	Proteïna fibril·lar àcida glial ( <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> )
GLAST	Transportador de glutamat aspartat ( <i>Glutamate Aspartate Transporter</i> )
GLT-1	Transportador de glutamat 1 ( <i>Glutamate Transporter</i> )
GLUT	Transportador de glucosa ( <i>Glucose Transporter</i> )
GS	Glutamina sintetasa ( <i>Glutamine Synthase</i> )
IFN	Interferó
IGF-1	Factor de creixement similar a la insulina 1 ( <i>Insulin-like Growth Factor 1</i> )
IL	Interleucina ( <i>Interleukin</i> )
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfat ( <i>Inositol trisphosphate</i> )
IP <sub>3</sub> R	Receptor d'IP <sub>3</sub>

---

LIF	Factor inhibidor de leucèmia ( <i>Leukemia Inhibitory Factor</i> )
LPS	Lipopolisacàrid ( <i>Lipopolysaccharide</i> )
LRO	Orgànuls relacionats amb els lisosomes ( <i>Lysosome-related organelles</i> )
mGluRs	Receptors metabotròpics de glutamate ( <i>Metabotropic Glutamate Receptor</i> )
MHC	Complex major d'histocompatibilitat ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MMPs	( <i>Matrix metalloproteinases</i> )
NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid reduït
NG2	Antigen neuro-glial 2
NGF	Factor de creixement nerviós ( <i>Nerve Growth Factor</i> )
NMDA	( <i>N-Methyl-D-aspartate</i> )
NPCs	Cèl·lula precursora de neurones ( <i>Neural Precursor Cells</i> )
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
OPCs	Cèl·lula precursora d'oligodendròcits ( <i>Oligodendrocyte Precursor Cells</i> )
PC	( <i>Proprotein convertase</i> )
PG <sub>E</sub>	Prostaglandina E
PKA	Proteïna quinasa dependent d'AMPc
PKC	Proteïna quinasa C
RyR	Receptor de rianodina ( <i>Ryanodine Receptors</i> )
SG	Grànul de secreció ( <i>Secretory granule</i> )
SgII	Secretogranina II ( <i>Secretogranin II</i> )
SgIII	Secretogranina III ( <i>Secretogranin III</i> )
SLMVs	Microvesícules similar a les sinàptiques ( <i>Synaptic-like micro-vesicles</i> )
SNAP	<i>Soluble NSF Attachment Protein</i>
SNARE	<i>Soluble NSF Attachment Protein Receptor</i>
SNC	Sistema nerviós central
SNP	Sistema nerviós perifèric
SOD	Superòxid dismutasa ( <i>Superoxide dismutase</i> )
Stxbp	<i>Syntaxin binding protein</i>
SV	Vesícula sinàptica ( <i>Synaptic vesicle</i> )
SVZ	Zona subventricular ( <i>Subventricular zone</i> )
TGN	Xarxa de trans-Golgi ( <i>Trans-Golgi Network</i> )
TNF	Factor de necrosi tumoral ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
VAMP	Proteïna de membrana associada a la vesícula ( <i>vesicle-associated membrane protein</i> )
VEGF	Factor de creixement endotelial vascular ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )



# INTRODUCCIÓ

---



El sistema nerviós és un sistema de processament de la informació amb dues funcions fonamentals: la relació amb el medi extern i el control de tots els òrgans de l'individu. Permet rebre la informació, ja sigui externa o interna, analitzar la situació i elaborar una resposta. També és el responsable de coordinar totes les funcions, conscients o inconscients, de l'individu (Kandel *et al.*, 2000).

## 1. Composició cel·lular del SNC

A part de les neurones, que representen el 10% de les cèl·lules al SNC, el SNC està format per la glia que representa el 90% restant.

### 1.1. Neurones

La neurona és la unitat bàsica del cervell i la seva característica diferencial és la capacitat de generar potencials d'acció. Les neurones s'organitzen en xarxes (o circuits) i es comuniquen entre elles mitjançant les sinapsis. La senyalització neuronal implica la propagació del potencial d'acció al llarg de l'axó fins al terminal presinàptic i l'alliberació dels neurotransmissors que s'uneixen als receptors localitzats a la membrana de la neurona postsinàptica, generant la despolarització de la neurona que continua propagant el senyal (Allen i Barres, 2009).

### 1.2. Cèl·lules glials

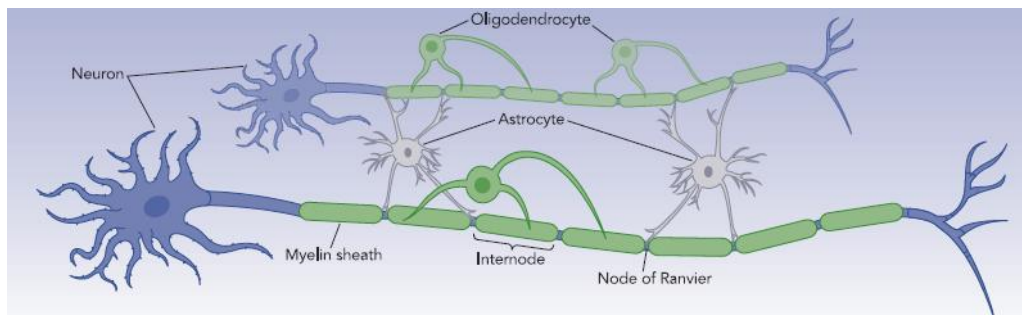
El terme de cèl·lula glial clàssicament es refereix a tres tipus de cèl·lules. La primera categoria inclou les cèl·lules de Schwann i els oligodendròcits, que s'encarreguen de produir la mielina en el sistema nerviós perifèric i central, respectivament. Aquestes cèl·lules envolten els axons de les neurones amb una beina de mielina per aïllar i facilitar la transmissió ràpida i eficient de l'impuls nerviós. La segona categoria està formada pels astròcits, unes cèl·lules de morfologia estrellada que proporcionen suport a les neurones. El tercer tipus de cèl·lula glial és la micròglia, que no té un origen neural sinó que deriva del mesoderma, és originada pels macròfags que envaeixen el cervell en estats molt primerencs del desenvolupament i s'estableixen en el SNC. Les cèl·lules endimèries també estan incloses dins de la paraula glia, ja que deriven de la glia radial i comparteixen algunes propietats amb els astròcits. Recentment, s'ha descrit un nou tipus de cèl·lula glial, caracteritzada per l'expressió del proteoglicà condroitin sulfat NG2, les cèl·lules NG2 o ploidendròcits.

#### 1.2.1. Oligodendròcits

Els oligodendròcits envolten llargs segments dels axons amb una beina multi laminada formada per l'extensió de la membrana cel·lular que s'ajunta amb la membrana de l'axó



mitjançant unes juntes especials que defineixen els nodes de Ranvier entre els llargs segments de mielina (Figura 1).



**FIGURA 1.** Les prolongacions dels oligodendròcits envolten els axons per formar la beina de mielina. Les regions mielinitzades dels axons (internodes) estan interrompudes per regions no mielinitzades (nodes de Ranvier). Les prolongacions dels astròcits contacten amb els nodes (Extret de Jackman *et al.*, 2009).

Els oligodendròcits només són competents per iniciar el procés de mielinització en un període de temps molt reduït (generalment 12-18h) durant el desenvolupament, ja que un cop madurs són relativament incapaços de mielinitzar. El procés d'embolcallament de múltiples axons per part d'un únic oligodendròcit és altament regulat. Es seleccionen axons amb un diàmetre superior als  $0,2 \mu\text{m}$  i encara que no es coneixen els mecanismes moleculars de reconeixement, són diferents en el SNC i en el SNP. Per exemple, un senyal crític per la mielinització en el sistema nerviós perifèric és la interacció de la neuregulín-1 (NRG1) neuronal tipus III amb els receptors glials ErbB, mentre que no és essencial per la mielinització del SNC, per això es consideren altres factors axonals alternatius. El factor de creixement semblant a la insulina 1 (IGF-1) i el factor inhibidor de leucèmia astroglial (LIF) estimulen la mielinització. En canvi, AKT, mTOR i la sobreexpressió d'NRG1 en les neurones produeixen la hipermyelinització dels axons (Nave, 2010).

Es considerava que un senyal indispensable per l'inici de la mielinització era l'activitat elèctrica de les neurones, però els oligodendròcits en cultiu poden envoltar axons que han estat fixats prèviament (Rosenberg *et al.*, 2008) de manera que sembla ser que els oligodendròcits mitjançant diferents senyals poden mielinitzar els axons per defecte quedant restringits localment per altres canvis en els axons, com la disminució de l'expressió de PSA-NCAM i de LINGO-1, una proteïna transmembrana amb repeticions de residus de leucina i un domini d'immunoglobulina (Charles *et al.*, 2000).

Els oligodendròcits no només envolten els axons per aïllar-los elèctricament sinó que a més indueixen l'agrupament dels canals de sodi al llarg de l'axó, en els nòduls de Ranvier. La presència de la beina de mielina també provoca un augment del diàmetre de l'axó possiblement per l'acumulació i fosforilació local del neurofilament. A més, proporcionen suport tròfic a les neurones ja que sintetitzen el factor neurotròfic derivat de cèl·lules glials

(GDNF), el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF) i el factor de creixement derivat de la insulina-1 (IGF-1) (Bradl i Lassmann, 2010).

### **1.2.2. Astròcits**

Els astròcits són les cèl·lules més nombroses i heterogènies del SNC. Els subtipus d'astròcits es poden definir seguint paràmetres que es sobreposen com la localització del cos cel·lular, característiques morfològiques, propietats electro fisiològiques i el perfil d'expressió gènica. Bioquímicament es defineixen per l'expressió d'unes proteïnes específiques com són el filament intermedi GFAP, l'enzim glutamina sintetasa (GS), els transportadors EAA específics d'astròcits GLAST i GLT-1, la proteïna d'unió al calci S100 $\beta$ , o Aldh1L1 (aldehid deshidrogenasa família 1, membre L1) (Kimelberg *et al.*, 2009)

Els astròcits madurs tenen una morfologia molt característica. Des del seu soma s'originen unes ramificacions primàries que gradualment es van dividint en ramificacions cada cop més fines fins a donar lloc a una xarxa densa de terminals que estan íntimament units amb les sinapsis. Un únic astròcit de ratolí, depenent de la regió cerebral, pot arribar a ocupar una àrea d'entre 20.000 i 80.000  $\mu\text{m}^3$ , envoltar nombrosos somes neuronals, associar-se amb 300-600 dendrites i establir contacte amb unes 100.000 sinapsis individuals aproximadament. En humans, aquestes xifres són molt més elevades, ja que un únic astròcit ocupa un volum 30 vegades superior al que ocupa en els rosegadors i pot arribar a contactar amb 2.000.000 de sinapsis (Oberheim *et al.*, 2006)

### **1.2.3. Micròglia**

La micròglia representa el 5- 20% de les cèl·lules en el SNC, de manera que és tan nombrosa com les neurones.

Manté un fenotip quiescent en el SNC normal, contínuament monitoritzant el seu microambient a través de la pinocitosis i la interacció amb les neurones, expressant nivells baixos de MHC classe I i II així com molècules co-estimuladores com CD86 i CD40. Quan es produeix un dany en el SNC, la micròglia es converteix en un fenotip activat amb una elevada proliferació, motilitat, activitat fagocítica i alliberació de citocines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, RANTES) i espècies d'oxigen reactives (Yang *et al.*, 2010) que recluten la micròglia, activen els astròcits i augmenten l'excitabilitat neuronal (Milligan i Walkins, 2009).

Com a cèl·lules presentadores d'antígens tenen un paper similar als macròfags perifèrics, i són components essencials tant de la immunitat innata com l'adaptativa; ja que durant l'activació augmenta l'expressió d'MHC i de molècules co-estimuladores que contribueixen a la resposta de les cèl·lules T CD4 i CD8 (Olson i Miller, 2004).

La micròglia també presenta una fagocitosi transitòria durant l'ontogènia del SNC, ja que a través del CR3 està implicada en la fagocitosi de neurones apoptòtiques i les seves connexions que expressen les molècules del complement C1q i C3 (Stevens *et al.*, 2007).

Recentment també s'ha relacionat la micròglia amb l'aparició del dolor neuropàtic (Smith, 2010) així com que algunes proteïnes secretades per la micròglia tenen funcions específiques en el cervell durant el desenvolupament i la plasticitat sinàptica (Bessis *et al.*, 2007).

#### **1.2.4. Cèl·lules endimàries**

Les cèl·lules endimàries deriven de la glia radial i comparteixen algunes característiques amb els astròcits com l'expressió de GFAP. Formen una capa epitelial que revesteix la superfície dels ventricles cerebrals i presenten característiques morfològiques diferents als astròcits com la presència de cilis. Actuen com a barrera entre el teixit cerebral i el líquid cefaloraquídi (LCR), tenen un paper en la secreció i el manteniment de l'equilibri del LCR i en el metabolisme de les toxines (Wang i Bordey, 2008).

#### **1.2.5. Cèl·lules NG2**

Recentment, s'ha identificat un nou tipus de cèl·lula glial: les cèl·lules NG2, també conegudes com sinantòcits o polidendròcits. Són identificables per l'expressió del proteoglicà condroitin sulfat NG2 i es troben tant el cervell en desenvolupament com en l'adult (Peters, 2004). Primer es van identificar com una cèl·lula progenitora d'oligodendròcits (OPCs) perquè expressen diversos marcadors comuns, però tenen unes característiques diferencials que els permeten classificar com a unes cèl·lules de glia diferents. Presenten una morfologia i distribució similar als astròcits tant en la substància grisa com en la blanca del SNC adult. Tenen una morfologia estrellada amb nombroses prolongacions primàries que es van bifurcant fins a formar una arborització d'un diàmetre de 100µm, estenent les seves prolongacions fins als nodes de Ranvier i les sinapsis on interactuen amb les neurones. Fisiològicament moltes NG2 expressen canals de voltatge de Na<sup>+</sup>, receptors AMPA permeables al Ca<sup>2+</sup>, receptors de GABA i purinoreceptors. A l'hipocamp reben projeccions de les neurones piramidals de CA3 i d'interneurones gabaèrgiques (Sakry *et al.*, 2011) el que suggereix que podrien tenir un paper important d'integració al cervell. A més, són cèl·lules progenitores altament plàstiques que poden donar lloc a astròcits i fins i tot a neurones (Nishiyama *et al.*, 2009; Heneka *et al.*, 2010) i com a resposta al dany augmenten la seva proliferació de manera que contribueixen a l'astrogliosi reactiva (Di Bello *et al.*, 1999; Levine *et al.*, 1994; McTigue *et al.*, 2001)

## 2. Desenvolupament dels astròcits

El sistema nerviós és un dels òrgans que es diferencia abans a partir de l'estat embrionari de blàstula. En els humans, el tub neural primitiu es forma a partir de la quarta setmana de gestació i la neurogènesi comença a partir de la cinquena setmana. El seu desenvolupament és bastant llarg, es produeix al llarg de tota l'embriogènesi i no finalitza la mielinització fins etapes post-natals. A mesura que avança el desenvolupament neural, el tub neural experimenta una expansió diferencial i una regionalització per formar regions rostro-caudals identificables que formaran les futures subdivisions del cervell. La part anterior del tub neural pateix una expansió dramàtica on es poden distingir tres vesícules primàries: el cervell anterior (prosencefal), el cervell mig (mesencefal) i el cervell posterior (romboencefal). El creixement diferencial i la posterior segregació produeix una subdivisió addicional del prosencefal en telencefal i diencefal i el romboencefal en metencefal i mielencefal. La part caudal del tub neural no pateix aquesta expansió, però sí que augmenta de mida de forma paral·lela a l'embrió i es diferencia per donar lloc a la medulla espinal. (Liu i Rao, 2004).

Totes les neurones i la macròglia del sistema nerviós deriven del neuroepiteli pseudo-estratificat d'origen ectodèrmic que folra els ventricles cerebrals i el canal espinal en el desenvolupament embrionari. En canvi, la micròglia no té un origen neural, sinó que deriva del mesoderma, i és originada pels macròfags que envaeixen el cervell en estats molt primerencs del desenvolupament i s'estableixen en el SNC (Figura 2).

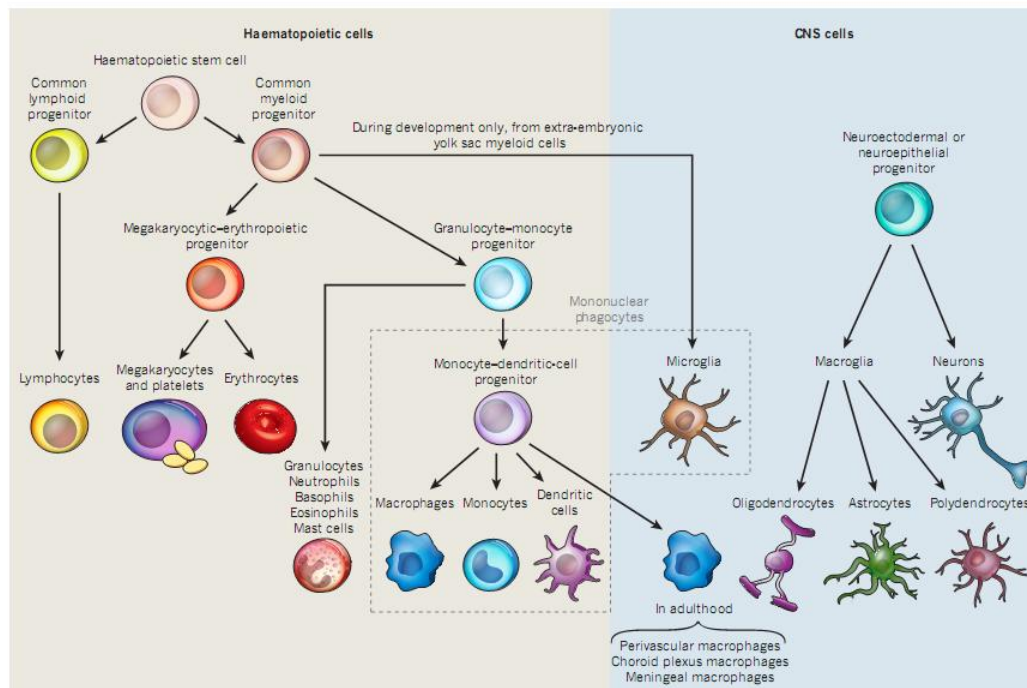


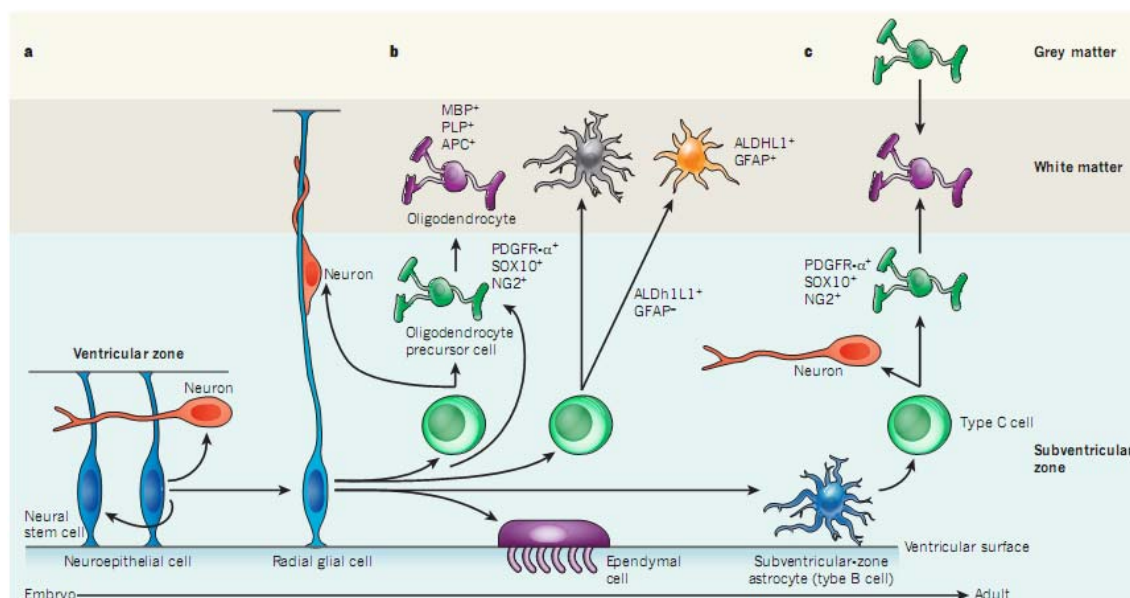
FIGURA 2. Relació de la micròglia amb les cèl·lules hematopoètiques i les cèl·lules del sistema nerviós central. Estan representades les cèl·lules hematopoètiques i del sistema nerviós central, i mitjançant fletxes s'indica les relacions

del seu llinatge. La micròglia són les úniques cèl·lules hematopoètiques que es troben al parènquima del SNC. L'origen dels macròfags perivasculars, els macròfags del plexes coroidals i els macròfags de les meninges és desconegut, encara que aquí s'indica que deriven de la cèl·lula progenitora de monòcits i cèl·lules dendrítiques de forma especulativa (Extret de Ransohoff i Cardona, 2010)

Una característica fonamental del desenvolupament neural en els vertebrats és que els diferents tipus cel·lulars són generats en un seqüència específica, primer les neurones, seguides dels astròcits i els oligodendròcits.

Les cèl·lules neuroepiteliales inicialment es divideixen d'una manera simètrica, produint una ràpida expansió dels progenitors. El començament de la neurogènesi està marcat per l'inici d'una manera asimètrica de divisió, on les cèl·lules neuroepiteliales produeixen una altra cèl·lula neuroepiteliale i una neurona o un progenitor intermedi destinat a la neurogènesi. Les cèl·lules de la glia radial són les cèl·lules progenitores primàries en les etapes embrionàries de la neurogènesi, i al'igual que les cèl·lules de les que deriven, folren els ventricles i el canal espinal, mantenint la polaritat apical-basal. Els precursors d'oligodendròcits i les cèl·lules endimàries també deriven de la glia radial però els progenitors intermedis involucrats no estan clars (Rowitch i Kriegstein, 2010) (Figura 3).

La transició a la gliogènesi requereix el retorn a la divisió asimètrica dels progenitors. Els mecanismes implicats en aquests canvis de comportament i destí dels progenitors no són del tot coneguts, però es creu que estan implicades característiques intrínseques dels progenitors així com canvis en la senyalització del seu ambient (Guillemot, 2007).



**FIGURA 3. Patró de gliogènesi a l'embrió i a les zones progenitores en l'adult.** La progressió de l'embrió a l'adult es mostra d'esquerra a dreta. Les fletxes negres indiquen auto-renovació o diferenciació d'un tipus cel·lular a un altre.

Estan llistats els marcadors de la macròglia i dels seus precursors. **A)** Auto-renovació de la línia de cèl·lules neuroepiteliales del ventricles al llarg dels neuroeixos a les etapes del tancament del tub neural. Aquestes cèl·lules poden generar alguna neurona. Les cèl·lules neuroepiteliales es transformen en cèl·lules de glia radial i comença la neurogènesi. **B)** La glia radial produeix cèl·lules progenitores intermèdies i cèl·lules precursoras d'oligodendròcits (OPCs) que donen lloc a neurones i oligodendròcits, respectivament. La glia radial també pot donar lloc a astròcits produint progenitors intermedis que s'expandeixen en nombre abans de produir astròcits. Els astròcits protoplàsmics i els astròcits fibrosos poden sorgir de progenitors comuns o independents. La glia radial també produeix cèl·lules endimàries. **C)** En adults, els oligodendròcits provenen de dues vies independents: les cèl·lules tipus B de la zona subventricular donen lloc a una cèl·lula amplificadora de trànsit, anomenada cèl·lula tipus C, que pot produir tant OPCs com neurones. Les OPCs generades i les que ja residien a la substància grisa produeixen oligodendròcits. ALDH1L1, família aldehid deshidrogenasa 1 membre L1; APC, *adenomatous polyposis coli*; GFAP, proteïna àcida fibril·lar glial; MBP, proteïna bàsica de mielina; PDGFR- $\alpha$ , receptor alfa del factor de creixement derivat de plaquetes; PLP, proteïna proteolipídica 1. Totes les cèl·lules verdes són progenitors intermedis, sent les cèl·lules tipus C un subconjunt d'aquestes, i totes les cèl·lules blaves són cèl·lules progenitores neurals (Extret de Rowitch i Kriegstein, 2010).

## 2.1. De la neurogènesi a la gliogènesi

El potencial *in vivo* de les cèl·lules neuroepiteliales i la glia radial està restringit de forma regional per l'acció de senyals organitzadores com *sonic hedgehog* (SHH), factors de creixement de fibroblasts (FGF), *WNTs* i proteïnes morfogèniques d'ós (BMPs), que proporcionen informació posicional mitjançant gradients al llarg dels eixos dorsal-ventral, anterior-posterior i medial-lateral.

La gliogènesi generalment segueix a la neurogènesi en el desenvolupament del SNC i els mateixos progenitors donen lloc a diferents tipus cel·lulars, de manera que s'ha de produir un canvi perquè aquests progenitors generin tipus cel·lulars distints.

Els mecanismes que regulen la transició entre la formació de neurones i astròcits són complexes i no estan molt ben entesos. Treballs recents suggereixen que aquest canvi és produït tant per factors extrínsecs que promouen l'astrogènesi com intrínsecs que disminueixen la neurogènesi a la vegada que promouen l'astrogènesi (Freeman, 2010).

- **Wnt.** És necessari per a l'activació de gens neurogènics (neurogenina 1 i neurogenina 2) que indueixen la diferenciació neuronal i bloquegen l'activació de gens gials. Malgrat això, els lligands de *Wnt* es continuen expressant després de la transició neurona-glia, encara que ja no indueixen l'expressió de neurogenines a les NPCs a causa de canvis a l'acetilació i la metilació dels seu promotor.
- **Canvis a l'acetilació i la metilació** dels promotors neurogenina 1 i neurogenina 2. En etapes inicials, es produeix una elevada acetilació i una baixa metilació que correspon a una conformació de la cromatina oberta que permet l'associació amb la RNA polimerasa II, per tant, les neurogenines s'expressen i promouen la neurogènesi

inhibint l'astrogènesi. En canvi, en etapes posteriors, es produeix una baixa acetilació i una elevada metilació que correspon a una conformació de la cromatina tancada, de manera que no s'expressen neurogenina 1 ni neurogenina 2 i no s'inhibeix l'astrogènesi (Hirabayashi *et al.*, 2009)

- **Citocines:** Com el factor neurotròfic ciliar (CNTF), el factor inhibidor de leucèmia (LIF) i la cardiotrofina-1 (CT-1) (Miller i Gauthier, 2007) activen la via JAK/STAT que uneix CBP/p300 i es trasllada al nucli on promou la diferenciació astrogliàl. Malgrat això, aquesta activació no és suficient si no està activada la via de senyalització de Notch.
- **Notch:** Aquesta via s'activa per Jag1 i Dll2 produït per les neurones neurogenina<sup>+</sup>. Aquests lligands activen NFIA (factor nuclear augmentat IA), que inhibeix Dnmt1 (DNA (citosina-5-)metiltransferasa 1) provocant la desmetilació dels llocs d'unió de STAT en els promotors i l'activació de l'expressió de GFAP i S100 $\beta$ .
- **BMPs:** Tenen un paper dual ja que tant promouen la neurogènesi com la gliogènesi. La presència de BMP2 juntament amb citocines gliogèniques promou la formació d'un complex SMAD-p300 proteïna d'unió a CRE- STAT que activa l'expressió de gens astroglials (Nakashima *et al.*, 2001).

Tots aquests factors regulen la capacitat de les NPCs per donar lloc als astròcits, però no la funcionalitat, el creixement i la diversificació dels astròcits.

## 2.2. Diversitat astrogènica

Els astròcits són una població morfològicament heterogènia. Els astròcits madurs en els rosegadors es poden dividir en dos grups segons la seva morfologia i localització: astròcits fibrosos i protoplasmàtics.

Els astròcits protoplasmàtics, que presenten una morfologia estrellada, es troben a la substància grisa i les seves prolongacions envolten les sinapsis i els vasos sanguinis; en canvi, els astròcits fibrosos es troben a la substància blanca, on contacten amb els nodes de Ranvier i els vasos sanguinis. Alguns tipus d'astròcits morfològicament diferents van ser descrits amb anterioritat i tenen noms especials com la *glia de Müller* a la retina i la *glia de Bergmann* al cerebel. També hi ha petites poblacions d'astròcits especialitzats localitzats en regions específiques del SNC com són els astròcits velats del cerebel i el bulb olfactori, els astròcits interlaminars al còrtex dels grans primats, els astrocits presents en els òrgans periventriculars i la hipòfisi, els pituícits a la neurohipòfisi i els astròcits perivasculars i marginals que es localitzen molt a prop de la pia formant la glia limitant que ajuda a l'aïllament del parènquima cerebral del compartiment vascular i subaracnoïdeu (Verkhartsky i Butt, 2007). Estudis recents

fisiològics i d'expressió gènica mostren que els astròcits són una població cel·lular diversa que mostren diferents característiques en diferents regions cerebrals i en les diferents etapes del desenvolupament (Figura 4).

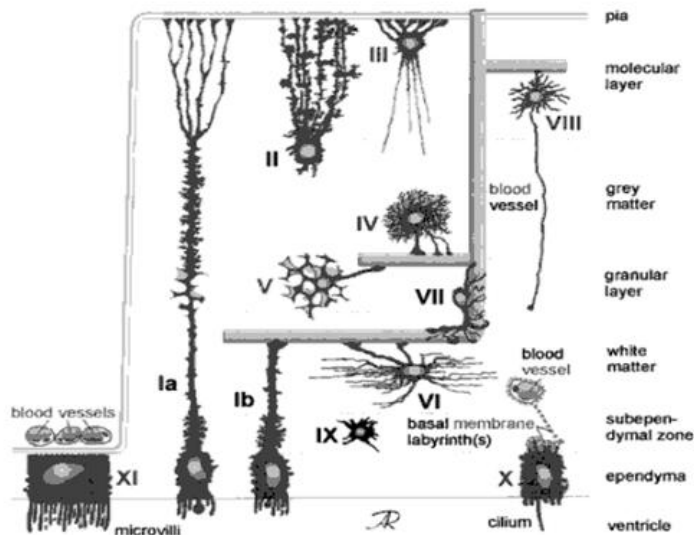


FIGURA 4. Reproducció esquemàtica dels principals tipus d'astròcits i cèl·lules endimàries i la seva localització a les diferents capes/regions específiques del sistema nerviós central. I: tanícits (a:pial; b:vascular); II: astròcit radial (glia de Bergmann); III: astròcit marginal; IV: astròcit protoplasmàtic; V: astròcit velat; VI: astròcit fibrós; VII: astròcit perivascular; VIII: astròcit interlaminar; IX: astròcit immadur/ glioblast; X: endimòcit; XI: cèl·lula del plexe corideu (Extret de Kettenmann and Ransom, 2005).

### 2.2.1. Heterogeneïtat regional

Aquesta diversitat pot ser a causa dels diferents orígens d'aquestes cèl·lules. L'astrogliogènesi s'inicia tard en el desenvolupament embrionari i continua al llarg del període neonatal i postnatal, de manera que els astròcits de l'escorça provenen de 3 fonts diferents.

En primer lloc, de la glia radial resident a la zona ventricular (VZ) embrionària, que s'origina a partir de la transformació de les cèl·lules neuroepitelials de la VZ en progenitors neurals per donar lloc tant a astròcits com a neurones (Kriegstein i Gotz, 2003; Pinto i Gotz, 2007; Rakic, 2003). Després de la migració neuronal al llarg de les seves prolongacions, la glia radial les retracta i es transforma en astròcits estrellats en el període perinatal.

Una altra font d'astròcits són els progenitors de la zona subventricular (SVZ) en animals postnats. Aquests progenitors, que presenten característiques similars a la glia radial, migren cap a l'escorça on poden esdevenir astròcits o oligodendròcits madurs. Aquests progenitors es distingeixen per l'expressió del factor de transcripció Dlx-2 i que no expressen Zebrin II, un marcador de la glia radial. Donen lloc a astròcits de la substància grisa i blanca del telencèfal dorsal. En aquesta zona hi ha un altre grup de progenitors que expressa NG2, però no els marcadors dels altres progenitors, ni Dlx-2 ni Zebrin II, que donen lloc a astròcits de l'escorça dorsal, però no a la substància blanca, encara que majoritàriament generen oligodendròcits.



I finalment, un petit grup de progenitors resideix a la zona marginal de l'escorça en desenvolupament i són diferents dels precursors de la zona ventricular i subventricular (Hewett, 2009).

Aquests 3 llinatges astrocitaris diferenciats suggereixen que no tots els astròcits s'han format de la mateixa manera, cosa que permet explicar la diversitat d'astròcits en una mateixa àrea del cervell (Wang i Bordey, 2008).

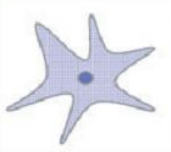
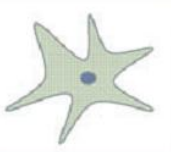

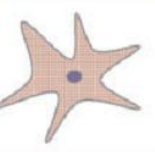
### 2.2.2. Heterogeneïtat fenotípica

Però aquesta diversitat fenotípica també pot ser causada per factors ambientals. Els astròcits són cèl·lules molt plàstiques i algunes de les seves característiques fenotípiques les adquireixen al llarg del desenvolupament normal. Els astròcits estan íntimament relacionats amb les neurones de manera que l'entorn neuronal defineix el fenotip astrocític per facilitar i optimitzar el processament de la informació a nivell local. Això afecta als nivells d'expressió de canals de  $K^+$  i  $Ca^{2+}$ , receptors de neurotransmissors, transportadors, connexines,... la qual cosa afecta la comunicació i l'excitabilitat (Matyash i Kettenmann, 2010).

Un dels exemples més clars és el que es produeix com a resposta a la inflamació. En el SNC normal, els astròcits són descrits com a cèl·lules en un estat quiescent o en repòs que participen en la funció cerebral normal; però com a resposta a un dany es tornen reactius i canvien la seva morfologia, la mida i el secretoma en un procés anomenat *astrocitosi anisomòrfica*. Alguns autors suggereixen que existeix un fenotip intermedi en el qual els astròcits estan activats i que s'anomena *astrocitosi isomòrfica*. Aquestes categories no són excloents, sinó que existeix una progressió gradual entre elles, la qual cosa dona lloc a fenotips intermedis (Sofroniew i Vinters, 2010) (Taula 1).

En l'astrocitosi isomòrfica, també anomenada *astrocitosi lleu* o *activació astrocitària*, es produeix un lleuger augment de l'expressió de GFAP, hi ha una certa proliferació i la secreció de citocines antiinflamatòries (John *et al.*, 2005; Meeuwssen *et al.*, 2003). De fet, el tractament amb citocines pro-inflamatòries es creu que provoca l'activació dels astròcits (Herx i Yong, 2001; John *et al.*, 2003).

En canvi, en l'astrocitosi anisomòrfica, també anomenada *astrocitosi severa* o *reactivitat astrocitària*, es produeix un gran augment de l'expressió de GFAP, augmenten les taxes de proliferació i la secreció de citocines pro-inflamatòries com TNF- $\alpha$  i CXCL10 (Daginakatte *et al.*, 2008). Aquest fenotip generalment està associat amb la formació de la cicatriu glial, on els astròcits delimiten l'àrea danyada (Sofroniew i Vinters, 2010).

			
Quiescent	Activated		Reactive
Normal	Mild gliosis	Severe gliosis	
Resting	Isomorphic astrogliosis		Anisomorphic astrogliosis
Common markers used to identify astrocyte phenotype			
Low GFAP	↑ GFAP	↑↑ GFAP	
No Vimentin	↑ Vimentin *	↑↑ Vimentin	
No Nestin	↑ Nestin *	↑↑ Nestin	
Low Aquaporin 4	↑ Aquaporin 4	↑↑ Aquaporin 4*	
↑ S100β	↑ S100β	↑↑ S100β	
Low CSPG	↑ CSPG	↑↑ CSPG	

TAULA 1. Fenotips dels astròcits i marcadors usats per identificar-los.

Els astròcits es troben en un estat quiescent en el cervell adult normal. En l'*astrocitosi isomòrfica* es produeix un lleuger augment de les proteïnes del citoesquelet. En canvi, en l'*astrocitosi anisomòrfica*, el fenotip més sever, es produeix un augment marcat d'aquestes proteïnes. (Extret de Nash *et al.*, 2010)

Tots aquest fenotips són difícils de reproduir *in vitro*, ja que els astròcits es troben en un ambient molt diferent en el que es troben *in vivo*. Les condicions artificials per al seu creixement i manteniment els provoquen un major estat d'activació de com es troben en el teixit d'origen ja que perden la seva conformació en 3D. De fet, ja durant el procés de dissecció i dissociació enzimàtica del teixit els indueix un estat d'activació. A més a més, el medi de creixement conté diversos factors, procedents del sèrum, que poden induir certa diferenciació (Nash *et al.*, 2010).

### 3. Funcions dels astròcits

Tradicionalment els astròcits es consideraven simples cèl·lules de suport que proporcionaven suport estructural i metabòlic a les neurones. Els astròcits són el principal element del sistema homeostàtic ja que són els responsables del manteniment de la concentració iònica i de neurotransmissors a l'espai extracel·lular, l'homeòstasi del pH, de proporcionar suport metabòlic i nutritiu a les neurones, la regulació de la barrera hematoencefàlica i la defensa del sistema nerviós central. Recentment s'ha descrit que els astròcits a més, expressen diferents cascades de senyalització, estan dotats amb rutes de comunicació intercel·lular, les unions de tipus gap, i tenen la capacitat d'alliberar diferents tipus de gliotransmissors a través de diferents vies de secreció regulada. Això els permeten realitzar una gran varietat de funcions complexes i indispensables com la diferenciació neuronal, la regulació de la guia axonal, la formació de sinapsis, la plasticitat cerebral, l'homeòstasi i la comunicació (Seth i Koul, 2008) (Taula 2).

#### FUNCIONS DELS ASTRÒCITS

<b>Desenvolupament</b>	Els astròcits coma elements <i>stem</i> del SNC Guia axonal Regulació de la sinaptogènesi
<b>Estructural</b>	Els astròcits divideixen la substància grisa en territoris independents i formen la unitat neuro-vascular Els astròcits formen anatòmicament sincicis separats i integren altres cèl·lules neuronals en aquests sincicis Formen la interfície glial-vascular i regulen la formació de la barrera hematoencefàlica
<b>Metabòlica</b>	Regulació de la micro circulació cerebral Subministrar substrats energètics a les neurones a través de la llançadora glucosa-lactat
<b>Homeostàtica</b>	Regulació de la concentració extracel·lular d'ions, en concret de la captació i redistribució del $K^+$ seguint les fluctuacions associades amb l'activitat neuronal Regulació del pH extracel·lular Homeòstasi dels neurotransmissors, especialment de glutamat Homeòstasi de l'aigua cerebral
<b>Senyalització</b>	Modulació de la transmissió i la plasticitat sinàptica Alliberació de neurotransmissors Senyalització a llarga distància dins del sincici

TAULA 2. Funcions de les cèl·lules astroglials. (Extret de Verkhratsky i Parpura, 2010)

### 3.1. Desenvolupament

#### 3.1.1. *Els astròcits com a elements stem*

Durant molt de temps es creia que el SNC no tenia activitat neuroregeneradora. Malgrat això, s'ha establert que en dues àrees concretes del cervell adult es produeix la neurogènesi: la zona subventricular dels ventricles laterals, inclosa la *rostral migratory stream*, i la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp (Doetsch, 2003; Gritti *et al.*, 2002) on resideixen les cèl·lules mare neuronals que s'assemblen a la glia radial o als tanicits i que tenen l'habilitat de dividir-se i generar neurones granulars al gir dentat de l'hipocamp o migrar per la *rostral migratory stream* cap al bulb olfatori on formen interneurons. Aquestes cèl·lules mare expressen tant marcadors típics d'astròcits madurs com GFAP, S100 $\beta$ , GLAST, GLT1 o GS, encara que no en realitzen les funcions típiques, com marcadors de cèl·lules immadures com vimentina i nestina (Kriegstein i Alvarez-Buylla, 2009).

#### 3.1.2. *Guia axonal*

L'aparició dels astròcits en el desenvolupament és posterior a la formació de les neurones en el SNC. Tot i això, els astròcits realitzen funcions importants durant el desenvolupament de la substància grisa i blanca. Els límits moleculars formats pels astròcits participen en la guia de la migració d'axons en desenvolupament i d'alguns neuroblasts.

#### 3.1.3. *Regulació de la sinaptogènesi*

Els astròcits també són elements clau en la sinaptogènesi, en la maduració de les sinapsis i en el seu manteniment. En condicions *in vitro*, l'addició d'astròcits en un cultiu de neurones augmenta considerablement la formació de sinapsis. Els astròcits produeixen i secreten colesterol (Nieweg *et al.*, 2009), que és crític per a la formació de sinapsis i secreten diversos factors que es necessiten per la seva maduració i manteniment. A més sintetitzen i alliberen trombospodines 1 i 2 que promouen la sinaptogènesi tant *in vitro* com *in vivo* (Christopherson *et al.*, 2005) i que són crítiques per a la plasticitat sinàptica després d'una lesió, la remodelació i la regeneració. La trombospodina és suficient per induir sinapsis que tenen una ultraestructura presinàptica i postsinàptica normal així com el reclutament de proteïnes presinàptiques i postsinàptiques com la sinapsina i el PSD-95, respectivament. Malgrat això, aquestes sinapsis són postsinàpticament silencioses perquè no presenten cap sensibilitat al glutamat. Els astròcits secreten una proteïna, encara no identificada que indueix la resposta al glutamat (AMPA). També realitzen una funció en l'eliminació de sinapsis durant el desenvolupament (*pruning*) ja que alliberen senyals que promouen l'expressió del

complement C1q a les sinapsis per marcar-les perquè siguin eliminades per la micròglia (Barres, 2008).

### 3.2. Funció estructural

Les cèl·lules gials divideixen el parènquima cerebral en dominis morfològics independents. A la substància grisa els astròcits parcel·len els teixit segons els seus territoris anatòmics, les cèl·lules de la micròglia estan entreteixides en el circuit cerebral des dels seus dominis defensius no cavalcats i els oligodendròcits formen els nodes de Ranvier en els axons que envolten.

Les cèl·lules gials són elements centrals en la microarquitectura cerebral. Els astròcits divideixen el teixit en dominis estructurals independents i no cavalcats mitjançant un procés anomenat *tiling* (Bushong *et al.*, 2004) (Figura 5). En aquests dominis les membranes dels astròcits cobreixen les sinapsis i estableixen contactes les membranes neuronals i els vasos sanguinis.

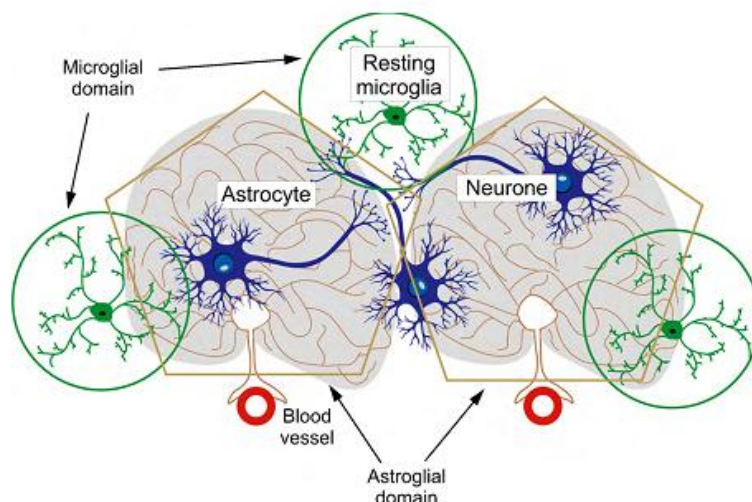


FIGURA 5 Microdominis anatòmics formats per les cèl·lules gials. (Extret de Verkhratsky, 2010)

Els dominis astroglials s'integren formant una xarxa cel·lular anomenada *sincici astrocitari* mitjançant les unions tipus gap localitzades a les prolongacions perifèriques on els dominis estan en contacte. Aquestes unions formades per connexines (principalment Cx43 i Cx30), els proporcionen un sistema de transferència d'informació entre els astròcits ja que permeten la difusió intercel·lular de molècules com ions,  $IP_3$  i substrats metabòlits. El *sincici* està format dins de les estructures anatòmiques del cervell i contribueix a la seva organització jeràrquica (Houades *et al.*, 2008).

### **3.2.1. Formació de la barrera hematoencefàlica.**

La barrera hematoencefàlica (BHE) és una barrera de difusió que impedeix l'entrada al parènquima cerebral de molècules segons la seva polaritat i la seva mida. Els principals components cel·lulars de la BHE són les cèl·lules endotelials dels capil·lars que formen unions hermètiques i estan envoltades per la làmina basal, els pericits perivasculars i els peus astrocitaris. El paper dels pericits en la BHE no està del tot estudiat i el paper dels astròcits es considerava perquè els astròcits reactius tenen un paper clau en el tancament de la BHE després d'una lesió (Bush *et al.*, 1999) i perquè es creia que la BHE es formava en edats post natal, coincidint amb la generació dels astròcits. Estudis recents demostren que la BHE està totalment formada des que els vasos penetren el parènquima cerebral, aproximadament en els dies de desenvolupament embrionari 11-12 en ratolí (Saunders *et al.*, 2008). Diferents vies de senyalització controlen diferents aspectes de la formació de la barrera incloent la senyalització *Wnt*, que es troba en les cèl·lules mare neurals i dirigeix l'angiogènesi específica del SNC, la migració de les cèl·lules endotelials al cervell i l'expressió d'alguns transportadors. En el desenvolupament post natal, quan les cèl·lules mare ja han desaparegut, aquestes funcions les adquireixen els astròcits, que s'encarreguen més de manteniment que de la inducció de la formació de la BHE (Abbot *et al.*, 2006).

### **3.3. Funció metabòlica**

Els microdominis anatòmics formats pels astròcits, els permet format la unitat neurovascular que integra els circuits neuronals amb la circulació sanguínia cerebral i el suport metabòlic.

#### **3.3.1. Regulació de la micro circulació cerebral**

Els astròcits envolten les sinapsis i per tant, poden ser estimulats per l'activitat neuronal, a la vegada que els seus peus astrocitaris embolcallen els vasos sanguinis i poden enviar senyals a les cèl·lules de la musculatura llisa que determinen el diàmetre dels vasos.

L'alliberació de glutamat per part de les neurones activa els receptors metabotrópics de glutamat (mGluRs) dels astròcits, la qual cosa provoca un increment dels nivells de calci intracel·lular que activen la fosfolipasa A<sub>2</sub>. S'inicia així la producció d'àcid araquidònic a partir dels fosfolípids de la membrana, que a la vegada dóna lloc als vasodilatadors prostaglandina E (PG<sub>E</sub>) i àcid epoxieicosatrienoic o vasoconstrictor àcid 20-hidroxi eicosatetraenoic (20-HETE) (Attwell *et al.*, 2010). Treballs recents mostren que la competició entre vasodilatadors i vasoconstrictors depèn de la pressió parcial d'oxigen (pO<sub>2</sub>), i predomina la vasodilatació a pO<sub>2</sub> baixes (Kleinfeld *et al.*, 2011).

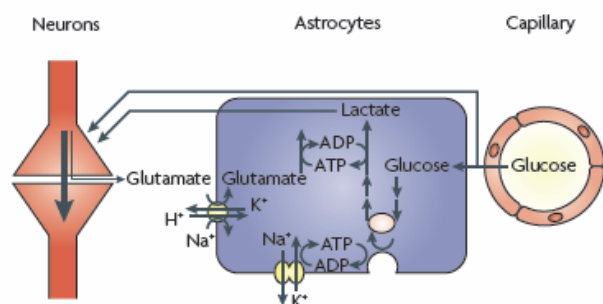
### 3.3.2. Suport metabòlic a les neurones

La glucosa del flux sanguini, és el principal substrat per al cervell adult, i és captada principalment pels astròcits a través del transportador de glucosa GLUT1 i també per les neurones que expressen el GLUT3.

Tal i com està formulat pel model de la llançadora de lactat astròcit-neurona (ANLS) els astròcits responen a l'activació glutamatèrgica augmentant la seva taxa d'ús de la glucosa i alliberant lactat a l'espai extracel·lular que pot ser usat per les neurones per cobrir les seves necessitats energètiques. Aquest mecanisme molecular implica el funcionament seqüencial dels transportadors de glutamat específics dels astròcits i l'ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , l'activació de la glicòlisi en els astròcits i l'intercanvi mitjançant el transportador monocarboxilat del lactat a les neurones (Magistretti, 2006) (Figura 6).

A les sinapsis glutamatèrgiques, el glutamat pot ser recaptat pels astròcits a través del transportador de glutamat 1 (GLT1) o el de glutamat/aspartat (GLAST) que cotransporten glutamat i sodi; de manera que la concentració intracel·lular de sodi augmenta i activa l'ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+\alpha 2$  específica de cèl·lules glials. L'ATP consumit per l'ATPasa i la conversió del glutamat a glutamina a través de la glutamina sintasa poden activar la glicòlisi i la formació de lactat. Aquest lactat s'allibera pels astròcits a través d'un transportador mono carboxilat específic MCT1 i les neurones el capten del medi extracel·lular a través del seu transportador específic MCT2 on es convertirà en piruvat que després entrarà en el cicle dels àcids tricarboxílics.

L'ús del lactat per les neurones pot tenir diferents propòsits, com l'augment del potencial redox en augmentar l'NADH i la generació d'ATP que pot ser usat per sintetitzar glutamat. La glutamina també pot ser captada per la neurona a través dels seus receptors específics i convertida en glutamat per la glutaminasa abans de ser acumulada a les vesícules sinàptiques.



**FIGURA 6. Els astròcits proporcionen suport metabòlic a les neurones.** La neurona pot captar directament la glucosa, però un augment de l'activitat d'una neurona glutamatèrgica provoca una major captació de glutamat de l'astròcit que envolta la sinapsi. L'energia necessària per la captació del glutamat prové del metabolisme de la glucosa en metabolitzar-se a lactat, que posteriorment és entregat a les neurones (Llançadora glucosa- lactat) (Extret de Giaume *et al.*, 2010).

### 3.4. Funció homeostàtica

Els astròcits són les principals cèl·lules encarregades de la regulació homeostàtica de l'espai extracel·lular. Diversos sistemes de transports expressen a les membranes gials que permeten el control de les concentracions d'ions, neurotransmissors, neuromoduladors, metabòlits i altres molècules actives a l'esclètxa sinàptica necessàries per a la correcta transmissió sinàptica.

#### 3.4.1. Homeòstasi d'ions

Està acceptat que els astròcits controlen els nivells extracel·lulars de  $K^+$  i d'altres ions encara que no es coneix exactament a través de quin mecanisme. Es creu que estan implicats canals rectificadors d'entrada (en anglès, *inward rectifier channels*) i per difusió des de les àrees amb una concentració elevada cap a altres regions amb concentracions baixes a nivell d'una única cèl·lula o dins del sincici (Kofuji i Newman, 2004).

#### 3.4.2. Homeòstasi de l'aigua

El transport d'ions, de  $K^+$  o  $Na^+$ , requereix el moviment d'aigua. L'aigua entra i surt dels astròcits a través de les aquaporines, principalment aquaporina 4 (AQP4), que estan concentrades en les prolongacions perisinàptiques i perivasculars (Haneke *et al.*, 2010).

#### 3.4.3. Homeòstasi del pH

Les membranes dels astròcits tenen diferents tipus de mecanismes per treure  $H^+$ , incloent l'intercanviador de  $Na^+/H^+$ , transportadors de bicarbonat, transportadors monocarboxílics i l'ATPasa de protons de tipus vacuolar.

#### 3.4.4. Homeòstasi de neurotransmissors

Els astròcits són responsables del recanvi de diversos neurotransmissors. Expressen transportadors pel glutamat, el GABA i la glicina que serveixen per retirar-los de l'espai sinàptic. Els astròcits són especialment importants a les sinapsis glutamatèrgiques perquè proporcionen una font de glutamat, el retiren de l'esclètxa sinàptica i mantenen la llançadora glutamat-glutamina. Els astròcits expressen de forma específica els transportadors de glutamat GLAST (EAAT-1) i GLT1 (EAAT-2), que co-transporten el glutamat juntament amb  $Na^+$ , la qual cosa produeix un augment dels nivells de  $Na^+$  intracel·lulars que són compensats per la sortida de  $Na^+$  mitjançant l'intercanviador  $Na^+/Ca^{2+}$ , que funciona de forma inversa. El glutamat dins de l'astròcit és convertit en glutamina per l'enzim glutamina sintetasa específica dels astròcits i transportat a les neurones mitjançant la llançadora glutamat-glutamina per



proporcionar una font de glutamat que pot ser acumulat de nou dins de les vesícules sinàptiques (Sofroniew i Vinters, 2010).

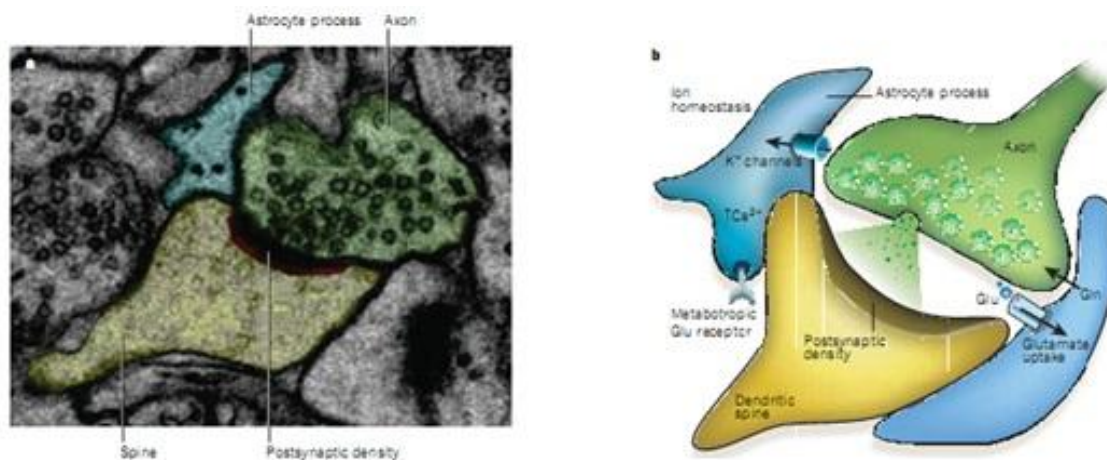
### 3.4.5. Funció antioxidant

L'estrès oxidatiu és una de les causes de degeneració neuronal. Els antioxidants de baix pes molecular com l'àcid ascòrbic, el glutatió i l' $\alpha$ -tocoferol, juntament amb els enzims antioxidants, formen les defenses cel·lulars contra l'estrès oxidatiu. Els astròcits presenten elevades quantitats d'aquests antioxidants, així com també de superòxid dismutasa (SOD), catalasa, glutatió reductasa i glutatió peroxidasa. Aquesta elevada concentració d'enzims antioxidants pot protegir a les neurones del seu voltant en condicions d'estrès oxidatiu.

Els astròcits també poden produir de forma induïble l'hemo-oxigenasa que actua en el metabolisme del grup hemo i és important en la prevenció de l'ús del ferro per a la producció d'espècies d'oxigen reactives (Kimelberg, 2010). A més, els astròcits participen en la captació d'alguns metalls pesats com el plom, ja que expressen proteïnes d'unió a metalls com les metal·lotionines que els doten amb propietats neuroprotectores i neuroregeneratives després del dany o exposició a metalls pesants (Wang i Bordey, 2010).

### 3.5. Funció de senyalització

Durant dècades, els astròcits van ser considerats participants passius en les sinapsis. Actualment, diferents estudis suggereixen l'existència d'una comunicació bidireccional i dinàmica entre les neurones i les cèl·lules de glia. La majoria de les sinapsis del SNC estan formades per tres elements: el terminal neuronal presinàptic, la membrana neuronal postsinàptica i la prolongació de l'astròcit, una estructura que rep el nom de *sinapsi tripartida* (Araque *et al.*, 1999) (Figura 7).



**FIGURA 7. Sinapsi tripartida.** Les prolongacions dels astròcits estan íntimament associades amb les sinapsis. **A)** Microfotografia electrònica que mostra una sinapsi tripartida a l'hipocamp. La prolongació de l'astròcit (blau) envolta l'àrea perisinàptica. L'axó de la neurona està marcat de color verd, l'espina dendrítica de color groc i la

densitat post-sinàptica de color vermell i negre. **B)** Representació esquemàtica de la sinapsi tripartita (Extret de Eroglu i Barres, 2010).

L'astròcit té un paper dual en aquesta sinapsi tripartida. Primer, perquè els astròcits tenen l'avantatge de que expressen receptors per neurotransmissors a la seva membrana (potencialment poden expressar els receptors per tots els neurotransmissors, malgrat això aquesta expressió està altament controlada *in vivo* i astròcits de diferents àrees del cervell estan dotats amb diferents tipus de receptors) i poden sentir l'alliberació de neurotransmissors en el terminal neuronal (Fellin *et al.*, 2004; Latour *et al.*, 2001; Pasti *et al.*, 1997); i en segon lloc, modular la transmissió sinàptica (Fellin *et al.*, 2004; Henneberg *et al.*, 2010; Panatier *et al.*, 2006; Perea i Araque, 2005) alliberant gliotransmissors (Halassa i Haydon, 2010; Volterra i Meldonesi, 2005).

### **3.5.1. Senyalització dins del sincici astrocitari: fisiologia astrocitària**

Els astròcits són cèl·lules excitables, encara que la seva excitabilitat no està basada en canvis de voltatge de la seva membrana sinó en oscil·lacions en la concentració intracel·lular de calci.

Hi ha dos patrons diferencials d'oscil·lacions de calci: en situacions basals, quan no hi ha cap estímul, es produeixen oscil·lacions de calci espontànies que generalment estan restringides a un únic astròcit i passen independentment de l'activitat neuronal (Aguado *et al.*, 2002). En canvi, com a resposta a un estímul, els astròcits presenten un oscil·lació de calci evocada que implica varies cèl·lules glials i és generada pel glutamat alliberat a la sinapsi per les neurones que activa els receptors de glutamat metabotròpics (mGluR1 i mGluR5) i transportadors presents a la membrana cel·lular dels astròcits (Fellin, 2009).

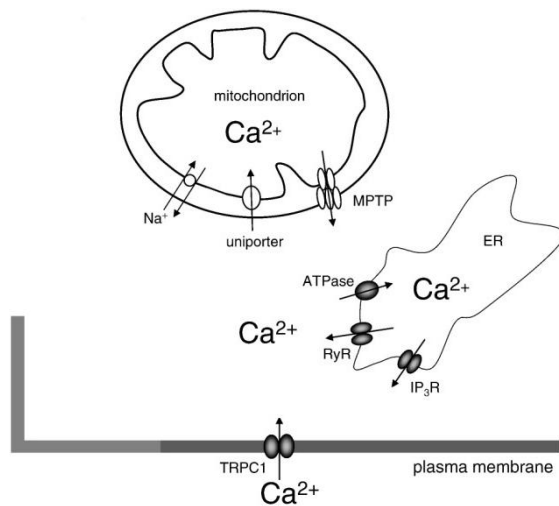
Per generar aquestes oscil·lacions les cèl·lules de glia usen les reserves intracel·lulars de calci, el reticle endoplasmàtic (RE) i la mitocòndria (Figura 8). Aquests orgànuls generen i mantenen les concentracions intracel·lulars i permeten la propagació de les ones de calci intercel·lulars.

El RE és la principal font de calci intracel·lular ja que pot acumular grans quantitats (400-800  $\mu\text{mol/L}$ ) per acció de les ATPases de calci del reticle sarco(endo)plàsmic, SERCAs. El calci pot sortir del reticle a través dels receptors d' $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) i per l'activació dels receptors de rianodina/cafeïna (RyR). Després de l'activació dels receptors metabotròpics, la fosfolipasa C hidrolitza el lípid de membrana fosfatidilinositol 4,5-difosfat i genera diacilglicerol (DAG) i  $\text{IP}_3$ , que activa el receptor d' $\text{IP}_3$  i produeix la sortida de calci del reticle. L'obertura dels receptors de rianodina està regulada pels ions de calci citoplasmàtics, de manera que variacions dels nivells de calci indueixen la sortida de calci del reticle, procés que es coneix com *alliberació de*

*calci induïda per calci* (anomenada CIRC, de l'anglès *calcium-induced calcium release*). Els receptors d' $\text{IP}_3$  estan controlats tant per l' $\text{IP}_3$  com el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La sensibilitat al calci d'aquests canals de calci intracel·lulars és el que fa que la membrana del RE sigui excitable. Una alliberació de calci induïda per l'augment local d' $\text{IP}_3$  produeix el reclutament de canals veïns, que no només amplifiquen l'alliberació de calci inicial, sinó que a més, creen la propagació d'una ona d'alliberació de calci a través de la membrana del RE.

Els dipòsits de calci són reomplerts per les SERCAs amb el  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol, però es requereix l'entrada de calci extracel·lular a través del canals de calci *store-opened* (SOC), en particular aquells que contenen la proteïna *canonical type 1 transient receptor potential* (TRPC1), i també per altres receptors i canals permeables al calci, com els receptors ionotròpics i els canals dependents de voltatge.

Les mitocòndries són excel·lents fonts de calci quan es necessita un increment ràpid de la concentració intracel·lular. Tenen *mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter* (MCU) que transporta el calci a la matriu mitocondrial propulsat per un potencial de membrana negatiu (entre -140 i -180 mV) a través de la membrana mitocondrial interna que es genera per la cadena de transport electrònic. Els MCU tenen una baixa afinitat pel calci, i només el transporten quan  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  al citosol supera els  $0,5\mu\text{M}$ . Així les mitocòndries estan situades molt a prop de receptors d' $\text{IP}_3$  del RE de manera que estan exposades a concentracions de calci més elevades que les que es troben a la major part del citosol (Reyes i Parpura, 2009).



**FIGURA 8. Fonts de calci dins l'astròcit.** L'augment de calci intracel·lular en els astròcits és principalment produït per la sortida de calci del reticle endoplasmàtic a través dels receptors d' $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) i per l'activació dels receptors de rianodina/cafeïna ( $\text{RyR}$ ). L'ATPasa específica de  $\text{Ca}^{2+}$  (SERCA) reomple aquests dipòsits, però requereix l'entrada de calci extracel·lular a través del canals de calci *store-opened* (SOC), en particular aquells que contenen la proteïna *canonical type 1 transient receptor potential* (TRPC1) situats a la membrana plasmàtica. Les mitocòndries també són importants fonts de calci. L'entrada de calci a la mitocondria es realitza mitjançant el transportador *uniporter* i la sortida per l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  i pel porus transitori de permeabilitat mitocondrial (MPTP) (Modificat de Parpura i Zorec, 2010).

Una propietat característica dels astròcits en cultiu és que una elevació de calci en una única cèl·lula es pot propagar a les veïnes format una ona de calci, mitjançant la difusió de l' $\text{IP}_3$  a través de les unions gap i l'alliberació d'ATP de l'astròcit que pot actuar d'una forma

paracrina en els astròcits veïns. Sorprenentment, aquestes ones de calci generalment no es propaguen a altres astròcits *in vivo*, la qual cosa prova que els astròcits poden respondre com a cèl·lules individuals.

### **3.5.2. Alliberació de neurotransmissors**

La senyalització per calci té un paper fonamental en la comunicació bidireccional glia-neurona perquè és produïda pels neurotransmissors alliberats per l'activitat sinàptica i a la vegada provoca l'alliberació de gliotransmissors per part dels astròcits com el glutamat, la D-serina, el GABA, el TNF- $\alpha$ , prostaglandines, el ANP, el BDNF, etc., que poden modular l'activitat neuronal i la fisiologia sinàptica.

### **3.5.3. Modulació de la transmissió i la plasticitat sinàptica**

Els astròcits són els elements més dinàmics de la sinapsi tripartida que poden mostrar modificacions estructurals i funcionals al llarg del desenvolupament, com a resposta a un dany neuronal i en diverses condicions fisiològiques. Els canvis estructurals poden tenir un gran impacte en la funció sinàptica perquè poden influir en la recaptació de neurotransmissors de l'esclatxa sinàptica i l'activació de receptors extra-sinàptics. Per exemple, les espines dendrítiques que tenen contactes amb prolongacions dels astròcits sobreviuen més i són morfològicament més madures que les que no els tenen (Carmona *et al.*, 2009).

L'habilitat dels astròcits per modular l'excitabilitat neuronal i la transmissió sinàptica va ser inicialment descrita en cultius cel·lulars i posteriorment el seu estudi ha estat ampliat en talls cerebrals aguts. Els astròcits modulen la fisiologia neuronal alliberant diferents neurotransmissors com per exemple el glutamat que provoca corrents lents d'entrada (anomenades SICs, de l'anglès *slow inward currents*) per l'estimulació dels receptors d'NMDA post-sinàptics, augmenta la fortalesa sinàptica activant els receptors metabotrópics que incrementen la freqüència de les corrents excitadores post-sinàptiques (EPSCs), l'ATP estimula els receptors P2Y1 i la D-serina contribueix a l'activació dels receptors NMDA. Tots aquests mecanismes augmenten l'excitabilitat neuronal tot augmentant la probabilitat d'alliberació de neurotransmissors en les sinapsis (Perea i Araque, 2010).

La citocina TNF- $\alpha$ , alliberada tant pels astròcits com per la micròglia, promou la inserció dels receptors AMPA a la membrana de les neurones post-sinàptiques, cosa que augmenta l'eficàcia de la neurotransmissió (Beattie *et al.*, 2002; Stellwagen i Malenka, 2006).

## **3.6. Resposta glial al dany**

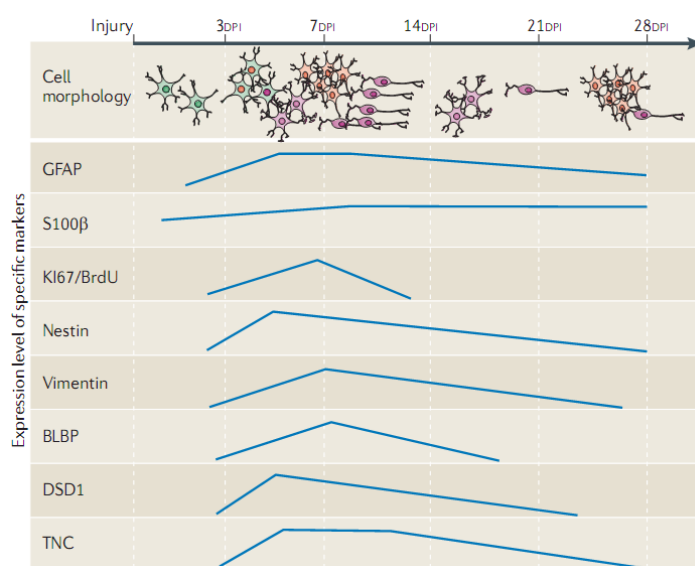
El comportament de les cèl·lules glials canvia després de produir-se un dany. La micròglia és el primer tipus cel·lular en activar-se, migra ràpidament cap al lloc on s'ha produït

la lesió, on inicia encara més la reacció glial i es comunica amb el sistema immune. Les cèl·lules NG2<sup>+</sup> també reaccionen en etapes inicials augmentant la seva proliferació, mentre que els astròcits són les últimes cèl·lules en activar-se i pateixen canvis morfològics, d'expressió gènica i de funcionalitat, en un procés que rep el nom d'*astrocitosi*.

L'astrocitosi es produeix com a resposta a qualsevol dany neuronal, sigui neurodegeneratiu, inflamatori, traumàtic o per un infart cerebral. En aquests casos, els astròcits esdevenen hipertròfics i augmenten l'expressió dels filaments intermedis GFAP i vimentina, però també expressen nestina i la proteïna d'unió a lípids del cervell (BLBP) (Figura 9). A més, en danys més greus com un trauma sever, l'hipòxia o l'infart cerebral, una part dels astròcits reactius també proliferen i augmenta el nombre d'astròcits que envolten la lesió.

### 3.6.1. Canvis morfològics i d'expressió de l'astrocitosi

Un dels models més usats per estudiar l'astrocitosi és la lesió amb una fulla de bisturí (*stab wound injury*) a l'escorça dels ratolins realitzada de forma paral·lela a la línia mitja ja que és un mètode repetitiu i proporciona suficient material pel posterior estudi (Hampton *et al.*, 2004).



**FIGURA 9.** Esquema dels canvis morfològics i d'expressió de l'astrocitosi al llarg del temps. Els astròcits comencen a ser hipertròfics a partir del tercer dia després de la lesió i augmenten l'expressió de GFAP i nestina, així com del proteoglicà DSD1 i de tenascina C, reflectint la desdiferenciació parcial dels astròcits reactius. Una setmana després, els astròcits que envolten la lesió són clarament hipertròfics, allargats i expressen de forma molt abundant BLBP. Això es correspon amb el pic de

proliferació dels astròcits caracteritzat per l'expressió de Ki67 i la incorporació de bromodesoxiuridina (BrdU). D'acord amb l'anterior, el nombre total d'astròcits (marcat pels nivells d'S100β) augmenta amb el temps. Quan la proliferació es para, les proteïnes específiques de la glia immadura (DSD1, TNC, nestina i vimentina) disminueixen però es manté incrementat el nombre total de cèl·lules GFAP<sup>+</sup> (Extret de Robel *et al.*, 2011).

La funció dels astròcits reactius és limitar el dany tissular mitjançant diferents mecanismes: recaptant el glutamat potencialment excitotòxic, protegint de l'estrès oxidatiu per la via del glutatió, alliberant adenosina, protegint de la toxicitat per NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, degradant pèptids β amiloides, encapsulant infeccions i ajudant a segellar la BHE lesionada, reduint

l'edema provocat per traumes, infarts o malalties obstructives i estabilitzant la concentració extracel·lular d'ions. Tot i així, pot ser perjudicial en altres casos. De fet, alguns tipus de lesions poden provocar que els sistemes homeostàtics funcionin d'una manera que exacerbem el dany. Un estrés sever en els astròcits pot provocar una pèrdua de l'homeòstasi iònica que condueix a una alliberació massiva de glutamat, una pèrdua d'ions  $K^+$ , alliberació de NO i espècies d'oxigen reactives, i d'altres agents que promouen la neurotoxicitat (Heneka *et al.*, 2010).

La cicatriu glial que inicialment és considerada beneficiosa perquè limita la zona lesionada amb una barrera física, després és considerada com un aspecte negatiu de l'astrocitosi perquè inhibeix la regeneració dels axons per la secreció de proteoglicans condroitin sulfat (CSPGs) (Mingorance *et al.*, 2006) i altres molècules que n'inhibeixen el creixement (Silver i Miller, 2004).

### **3.6.2. Factors d'activació i vies implicades**

L'astròglia és activada per diferents canvis que es produeixen en el parènquima cerebral després de la lesió. Aquests canvis inclouen la producció d'una gran varietat de molècules de senyalització, algunes derivades de l'extravasació de plasma, capaços d'iniciar la reacció inflamatòria o modular-la al llarg del temps (Figura 10).

Es consideren factors que inicien l'activació glial les purines i pirimidines alliberades per la mort cel·lular i la transmissió excitotòxica, que activen tant els receptors ionotròpics  $P_2X$  com els metabotròpics  $P_2Y$ , i les citocines pro inflamatòries alliberades inicialment per les cèl·lules de la micròglia i posteriorment també pels astròcits, com el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  i l'IFN- $\gamma$ . Aquests a la vegada indueixen la formació de mediadors secundaris que contribueixen a mantenir la resposta astrocítica al llarg del temps i es detecten en patologies cròniques, com metabòlits de l'àcid araquidònic, òxid nítric i enzims incloent metal·loproteïnes de la matriu (MMPs). Tot i així, altres citocines secretades tant per la micròglia com l'astròglia, atenuen l'astrocitosi com la IL-10, l'IFN- $\beta$  i l'Epo.

Després de la lesió els astròcits també sobre expressen els factors de creixement com el factor de creixement nerviós (NGF), el factor neurotròfic derivat dels cervell (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3), el factor neurotròfic ciliar (CNTF), el factor de creixement endotelial vascular (VEGF), el factor de creixement epidèrmic (EGF), el factor de creixement de fibroblasts bàsic (bFGF), el factor de creixement insulínic tipus 1 (IGF-1), el factor de creixement derivat d'una línia de cèl·lules glials (GDNF), per mantenir el suport tròfic a les neurones que encara estan intactes.

Recentment, s'han implicat altres molècules en la reactivitat astrogliol com la lipocalina 2 (Lcn2) que augmenta la sensibilitat a l'estímul citotòxic (Lee *et al.*, 2009) i l'endotelina 1 (ET1) un potent vasoconstrictor produït per les cèl·lules endotelials i els astròcits (Tsang *et al.*, 2001).

Alguns dels canvis morfològics i funcionals dels astròcits reactius semblen regulats només a nivell de citoplasma. En canvi, d'altres impliquen l'activació de cascades de senyalització que provoquen una resposta nuclear que produeix canvis en l'expressió gènica.

Tots aquests factors produeixen l'activació de diferents vies intracel·lulars que controlen les característiques dels astròcits reactius. Mentre que alguns mitjancers intracel·lulars com les GTPases Rho, JAK-STAT, Olig2 i MAPK/ERK, estan principalment implicats en el control de la motilitat com la migració i la proliferació, NFκB i NFAT semblen ser específics de l'activitat inflamatòria. A més, diferents vies convergeixen totalment o parcial o, fins i tot, tenen funcions oposades en funció del context cel·lular (Buffo *et al.*, 2010).

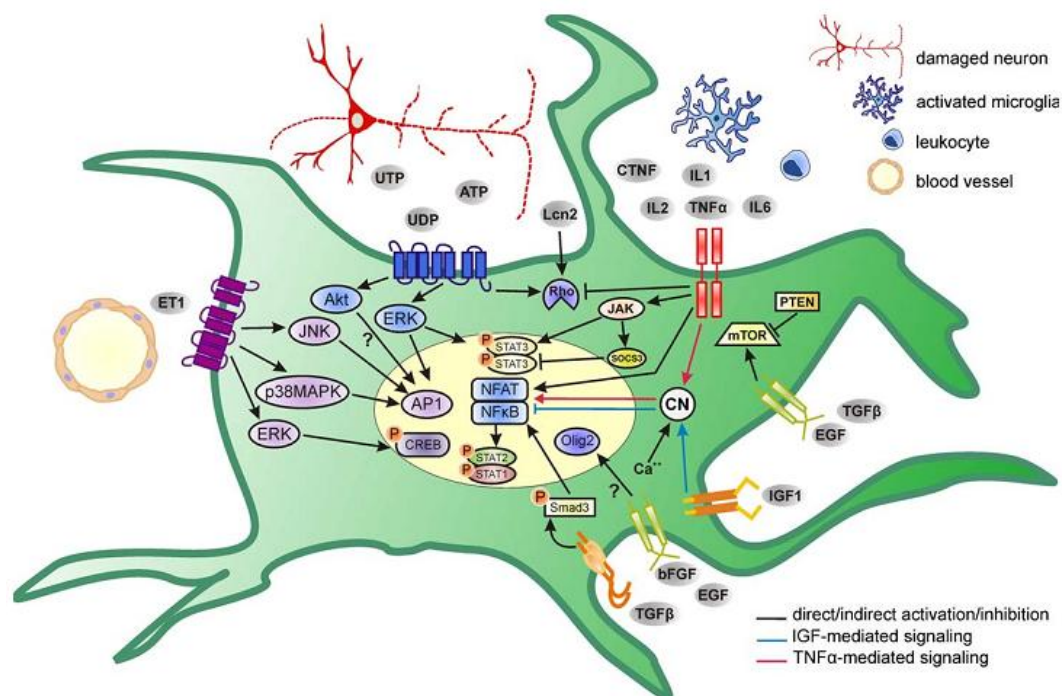


FIGURA 10. Esquema on es mostren els factors que indueixen l'astrocitosis i les principals vies moleculars activades. Els senyals que activen els astròcits són alliberats principalment per la microglia activada, els leucòcits infiltrats, les neurones danyades i les cèl·lules endotelials. Tanmateix, els astròcits modulen la seva pròpia resposta inflamatòria (Extret de Buffo *et al.*, 2010).

#### 4. Secreció

Les cèl·lules eucariotes transporten el contingut de diferents orgànuls envoltats de membrana a altres orgànuls i a altres cèl·lules. Aquest transport implica la formació d'una vesícula a partir d'una membrana precursora, el transport d'aquesta fins a la seva destinació i, finalment, la fusió de la vesícula amb la membrana del compartiment final (Bonifacio, 2004). El procés mitjançant el qual els orgànuls citoplasmàtics es fusionen amb la membrana plasmàtica per alliberar el seu contingut, neurotransmissors, hormones o enzims, a l'espai extracel·lular o incorporar receptors, transportadors, canals o molècules d'adhesió i fragments de membrana a la membrana plasmàtica, rep el nom d'*exocitosi* (Jahn i Sudhof, 1999).

La via de secreció constitutiva és present a tots els tipus cel·lulars i permet el recanvi de la membrana i de components de la matriu extracel·lular. Les noves proteïnes sintetitzades són empaquetades en vesícules de secreció constitutiva, transportades a la membrana cel·lular i secretades independentment de qualsevol estímul intra- o extracel·lular. Tanmateix, algunes cèl·lules, com les neurones i les cèl·lules endocrines o exocrines, presenten també una via de secreció regulada en què unes molècules determinades són concentrades i condensades en grànuls de secreció que són emmagatzemats en el citoplasma esperant ser secretats com a resposta a senyals específics.

Les primeres etapes de la via de secreció són comunes a totes les cèl·lules eucariotes. Tots els precursors de les proteïnes acabades de traduir són traslladats a l'interior del reticle endoplasmàtic on són plegats, se'n comprova la integritat i són sotmesos a diverses modificacions post-traduccionals abans de ser carregats a les vesícules recobertes de COPII per ser traslladats a l'aparell de Golgi on continua aquest procés de modificació. La xarxa de trans-Golgi (TGN) és l'última parada en el complex de Golgi i després de la TGN, les vies de secreció divergeixen i es diferencien. Diferents mecanismes de classificació dirigeixen les proteïnes als diferents compartiments: a diferents dominis de la membrana plasmàtica (domini apical i basolateral), a diferents tipus d'endosomes, a les cisternes de Golgi, a grànuls secretors i a altres compartiments especialitzats en cèl·lules especialitzades (Stow, 2009).

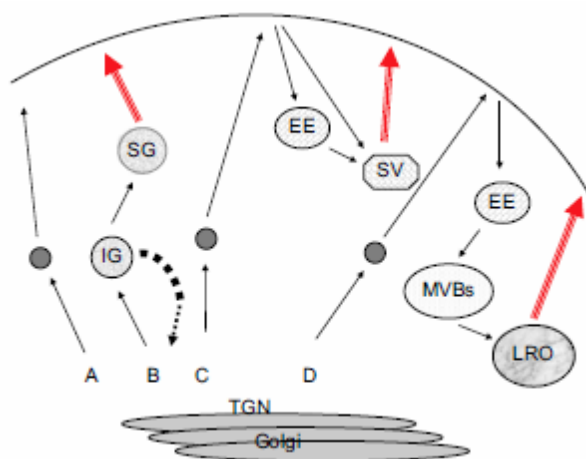
A més del transport a través de la via de secreció clàssica, també s'han descrit dos tipus de transport de proteïnes solubles i de membrana no convencional a la membrana plasmàtica en cèl·lules eucariotes. Per una banda, proteïnes que contenen el pèptid senyal s'insereixen en el RE, però arriben a la membrana cel·lular de forma independent de l'aparell de Golgi. Per altra banda, proteïnes citoplasmàtiques o nuclears que no tenen el pèptid senyal s'ha descrit que són alliberades per les cèl·lules de forma independent del RE i de l'aparell de Golgi.



Malgrat això, aquests dos processos estan restringits a estadis específics del desenvolupament i es desconeix la via de senyalització que els activa (Nickel i Rabouille, 2010).

#### 4.1. Tipus de vesícules de secreció

Per tant, generalment, la secreció en cèl·lules animals es realitza mitjançant tres tipus de vesícules de secreció: la vesícula de secreció constitutiva, que és comuna a tots els tipus cel·lulars; els grànuls de secreció, que només es troben en cèl·lules secretores especialitzades i alliberen el contingut emmagatzemat depenent d'un estímul extern; i les vesícules sinàptiques de les neurones i les microvesícules similars a les sinàptiques (SLMVs) en les cèl·lules neuroendocrines. També trobem un subtipus especial de grànuls de secreció, els orgànuls relacionats amb els lisosomes (LRO) també anomenats *lisosomes secretors* en alguns tipus cel·lulars (Figura 11).



**FIGURA 11. Vies de secreció en les cèl·lules eucariotes.** Aquest esquema mostra les vies de secreció cel·lular incloent la via de secreció constitutiva (A) i la via de secreció regulada (B-D). B) Biogènesi de grànuls de secreció en les cèl·lules endocrines en la que es forma un grànul immadur (IG) a partir del TGN, que madura i dona lloc al grànul de secreció (SG). C) Biogènesi de les vesícules sinàptiques (SV) que implica la secreció constitutiva seguida pel transport des de la membrana plasmàtica a les SV o als endosomes primerencs (EE) com a intermediaris. D) Biogènesi

dels orgànuls relacionats amb els lisosomes (LRO) que implica la secreció constitutiva seguida de la internalització als EE o als cossos multivesiculars (MVBs) i l'entrega als orgànuls relacionats amb els lisosomes (LROs). La fusió de SG, SV i LRO amb la membrana plasmàtica (fletxes vermelles) és dependent d'estímul (Extret de Benado *et al.*, 2009).

##### 4.1.1. Vesícules constitutives

Són petites vesícules secretores formades a la TGN que són contínuament transportades i fusionades amb la membrana plasmàtica. Aquestes vesícules poden ser transportades directament des de la TGN o passar a través de compartiments endosomals, com els endosomes primerencs o tardans i compartiments de reciclatge, abans d'arribar a la membrana plasmàtica. Com que les proteïnes que contenen aquestes vesícules són secretades contínuament, la secreció constitutiva és principalment regulada per la taxa biosintètica de les proteïnes sintetitzades al reticle endoplasmàtic (Ponnambalam i Baldwin, 2003)

#### 4.1.2. Grànuls de secreció

La formació dels grànuls de secreció comença a la TGN amb la formació d'un grànul immadur (IG) que madura i genera el grànul de secreció. Aquest procés de maduració generalment consisteix en la fusió amb altres IG i l'eliminació de les proteïnes mal classificades.

S'han proposat dos models que no són mútuament exclusius i, que expliquen la classificació de les proteïnes dins dels grànuls de secreció. En el model de "classificació per entrada", la classificació de proteïnes es produeix a la TGN i només les proteïnes seleccionades entraran dins dels IG. En canvi, en el model de "classificació per retenció", totes les proteïnes que es sintetitzen a la TGN entraran als IG, però només aquelles proteïnes destinades a la secreció regulada quedaran retingudes al llarg de la maduració del grànul, i la resta seran eliminades per gemmació (Park i Loh, 2008). Aquests dos models s'expliquen amb més detall en apartats posteriors.

#### 4.1.3. Vesícules sinàptiques o SLMVs

La formació de les vesícules sinàptiques està altament relacionada amb la via endocítica. El transport de les proteïnes de membrana de les SVs i les SLMVs es pot produir a través de la via de secreció constitutiva des de la TGN a la membrana plasmàtica i d'aquí directament a les SVs/SLMVs, o mitjançant un intermediari endosomal. La maduració de les SVs és un procés dinàmic que implica diferents etapes d'exo/endocitosi per remodelar la membrana de la vesícula. Durant l'endocitosi i la migració cap als llocs d'alliberació les vesícules són reomplertes amb neurotransmissors.

En un terminal pre-sinàptic madur hi ha tres grups de vesícules: el grup preparat per ser ràpidament alliberat (RRP), un grup de reciclatge i un grup de reserva. Les vesícules RRP són alliberades ràpidament quan es produeix l'estimulació, mentre que les vesícules en reciclatge són alliberades amb una estimulació moderada i el grup de reserva actua com a magatzem i només és alliberat si es produeix una estimulació molt intensa (Bonanomi *et al.*, 2006).

#### 4.1.4. Lisosomes secretors o LROs

Algunes cèl·lules han modificat el compartiment lisosomal perquè també funcioni com un compartiment secretor, de manera que també s'usa per emmagatzemar proteïnes secretores recent sintetitzades. Aquests orgànuls reben el nom de *lisosomes secretors* o *orgànuls relacionats amb els lisosomes*. Els lisosomes secretors comparteixen característiques amb els lisosomes convencionals, com per exemple, el seu contingut àcid i la presència de proteïnes de degradació, però es distingeixen per la seva capacitat de ser secretats de forma regulada.

Només unes poques cèl·lules contenen aquests lisosomes secretors i la majoria d'elles deriven del llinatge hematopoètic com els mastòcits, les cèl·lules T citotòxiques, els neutròfils, els osteoclasts, les cèl·lules presentadores d'antígens, les plaquetes i també els melanòcits. Els lisosomes secretors madurs, de la mateixa manera que els lisosomes convencionals reben transport biosintètic i degradatiu. Això inclou proteïnes que són necessàries per al correcte funcionament de l'orgànul (Blott i Griffiths, 2002).

## 4.2. Principis del transport vesicular

El transport vesicular és una activitat cel·lular fonamental ja que és responsable del tràfic molecular entre els diferents compartiments envoltats de membrana. Per tant, l'especificitat d'aquest tràfic és clau per al correcte funcionament de la cèl·lula. Aquesta especificitat es basa en l'empaquetament selectiu de la càrrega seleccionada en vesícules que reconeixen i es fusionen només amb la membrana diana adequada.

Els mecanismes moleculars implicats en la regulació de la secreció són similars en els diferents tipus cel·lulars i hi estan implicades diferents famílies de proteïnes.

### 4.2.1. *Molècules de recobriment*

Les proteïnes de recobriment citosòlic s'agrupen per induir la formació de les vesícules de transport i concentrar les proteïnes de càrrega en aquestes vesícules. Aquesta concentració es produeix per la interacció de les proteïnes de recobriment amb senyals específiques presents a la cua citoplasmàtica de les proteïnes de càrrega.

Les molècules de recobriment poden classificar-se en tres famílies principals: el complex COPI, responsable de la formació de les vesícules per el transport retrògrad; el complex COPII, que mitjança el transport anterògrad; i el recobriment de clatrina, que té un paper principal en la via endocítica (Dancourt i Barlowe, 2010).

### 4.2.2. *Proteïnes adaptadores*

Diferents complexos de proteïnes adaptadores (AP), que es diferencien segons el reconeixement de la seva càrrega i en la seva localització subcel·lular, s'usen per al transport vesicular i aporten especificitat en el seu contingut i destí.

La formació de les vesícules recobertes està mitjançada per proteïnes petites d'unió a GTP. L'agrupament de les proteïnes de recobriment COPI i COPII és produït per les petites GTPases ARF1 i Sar1 respectivament. L'assemblatge de les cobertes de clatrina és mitjançat per una família de proteïnes classificadores associades a la clatrina (CLASPs).

A més, hi ha tres famílies addicionals de proteïnes adaptadores que comparteixen una homologia limitada amb els complexos AP: les GGAs (*Golgi-localized,  $\gamma$ -ear-containing, ARF-binding proteins*), les *stonins* i una família de proteïnes adaptadores que comprèn Dab 1/ 2, ARH i *numb*. A més, hi ha dues classes addicionals de proteïnes adaptadores: les arrestines i les epsines (Robinson, 2004).

#### 4.2.3. Senyals de classificació

Els adaptadors, les molècules relacionades amb els adaptadors i els complexos, mostren diferents distribucions dins de la cèl·lula i diferents preferències de càrrega. Aquestes propietats els proporcionen el potencial de classificar diferents tipus de càrrega en la via endocítica o exocítica.

##### i. Seqüències específiques

El principi més ben entès i caracteritzat és el reconeixement de seqüències específiques de classificació a la cua citosòlica de càrrega transmembrana per complexos adaptadors (AP) i proteïnes de recobriment. A la TGN, les senyals de classificació s'han identificat en proteïnes dirigides a l'endosoma i en proteïnes dirigides a la membrana basolateral, basades en tirosina amb la seqüència consens NPXY o YXXØ (on N és asparagina; P, prolina; X, qualsevol aminoàcid; Y, tirosina; i Ø, un aminoàcid amb un residu hidrofòbic voluminós a la cadena lateral). La seqüència YXXØ també té un paper important en el transport retrògrad de la membrana plasmàtica a Golgi.

També les seqüències basades en dos residus de leucina, amb les seqüències consens [DE]XXXL[L] o DXXLL, on en alguns casos una leucina és reemplaçada per un residu hidrofòbic gran com una isoleucina o una metionina, realitzen un gran nombre de funcions que controlen el tràfic de proteïnes tant en la via endocítica com en l'exocítica.

##### ii. Modificacions post-traduccionals

Malgrat que les seqüències específiques de classificació tenen un paper fonamental en el direccionament i tràfic de proteïnes cap a la seva localització final, modificacions post-traduccionals de la proteïna poden afectar la seva classificació.

La **fosforilació** de proteïnes de membrana pot influenciar el tràfic en la TGN, tant modulant l'activitat d'un senyal de classificació com generant-ne de nous. La fosforilació regula la interacció proteïna-proteïna, i en aquest cas modula directament la formació d'una vesícula recoberta de clatrina.

La **N-glicosilació** és important per al plegament i funcionalitat d'algunes proteïnes, però a més contribueix a la classificació al llarg del sistema endocític. S'ha demostrat que juntament

amb el domini citoplasmàtic de Sinaptotagmina I, dirigeix les proteïnes a les vesícules sinàptiques i el TNF- $\alpha$  als grànuls de secreció en els mastòcits.

La **O-glicosilació** és important per a l'estabilitat de les glicoproteïnes i és vital per la interacció glicoproteïna-proteïna; a més, modula l'activitat específica d'aquestes proteïnes. Proteïnes citoplasmàtiques i nuclears poden ser O-glicosilades de forma reversible. La O-glicosilació també és un senyal de classificació determinant per al direccionament cap a la membrana plasmàtica, però també per a la internalització de proteïnes des de la superfície cel·lular.

La **poliubiquitinació** de les proteïnes és un senyal de classificació cap a la degradació als proteasomes, però també és un senyal d'internalització, un senyal de classificació que dirigeix les proteïnes directament des de la TGN als endosomes i un senyal per a la invaginació dins de les vesícules luminals dels cossos multivesiculars (De Matteis i Luini, 2008).

El radical **manosa-6-fosfat** identifica les proteïnes solubles lisosomals que no tenen pèptids senyals en la seva seqüència, però són modificades durant la seva biosíntesi. Aquest radical és reconegut pels receptors de manosa-6-fosfat (MPR), uns receptors trans-membrana que fan un cicle entre la TGN i els endosomes tardans transportant proteïnes solubles als lisosomes.

El **processament proteolític de precursors d'hormones peptídiques** és necessari per les hormones i neuropèptids que són sintetitzats com a precursorspolipeptídics inactius que han de ser endoproteolitzats per ser biològicament actius. En cèl·lules neuroendocrines aquest processament és realitzat per dos tipus de proteases: les convertases PC1/3 i PC2, que processen una gran varietat de prohormones i proneuropèptids, i la catepsina L que talla la proencefalina i altres neuropèptids (Hook *et al.*, 2008). La furina, una convertasa expressada de forma ubiqüita, és la principal responsable del processament de les proteïnes secretades de forma constitutiva (Seidah, 2011).

### iii. Direccionament de pèptids als grànuls densos

Existeix un mecanisme que separa les proteïnes que formaran els grànuls densos d'aquelles que són secretades de forma constitutiva. La classificació de les proteïnes en els grànuls densos és un requisit previ per a certs passos de processament post-transcripcional en l'activació d'hormones i proteases; per tant, existeix un mecanisme que assegura el correcte direccionament dels precursors de la proteïna i dels seus enzims processadors en el mateix orgànul. S'han proposat dos models que expliquen la classificació de les proteïnes dins dels grànuls de secreció: "classificació per entrada" (Blazquez i Shennan, 2000) i "classificació per retenció" (Dikeakos i Reudelhuber, 2007).

Els mecanismes de *classificació per entrada* es divideixen en diferents subcategories. Un mecanisme implica inicialment l'agregació de les proteïnes de càrrega com els precursors de les hormones peptídiques i les granines de forma depenent de pH (6.0- 6.5) i de cations divalents. Aquest procés d'agregació exclou les proteïnes secretades de forma constitutiva. Després, els agregats s'uneixen a la membrana de la TGN, en alguns casos a través d'un receptor, com per exemple, carboxipeptidasa E (CPE) que està descrit que dirigeix la pro-opiomelanocortina i el pro-BDNF de la TGN als grànuls densos de cèl·lules de la hipòfisi i neurones hipocampals. La secretogranina III (SgIII), una proteïna que s'associa als microdominis de membrana rics en colesterol i esfingolípid, ala TGN dirigeix la cromogranina A (CgA) als grànuls de secreció (Hosaka *et al.*, 2005) (Figura 12).

Les **granines** són una família de proteïnes àcídiques que inclou chromogranina A (CgA), chromogranina B (CgB o SgI), secretogranina II (SgII o CgC), SgIII (o 1B1075), SgIV (o HISL-19), SgV (o 7B2), SgVI (o NESP55) i SgVII (o VGF). Se'ls han atribuït diferents funcions tant en la formació dels grànuls densos com en els mecanismes de classificació que succeeixen en aquests grànuls. Aquestes proteïnes formen agregats en l'entorn lleugerament àcid dels grànuls electrodensos (pH 5,5) i en presència de calci, la qual cosa suggereix que la seva agregació serveix per evitar la sortida de les granines i d'altres proteïnes dels grànuls madurs (Borges *et al.*, 2010). Les granines també poden unir calci amb alta capacitat i amb baixa afinitat, per això alguns autors consideren que els grànuls de secreció poden actuar com a reservoris de calci, ja que contenen la major concentració de calci de l'interior de la cèl·lula, aproximadament 40 mM. A més, els grànuls de secreció també contenen els receptors de IP<sub>3</sub> a la seva membrana (Yoo *et al.*, 2010). Les granines, a més, es consideren pro-hormones ja que donen lloc a pèptids bio-actius i s'usen com a marcadors d'alguns tipus de tumors i com un signe de malignitat. Recentment, s'ha proposat que les granines estan directament implicades en el desenvolupament d'algunes malalties neurològiques com l'esquizofrènia i l'epilèpsia, i en malalties neurodegeneratives com el Parkinson i l'Alzheimer (Borges *et al.*, 2010).

CgA és un regulador principal en la formació de grànuls de secreció (Taupenot *et al.*, 2005), però també altres proteïnes són importants com secretogranina II i CgB, ja que la seva expressió és suficient per induir a la formació de vesícules fins i tot en cèl·lules que no presenten una via de secreció regulada (Beuret *et al.*, 2004).

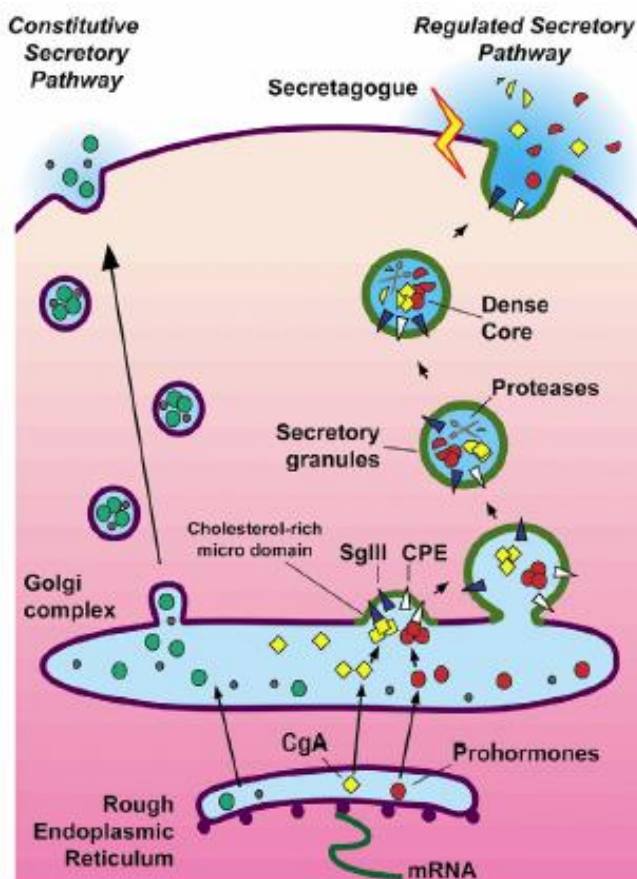
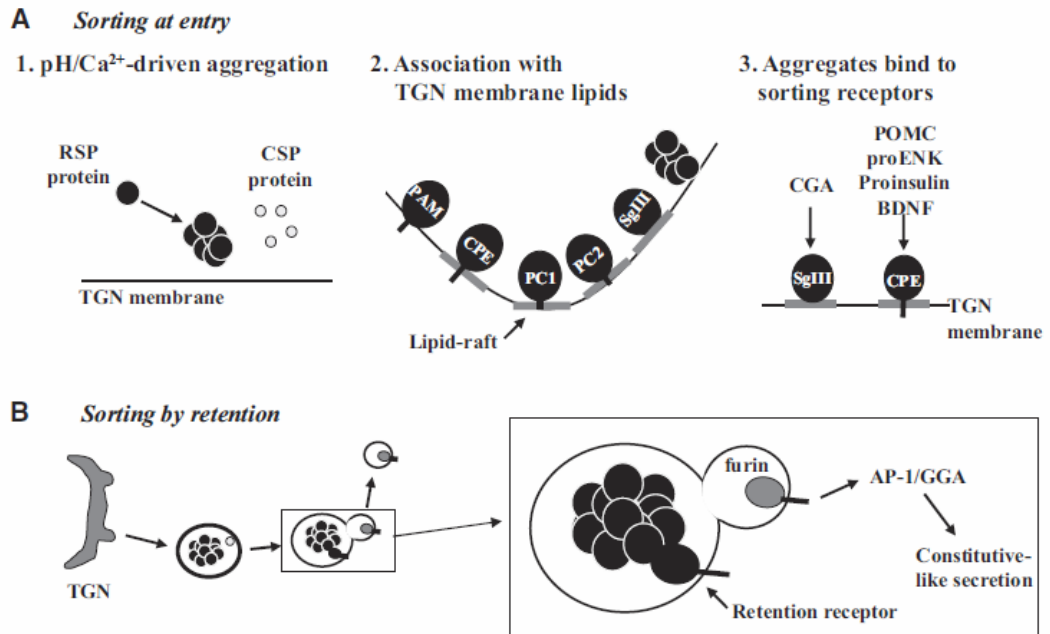


FIGURA 12. Vies de secreció i biogènesi de grànuls densos en cèl·lules (neuro)endocrines. La cromogranina A (CgA) i altres pro-hormones que es sintetitzen en el reticle endoplasmàtic rugós, són transportades a l'aparell de Golgi, agregades i classificades en grànuls que contenen microdominis de membrana rics en colesterol en la xarxa de trans- Golgi a través de receptors, com SgIII i CPE. Els agregats de CgA i les prohormones indueixen la formació de grànuls densos a partir de les membranes de la TGN per la via de la secreció regulada. La CgA i les prohormones són processades a l'interior dels grànuls per proteases per donar lloc a peptidus actius. L'estimulació amb secretagogs provoca l'exocitosi i la secreció d'hormones. En canvi, les vesícules de la via d'alliberació constitutiva present a totes les cèl·lules alliberen el seu contingut sense estimulació prèvia (Extret de Koshimizu *et al.*, 2010).

Un altre mecanisme de classificació per entrada és usat per diferents enzims que processen prohormones, cosa que implica la inserció directa del domini C-terminal de l'enzim en els *lipid rafts* de la membrana de la TGN, com és el cas de CPE, les prohormones convertases 1/3 i 2 (PC1/3, PC2) i la PAM (peptidyl- $\alpha$ -amidating monooxygenase).

El mecanisme de *classificació per retenció* va ser descrit per primera vegada en les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques, on moltes proteïnes que eren presents en els grànuls immadurs, eren eliminades per gemmació dels grànuls immadurs formant vesícules constitutives, mentre que la insulina quedava retinguda en el grànul de secreció.

D'aquesta manera diverses senyals de classificació poden complementar funcionalment a les altres. Existeixen diversos mecanismes de classificació, cadascun dels quals contribueix a l'eficiència de la classificació de la proteïna o a la retenció en els grànuls. El tipus cel·lular i la naturalesa i/o el nombre de dominis de classificació de la proteïna de càrrega són determinants per activar un o altre mecanisme. La multimerització i l'agregació poden afegir sinèrgia entre els mecanismes usat per les altres proteïnes de càrrega del grànul (Dideakos i Reudelhuber, 2007).



**FIGURA 13. Mecanismes de classificació als grànuls densos.** A) Classificació per entrada: 1) Agregació de proteïnes a pH baix i elevada concentració de calci; 2) els agregats proteics i algunes proteïnes s'uneixen directament als *lipid rafts* de la membrana; 3) els agregats o algunes proteïnes s'uneixen a receptors que estan ancorats a la membrana. B) Classificació per retenció, en aquest model tant les proteïnes de secreció regulada com de secreció constitutiva formen part del grànul immadur. Durant el procés de maduració, les proteïnes de secreció regulada i els seus agregats queden retinguts dins del grànul per unió a un receptor, mentre que la resta de proteïnes són eliminades del grànul per un procés de gemmació per un mecanisme dependent d'AP-1/GGA/clatrina en què es formen vesícules de secreció constitutiva (Extret de Park i Loh, 2008).

#### iv. Direccionament de pèptids als lisosomes

Algunes proteïnes de la membrana lisosomal com CD63, LAMP-1 i LAMP-2, tenen un motiu basat en tirosines que pot ser reconegut pel complex adaptador AP1, AP2 i AP3.

Les proteïnes solubles lisosomals no tenen pèptids senyals en la seva seqüència, però són modificades durant la seva biosíntesi per l'addició del radical manosa-6-fosfat, que és reconegut pels receptors de manosa-6-fosfat (MPR). Aquests receptors trans-membrana fan un cicle entre la TGN i els endosomes tardans transportant proteïnes solubles als lisosomes.

A més d'aquests senyals ben caracteritzats, algunes proteïnes arriben als lisosomes secretors per altres vies que són específiques per les cèl·lules que contenen aquests orgànuls. Aquestes senyals de classificació no impliquen l'addició d'un carbohidrat, però si un motiu en la seqüència polipeptídica a l'extrem carboxi-terminal de la proteïna, per exemple un domini ric en prolines (PRD) en la cua citosòlica de FasL en les cèl·lules T i en les *natural killer* (Blott *et al.*, 2001); o en els melanosomes, el clàssic senyal basat en di-leucina, que s'ha proposat que interacciona amb l'AP3 o la seqüència (Ser- Val- Val) que s'ha descrit que interacciona de forma transitòria amb proteïnes que contenen el domini PDZ.



### 4.3. Transport a la membrana plasmàtica

Després del procés de senyalització que dona lloc a l'exocitosi, es produeixen dos processos. El primer és el transport dependent de microtúbuls de grànul de secreció cap a la membrana plasmàtica; i el segon, és el *docking* i la fusió amb la membrana plasmàtica alliberant el seu contingut a l'exterior. Mentre que les proteïnes SNAREs s'han relacionat amb el *docking* i la fusió, les Rab GTPases s'han descrit com a reguladors importants del procés d'exocitosi.

#### 4.3.1. Proteïnes de transport

Les vesícules, un cop formades a la TGN, són transportades als llocs de secreció de la membrana plasmàtica mitjançant un sistema de transport basat en microtúbuls que requereix la presència d'adaptadors, com la dinactina o la proteïna-1 associada a hungtintina, per facilitar la subjecció de la vesícula als microtúbuls. Generalment, tots els tipus de vesícula usen les mateixes proteïnes motores, la cinesina per al transport anterògrad i la dineïna per al transport retrògrad. Estudis recents indiquen que la cua citosòlica de CPE, present en els grànuls de secreció, pot interaccionar directament amb la dinactina (Park *et al.*, 2008) que recluta les proteïnes motores cinesina-2 i -3 (KIF3 i KIF1A).

Al final del transport basat en microtúbuls, les vesícules són transferides a l'esquelet d'actina pròxim a la membrana plasmàtica. S'ha proposat que miosina V és la responsable de transferir les vesícules dels microtúbuls a l'actina interaccionant directament amb les proteïnes motores (Park i Loh, 2008).

#### 4.3.2. Rab GTPases

Formen la família més gran de GTPases, en humans se n'han identificat més de 60, i tenen com a funció actuar com a interruptors moleculars ja que alternen dos estats conformacionals: el GTP actiu i el GDP inactiu. Estan associades de forma reversible amb les membranes a través de grups hidrofòbics geranilgeranil que estan ancorats a un o dos residus de cisteïna carboxiterminals i això els permet realitzar la seva funció de regular el tràfic de membranes.

Les Rab GTPases controlen la dinàmica intracel·lular de les vesícules, des de la formació de la vesícula ja que capten receptors per a la nova vesícula i en modifiquen la composició de la coberta, fins a participar en el *tethering* de les vesícules interaccionant amb els factors de lligació que a la vegada interaccionen amb les SNAREs i els seus reguladors per activar la formació del complex SNARE, que produeix la fusió de membranes. Respecte al seu paper com a moduladors del transport, les proteïnes Rab s'uneixen a les proteïnes motores com les

miosines, les cinesines i les dineïnes, on actuen com a unió entre les proteïnes de càrrega i el citoesquelet.

Després de la fusió de membranes i l'exocitosi, la Rab GTPasa es converteix en la forma inactiva unida a GDP a través de la hidròlisi del GTP que és estimulada per la proteïna activadora GTPasa (GAP)(Stenmark, 2009).

#### 4.3.3. Proteïnes SNAREs

Les vesícules un cop situades a prop de la membrana diana, s'han d'acoblar amb la membrana amb un complex format principalment per les proteïnes munc18 i syntaxines, encara que altres proteïnes també intervenen en la regulació d'aquest procés com unc13, CAPS, RIM2 $\alpha$  i Rab3 (Verhage i Sorensen, 2008).

Un cop acoblades, les vesícules s'han de fusionar amb la membrana, un procés realitzat per les proteïnes de la família SNARE (*soluble-N-ethylmaleimide-sensitive-factor accessory-protein [SNAP] receptor*). Les proteïnes SNARE es troben en totes les cèl·lules eucariotes, amb els seus membres distribuïts per totes les membranes i implicats a cada pas de la fusió de membranes del tràfic intracel·lular. Es coneixen 38 membres de la família de les proteïnes SNARE (Taula 3). Cada cèl·lula expressa diferents combinacions que són selectivament distribuïdes en orgànuls i dominis de membrana. L'aparellament selectiu de les proteïnes SNARE restringeix el tràfic i la fusió de membranes entre els orgànuls o amb la membrana plasmàtica (Jahn i Scheller, 2006).

#### MEMBRES DE LA FAMÍLIA SNARE ACTUALMENT IDENTIFICATS

Qa. Syntaxina 1 (Stx1), Stx2, Stx3, Stx4, Stx5, Stx7, Stx11, Stx13, Stx16, Stx17 i Stx18.

Qb. GS27 (SNARE de l'aparell de Golgi de 27 kDa), GS28, Vti1a (interacció de la vesícula de transport amb l'homòleg de la t-SNARE 1a) i Vti1b.

Qc. Stx6, Stx8 i Stx10, GS15, BET1 i SLT1 (SNARE-like tail-anchored protein)

Qb,c. SNAP23, SNAP25, SNAP29 i SNAP47.

R. VAMP1 (proteïna associada a la membrana de la vesícula), VAMP2, VAMP3, VAMP4, VAMP5, VAMP7, VAMP8, ERS24 (SEC22b) i YKT6.

Sense classificació. D12, SEC20, SEC22a i SEC22c.

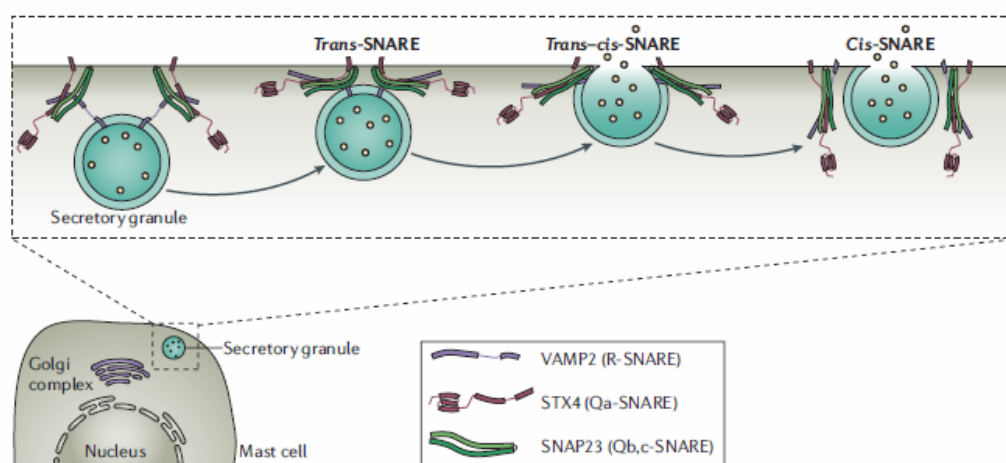
TAULA 3. Classificació dels membres de la família SNARE.

La hipòtesi SNARE manté que la proteïna SNARE de la membrana donant s'uneix a la proteïna SNARE de la membrana diana en una unió (*trans-SNARE complex*) que de forma transitòria uneix les dues membranes (Rothman, 1994). Els membres de la família SNARE es

caracteritzen per la presència del domini conservat *SNARE motif*, que mitjança la interacció entre les proteïnes SNARE. La majoria són proteïnes transmembrana amb un domini hidrofòbic caboxi-terminal. Originalment es classificaven en v- (associades a la vesícula) o t- (associades a la membrana) SNARE, en funció de la seva localització. Malgrat això, actualment ha canviat la terminologia i es classifiquen en R-SNAREs (generalment presents a la vesícula) i Q-SNAREs (generalment presents a la membrana), segons si el residu funcional del *SNARE motif* és una arginina (R) o glutamina (Q) (Fasshauser *et al.*, 1998).

Les R-SNARE (com les VAMPs) tenen un únic domini transmembrana que aporta un únic *SNARE motif* per a la formació del complex trans-SNARE. Les Q-SNAREs es subclassifiquen en Qa-, Qb-, Qc i Qb,c- segons la posició del *SNARE motif* en el complex SNARE agrupat. Les Q-SNARE funcionen com un complex que està format per 2 o 3 proteïnes que proporcionen 3 *SNARE motifs* al complex trans-SNARE. La majoria de les Q-SNAREs tenen un únic *SNARE motif*, però les Qb,c (SNAP23, SNAP25, SNAP29 i SNAP47), que són proteïnes que no tenen el domini transmembrana, contenen dos *SNARE motifs*.

La interacció d'R- i Q-SNAREs en el complex trans-SNARE transitori, que està format per la unió de les hèlix alfa dels dominis citoplasmàtics de les SNAREs, serveix per ajuntar les membranes ja que genera la força necessària per fusionar les bicapes lipídiques (Figura 14). Un cop s'ha produït la fusió, la membrana de la vesícula està en continu amb la membrana diana, i forma de forma transitòria el complex cis-SNARE. Després de la fusió s'han de desacoblar ràpidament, perquè els components puguin ser reciclats per altres fusions de membrana. El desacoblament del complex cis-SNARE és mitjançat per un complex soluble que conté l'ATPasa NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) i  $\alpha$ -SNAP (Malsam *et al.*, 2008).



**FIGURA 14.** Exemple funcional de la fusió de grànuls mitjançada per proteïnes SNARE. Aquesta figura mostra un exemple de la fusió d'un grànel en un mastòcit. El mecanisme de fusió és igual en totes les cèl·lules, però les proteïnes SNAREs que intervenen són diferents. En aquest exemple, el complex Q-SNARE de la membrana plasmàtica (format per la Qb,c- SNARE SNAP23 i la Qa- SNARE Stx4) forma el complex trans-SNARE amb la R-

SNARE VAMP2 del grànul. El complex trans-SNARE dirigeix la fusió entre les dues membranes i la secreció del contingut del grànul. El complex post-fusió, abans del desacoblament, es coneix com a complex cis-SNARE (Extret de Stow *et al.*, 2006).

Els membres de la família Sec1/Munc18 s'uneixen directament als dominis amino-terminals de les syntaxines i estan posicionats de manera que poden regular (de forma positiva o negativa) la capacitat d'aquestes Q-SNARE per formar el complex trans-SNARE. Aquestes proteïnes també poden tenir altres funcions com regular l'estabilitat i el recanvi de les proteïnes SNARE. A la majoria de cèl·lules de mamífers, aquestes proteïnes estan associades a la membrana plasmàtica, a l'aparell de Golgi i als endosomes per regular l'activitat de les SNAREs en aquestes localitzacions. A més, també l'organització espacial de les SNAREs i de les Sec/Munc-like controla la seva funció. Els dominis de membrana rics en colesterol regulen la interacció de les proteïnes Q-SNAREs, separant-les de les proteïnes Sec/Munc-like. Altres proteïnes que s'uneixen a les proteïnes SNARE poden actuar com a moduladors de la seva funció, com Munc13, el seu homòleg en cèl·lules endocrines CAPS (*calcium-activated protein for secretion*) i la proteïna RIM que afavoreixen la formació del complex SNARE. Les proteïnes que regulen la secreció varien segons el tipus cel·lular, com per exemple la sinaptotagmina 1 (un sensor de calci) i la tomosina (també coneguda com a Stxbp5) en cèl·lules neuronals.

## 5. Secreció en els astròcits

L'existència d'un sistema de comunicació basat en l'alliberació de mitjancers químics entre els astròcits i altres cèl·lules neuronals va ser hipotetitzat a finals dels anys 80 per l'observació que les cèl·lules glials contenien, sintetitzaven i alliberaven gran varietat de substàncies.

Actualment està acceptat que els astròcits són cèl·lules secretores que alliberen diferents transmissors químics com: aminoàcids excitadors i inhibidors (glutamat, aspartat, D-serina, àcid homocisteic, àcid quinolínic, GABA, glicina, taurina, etc); altres neurotransmissors clàssics (acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina, histamina, etc); ATP i nucleòtids i nucleòsids relacionats (nucleòtids de purina, ATP, GTP, i els seus derivats di- i mono-fosfat, adenosina, guanosina, UTP); eicosanoids i altres mitjancers lipídics (productes de la ciclooxigenasa (COX), prostaglandines (PGs), productes de la lipooxigenasa (LOX), productes de la epooxigenasa (EPOX)); neuropèptids (proencefalina, angiotensinògen, endotelines); neurotrofines (factor de creixement neural (NGF), neurotrofina- 3, factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF)); citocines (interleucines (IL), interferons (IFN), factors de necrosi tumoral (TNF)) i factors de creixement i quimiocines.

Diversos estudis han intentat descriure el "secretoma" d'aquestes cèl·lules mitjançant diferents aproximacions experimentals, tant en condicions basals (Dowell *et al.*, 2009; Greco *et al.*, 2010) com en resposta al tractament amb citocines inflamatòries (Keene *et al.*, 2009) o a l'estimulació colinèrgica (Moore *et al.*, 2008). En l'estudi més recent, es van identificar més de mig miler de proteïnes, de les quals un 20% tenien el pèptid senyal a l'extrem N-terminal i estaven enriquides més de 1,5 vegades en el medi dels astròcits.

### 5.1. Mecanismes de secreció en astròcits

Els mecanismes moleculars responsables de l'alliberació dels gliotransmissors encara no estan del tot clars. La majoria d'evidències indiquen que l'alliberació de gliotransmissors es produeix per un mecanisme depenent de calci i de proteïnes SNARE a través de l'exocitosi de vesícules i lisosomes (Perea i Araque, 2010).

Durant els últims anys, els estudis s'han centrat en descriure els mecanismes d'alliberació d'aminoàcids per part dels astròcits, sobretot pel glutamat, pel qual s'han descrit fins a 6 mecanismes diferents d'alliberació (Malarkey i Parpura, 2008). Tots aquests no són mútuament exclusius i poden coexistir (Perea i Araque, 2010).

### 5.1.1. Secreció no exocítica en astròcits

Malgrat que s'han descrit diferents mecanismes per l'alliberació de glutamat tant a través de canals, com l'obertura dels canals iònics induïts per volum, la secreció per connexons i hemicanals o mitjançant receptors purinèrgics ionotròpics; com a través de transportadors com el funcionament invers dels transportadors de glutamat o l'intercanviador de cistina-glutamat. Encara falta determinar si aquests mecanismes succeeixen en condicions fisiològiques o només en determinades condicions patològiques com en l'infart o la isquèmia o requereixen condicions especials com l'inflament de les cèl·lules o baixes concentracions extracel·lulars de calci (Figura 15).

#### i. Canals aniònics depenent de volum (*Swelling-activated anion channels*)

El treball pioner del grup de Kimelberg va establir que quan els astròcits en cultiu s'inflen, simulant un edema cerebral, alliberen glutamat, aspartat i taurina a través dels canals aniònics regulats per volum (VRAC) (Kimelberg *et al.*, 1990), però no s'ha demostrat l'alliberació de glutamat a través d'aquests canals en condicions no patològiques. Tanmateix, algunes substàncies com l'ATP o l'òxid nítric poden actuar sobre els VRACs amplificant l'alliberació d'aminoàcids en una lleugera hipo-osmolaritat que pot ser que succeeixi *in vivo*. L'ATP mitjançant la unió a receptors pot augmentar els nivells de calci intracel·lular provocant un lleuger inflament transitori de la cèl·lula seguida de l'alliberació de glutamat pels VRACs (Takano *et al.*, 2005).

#### ii. Funcionament invers dels transportadors de glutamat

Els transportadors de glutamat són una família de proteïnes situades a la membrana plasmàtica dels astròcits i de les neurones que tenen la funció específica de retirar el glutamat de l'espai extracel·lular. Per cada cicle de transport, juntament amb una molècula de glutamat, co-transporta 3 Na<sup>+</sup> i 1 H<sup>+</sup> i treu 1 K<sup>+</sup>. Encara que no sembla que succeeixi en la funció cerebral normal, en condicions patològiques com en la isquèmia on hi ha uns nivells extracel·lulars de K<sup>+</sup> elevats, aquests transportadors poden funcionar de forma inversa i alliberar glutamat (Szatkowsky *et al.*, 1990). Aquest transport invers del glutamat acaba provocant la mort dels astròcits, no per l'augment dels nivells de glutamat a l'espai extracel·lular, sinó per la depleció del glutatió citoplasmàtic causat per la disminució dels glutamat a l'interior de la cèl·lula que provoca un augment de l'estrès oxidatiu.

### iii. Intercanviadors de cistina- glutamat

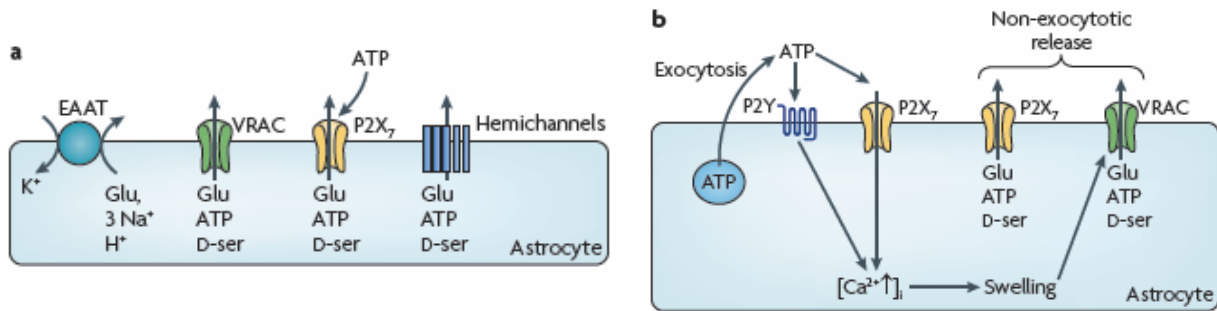
Són uns transportadors d'aminoàcids independents de Na<sup>+</sup> i dependents de Cl<sup>-</sup> que intercanvien la cistina extracel·lular amb el glutamat intracel·lular amb una estequiometria 1:1 (Banai, 1986; Reichelt *et al.*, 1997). Aquest transportador és el responsable de l'acumulació de la cistina necessària per la síntesi de glutatió, un dels principals antioxidants endògens, i a més, proporciona una via d'alliberació de glutamat (War *et al.*, 1999). Aquesta alliberació de glutamat està relacionada amb la modulació de la transmissió sinàptica i l'expressió del comportament animal relacionat amb l'addicció (Parpura i Zorec, 2010).

### iv. Hemicanals gap junctions

Les unions tipus gap són porus formats per la unió de dos connexons (hemicanals) situats de forma juxtaposada en les membranes de dues cèl·lules adjacents que connecten el seu citoplasma i permeten el pas de molècules de fins a 1 kDa. Els connexons desaparellats poden actuar com a hemicanals funcionals permetent la difusió de molècules des del citoplasma cap a l'espai extracel·lular. Els hemicanals formats per conexines (Cx43 en astròcits) poden alliberar glutamat a l'espai extracel·lular quan hi ha una baixa concentració de cations divalents a l'espai extracel·lular, però falta determinar si això també succeeix en condicions fisiològiques. En canvi, les panexines són insensibles a les concentracions extracel·lulars de calci i poden alliberar glutamat si es produeix un augment de calci intracel·lular a nivells que es solen observar en els astròcits (Ye *et al.*, 2003).

### v. Receptors P2X<sub>7</sub>

Els receptors P2X són uns canals de membrana plasmàtica que s'activen per la unió amb l'ATP i són permeables a cations mono i divalents. Es coneixen 7 tipus de subunitats del receptor P2X que es poden agrupar per formar canals homomèris o heteromèrics. En moltes cèl·lules, si hi ha una estimulació mantinguda, el porus aquós es dilata fins a permetre el pas de molècules grans independentment de la seva càrrega. Quan l'ATP activa el receptor P2X<sub>7</sub>, s'obre un porus que és permeable a l'ATP i al glutamat. L'activació d'aquest canal en astròcits en cultiu i *in vivo* proporciona una ruta no exocítica per l'alliberació d'ATP, glutamat i probablement D-serina (Duan *et al.*, 2003). En condicions patològiques on es produeix una activació prolongada dels canals P2X<sub>7</sub> pot conduir a l'alliberació de proteïnes citosòliques i a la mort cel·lular.



**FIGURA 15. Mecanismes d'exocitosis de neurotransmissors no exocítica i híbrida. A)** L'alliberació no-exocítica de neurotransmissors es pot produir per funcionament revers dels transportadors de membrana de glutamat (EAAT) o per sortida a través dels canals aniónics reguladors de volum (VRACs), pels canals dels receptors purinèrgic P2X<sub>7</sub> activats per ATP o pels hemicanals formats per connexines o panexines (aquests 3 últims casos són tant per glutamat com per ATP i D-serina). **B)** El mecanisme d'alliberació híbrida es produeix quan l'ATP alliberat per exocitosis activa els receptors P2Y i P2X<sub>7</sub>; això permet la sortida no-exocítica de neurotransmissors a través del receptor P2X<sub>7</sub> i els VRACs. Els VRACs s'activen per l'augment de la turgència cel·lular produïda per l'augment de la concentració intracel·lular de calci generada pels receptors P2Y i P2X<sub>7</sub> (Extret de Hamilton i Attwell, 2010).

En conclusió, algunes evidències suggereixen que part de la gliotransmissió es produeix a través de canals i transportadors, malgrat això alguns d'aquests processos han de ser aclarits. A més, s'ha de determinar si aquests mecanismes succeeixen en condicions fisiològiques i com són de rellevants, ja que es desconeixen els mecanismes de la seva especificitat i regulació.

### 5.1.2. Exocitosis en astròcits

Com ja hem dit anteriorment, dins dels gliotransmissors, el glutamat és el més estudiat. L'any 1994 en un treball de Parpura i col·laboradors (Parpura *et al.*, 1994) es va descriure per primera vegada un mecanisme depenent de calci per l'alliberació de glutamat en astròcits en cultiu. Aquesta ràpida alliberació de glutamat era mitjançada per l'activació de receptors per lligands endògens i depenia dels nivells de calci intracel·lular.

L'augment dels nivells de calci intracel·lular és necessari i suficient per provocar l'alliberació de glutamat dels astròcits. El tractament amb ionomicina, en presència de calci extracel·lular lliure, estimula l'alliberació de glutamat. En canvi, aquesta estimulació no es produeix si hi ha uns nivells extracel·lulars baixos de calci, si el calci citoplasmàtic està quelat amb el BAPTA (*1,2-bis(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) o si s'han reduït els dipòsits interns de calci pel tractament amb tapsigargina. De manera que el calci prové de dues fonts diferents, principalment dels dipòsits de calci intracel·lulars, però també de l'entrada del calci extracel·lular.



En estudis posteriors s'ha descrit que aquesta alliberació és sensible a inhibidors de l'exocitosi neuronal com les toxines clostridials (la neurotoxina tetànica (TeNT) i els set tipus de neurotoxines botulíniques (BoNT A-G)) (Jourdain *et al.*, 2007; Perea i Araque, 2007), per tant, els astròcits expressen les proteïnes SNAREs que són la diana d'aquestes toxines (Montana *et al.*, 2006). Aquesta alliberació també és sensible a la bafilomicina A1 (Baf A1) un bloquejant de la H<sup>+</sup>-ATPasa vesicular que produeix l'alcalinització del lumen vesicular evitant el gradient de protons necessari perquè els transportadors de glutamat (VGLUTs) l'introdueixin dins de les vesícules.

Aquestes vesícules són transportades al llarg del citoesquelet. Aquest transport és modulad per la dinàmica dels diferents filaments, les diferents proteïnes motores i és controlat per diferents molècules de senyalització. A més dels microtúbuls i els filaments d'actina, els astròcits també expressen filaments intermedis: GFAP, vimentina, nestina i sinemina, aquests dos últims només s'expressen en astròcits reactius. Pel transport ràpid a llarga distància s'usen preferentment els microtúbuls, encara que la resta de filaments també tenen un paper fonamental (Potokar *et al.*, 2011).

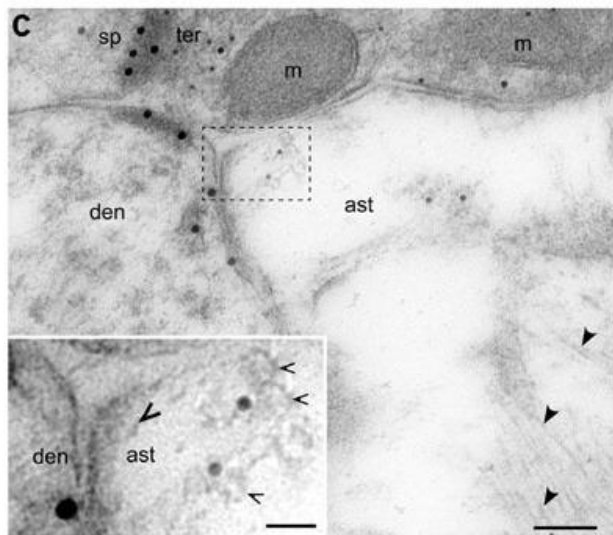
Tots aquests estudis suggereixen l'existència d'una alliberació vesicular regulada per calci en astròcits, no només pel glutamat (Bezzi *et al.*, 2004) sinó també per altres neurotransmissors com la D-serina (Mothet, 2005; Martineau *et al.*, 2008), l'ATP (Coco *et al.*, 2003; Pangrsic *et al.*, 2007), i pèptids com el ANP (Krzan *et al.*, 2003), el BDNF (Bergami *et al.*, 2008; Jean *et al.*, 2008) i el neuropèptid Y (NPY) (Ramamoorthy i Whim, 2008), i que poden ser alliberats mitjançant una exocitosi regulada depenent de calci.

Malgrat totes aquestes evidències, les dades disponibles no proporcionen una descripció completa dels processos d'exocitosi en astròcits. Per això, l'existència d'una via d'exocitosi regulada en aquestes cèl·lules encara s'està debatint.

A més, s'ha descrit certa heterogeneïtat en les vies de secreció dels astròcits ja que s'han proposat diferents orgànuls com els responsables de l'exocitosi dels gliotransmissors. En astròcits es troben dos tipus de vesícules secretores: les vesícules petites similars a les sinàptiques (*synaptic-like microvesicle*: SLMVs) i grànuls densos (*large dense-core vesicles*: LDCV). Sempre s'ha pensat que les SLMVs emmagatzemaven molècules petites i s'alliberaven de forma regulada, participant en la comunicació glia-neurona. Malgrat això, els LDCV contenen una gran varietat tant de molècules petites com grans que tenen importància en la comunicació cèl·lula- cèl·lula (Hur *et al.*, 2010). A més, en els astròcits també trobem lisosomes secretors. La majoria dels estudis no distingien entre les diferents poblacions d'orgànuls secretors, per tant, la descripció de la secreció en aquestes cèl·lules potser que no sigui molt acurada hi hagi una barreja de la contribució dels diferents orgànuls.

### i. Microvesícules similars a les sinàptiques (SLMVs)

Està ben establert per microscòpia electrònica que en les prolongacions dels astròcits es troben petites vesícules (d'uns 30 nm de diàmetre) rodones i clares que recorden a les vesícules sinàptiques dels terminals nerviosos i a les vesícules petites de les cèl·lules neuroendocrines (Bezzi *et al.*, 2004). És per això que reben el nom de microvesícules similars a les sinàptiques (*synaptic-like microvesicle*: SLMVs). Aquestes microvesícules no estan concentrades com les vesícules sinàptiques en les neurones, sinó que formen petits grups localitzats a 100 nm de la membrana plasmàtica per proporcionar una exocitosi ràpida. Aquests grups es localitzen en la membrana dels astròcits propera als terminals pre-sinàptics que expressen els receptors de glutamat tipus NMDA (Jourdain *et al.*, 2007) (Figura 16).



**FIGURA 16.** Les SLMVs es situen en els terminals dels astròcits pròxims a les membranes neuronals que contenen receptors NMDA. Doble marcatge amb partícules d'or per VGLUT1 (partícules d'or petites) i pels receptors NMDA (partícules d'or grans). La membrana plasmàtica dels astròcits és molt propera als receptors NMDA localitzats a la densitat post-sinàptica de 2 sinapsis formades per un terminal que conté VGLUT1 (ter) i la membrana de la dendrita. A l'insert veiem amb més magnificació la petita distància entre les vesícules de l'astròcit VGLUT1 positives i els receptors NMDA extrasinàptics de la dendrita. Escala: 100 nm i 50 nm a l'insert (Extret de Bezzi *et al.*, 2004)

Aquestes vesícules contenen totes les proteïnes necessàries per introduir el glutamat en el seu interior. Els astròcits expressen l'ATPasa vacuolar  $H^+$  (V-ATPasa) que introdueix protons a dins del lumen vesicular per generar el gradient necessari de la concentració de protons per introduir el glutamat. També expressen les tres isoformes conegudes dels transportadors de glutamat VGLUTs: 1, 2 i 3, que usen el gradient de protons creat per la V-ATPasa per concentrar el glutamat dins de les vesícules (Bezzi *et al.*, 2004).

La D-serina, un potent co-agonista del glutamat en els receptors NMDA que s'uneix al lloc d'unió a la glicina, s'ha descrit que co-localitza amb marcadors de les SLMVs, i podria, per tant, ser alliberat per les mateixes vesícules responsables de l'alliberació de glutamat, produint una activació realment efectiva dels NMDARs (Martineau *et al.*, 2008). Està descrit que la D-serina s'emmagatzema a les vesícules després de la seva formació a l'aparell de Golgi; malgrat això, es desconeix la identitat del transportador vesicular de la D-serina (Parpura i Zorec, 2010).

En l'exocitosi d'aquestes vesícules coexisteix la fusió completa de la vesícula, en que s'allibera tot el contingut a l'espai extracel·lular i la fusió tipus *kiss and run*. Aquest últim tipus de fusió, els astròcits la presenten exclusivament en resposta a l'estimulació fisiològica; a cada exocitosi només s'allibera una fracció del contingut total de la vesícula (<10%), permetent diversos cicles d'exocitosi sense recarregar la vesícula; cada cicle d'exocitosi només és una alliberació, no múltiples com en les cèl·lules cromafins; i la latència de l'endocitosi induïda per l'estímul és 4 vegades més lenta en els astròcits que en les cèl·lules cromafins (Chen *et al.*, 2006).

## ii. Grànuls densos (LDCV)

Contràriament als aminoàcids i a l'ATP, que són introduïts a les vesícules per transportadors de membrana, els gliotransmissors entren a les vesícules a través de la via de la secreció regulada. Els pro-peptíds es sintetitzen al reticle endoplasmàtic (ER), passen a l'aparell de Golgi des d'on es formen les vesícules on són concentrats i classificats en orgànuls, on són processats abans de ser alliberats (Parpura i Zorec, 2010). Aquestes vesícules que transporten transmissors peptídics tenen una aparença morfològica diferent al microscopi electrònic: grànuls densos (*large dense-core vesicles*: LDCV), que són menys abundants que les SLMVs ( hi ha generalment 0-4 grànuls densos cada 6  $\mu\text{m}^2$  d'astròcits) i que es troben majoritàriament al voltant de l'aparell de Golgi i també en les prolongacions. Aquests grànuls tenen un diàmetre de 300- 400 nm, encara que no és estrany trobar-ne de diàmetre superior a 400 nm. A més, és freqüent trobar grànuls que no tenen l'interior tan electrodens o que hi ha unes parts de l'interior del grànul que són menys electrodenses que altres, això és degut a que recentment han endocitat una vesícula o que està en procés de maduració (Hur *et al.*, 2010).

Les cromogranines i les secretogranines són marcadors proteics que identifiquen els grànuls de secreció. En els astròcits, la cromogranina A i B i la secretogranina II es localitzen exclusivament en els LDCV (Figura 17). A més, aquestes proteïnes tenen una alta capacitat i una baixa afinitat per emmagatzemar el calci, unint 30- 93 mols de calci/ mols de proteïna amb una constant de dissociació (Kd) de 1.5-4.0 mM, permetent als grànuls emmagatzemar fins a 40 mM de calci, la concentració de calci més gran en qualsevol orgànul subcel·lular. Aquestes proteïnes també són alliberades juntament amb el contingut dels grànuls en resposta a un estímul que augmenti les concentracions intracel·lulars de calci (Hur *et al.*, 2010).

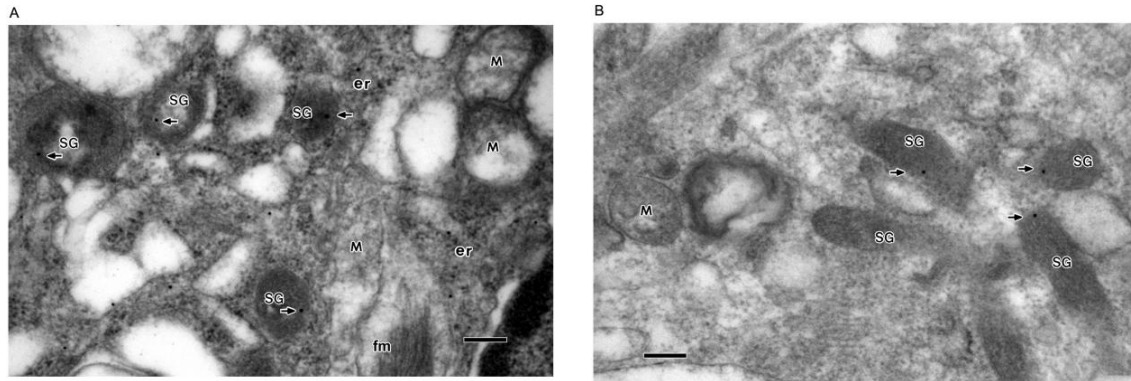


FIGURA 17. Microscopia electrònica on es mostra la localització de CGB i SgII en vesícules similars als grànuls de secreció (grànuls densos) en astròcits en teixit. Els astròcits en teixit cerebral humà van ser marcats amb anticossos contra CGB (A) i contra SgII (B). Les partícules d'or (indicades per fletxes) es localitzaven principalment en vesícules similars als grànuls de secreció (SG) i parçilament al reticle endoplasmàtic (er), però no a la mitocondria (M). Escala: 200 nm (Extret de Hur *et al.*, 2010).

Diversos estudis suggereixen que l'ATP també s'allibera juntament amb els pèptids dels grànuls densos (Coco *et al.*, 2003; Pangrsic *et al.*, 2007). La proteïna responsable de l'acumulació d'ATP s'ha identificat recentment com SLC17A9 i s'ha localitzat en astròcits (revisat a Parpura i Zorec, 2010)

Les vesícules secretores també poden transportar proteïnes associades a la membrana. El transport de proteïnes de senyalització, receptors i transportadors a la membrana plasmàtica és d'especial interès per les interaccions dels astròcits amb altres tipus cel·lulars, com per exemple, la inserció a la membrana del transportador d'aminoàcids excitadors EAAT2 o GLT-1 (Stenovec *et al.*, 2008) i el receptor de cannabinoides associat a proteïna G 1 (CB1R) (Osborne *et al.*, 2009)

### iii. Lisosomes

En determinades condicions experimentals, es pot detectar l'exocitosi de l'ATP emmagatzemat als lisosomes, ja que col·localitza amb diferents marcadors de lisosomes com són LAMP-1 i el CD63 (Zhang *et al.*, 2007). Dos estudis més confirmen que en els astròcits orgànuls semblants als lisosomes poden actuar com a vesícules de secreció i alliberar de forma dependent de calci (Jaiswal *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

L'ATP i el glutamat indueixen una fusió tipus *Kiss and run* dels lisosomes ja que produeixen un augment dels nivells de calci citoplasmàtic. A més a més, els lisosomes es poden fusionar amb la membrana plasmàtica per a reparar-la o com a resposta a una lesió de la membrana, alliberant no només ATP sinó també enzims lisosomals i altres molècules de senyalització que poden participar a la senyalització intracel·lular. De manera que l'exocitosi

regulada dels lisosomes pot tenir una funció important en la comunicació cèl·lula- cèl·lula tant en condicions fisiològiques com patològiques.

El mecanisme mitjançant el qual es produeix l'acumulació de l'ATP dins del lisosoma no és del tot clar. Com l'ATP està carregat negativament, l'activitat de la bomba de protons manté el potencial de membrana necessari perquè el transportador de nucleòtids introdueix l'ATP. També els transportadors ABC (*ATP-binding cassette*) i les proteïnes multiresistents a drogues (*multidrug resistant proteins*) que poden introduir ATP, estan presents a la membrana dels lisosomes.

A més, s'ha descrit que compartiments membranosos dels astròcits marcats amb marcadors de endosomes tardans i lisosomes presenten el transportador d'aspartat sialina, suggerint que aquestes orgànuls poden exocitar aspartat (Li *et al.*, 2008).

**OBJECTIUS**

---



En els últims anys, diversos treballs han demostrat que els astròcits participen activament en el desenvolupament i plasticitat del SNC, així com en la modulació de la neurotransmissió (Araque *et al.*, 2001; Auld i Robitaille, 2003; Slezak i Pfriederger, 2003; Christopherson *et al.*, 2005).

Característicament, la majoria de les accions descrites dels astròcits sobre la fisiologia i la patologia neuronal són mitjançades per secreció vesicular (Araque *et al.*, 2001). Recentment, s'ha donat una especial rellevància a la secreció glial regulada pel calci.

### **Objectiu general:**

Estudiar els components moleculars i els mecanismes implicats en les vies de secreció de cèl·lules astroglials.

### **Objectius concrets:**

1. Obtenció d'un fenotip astrogliat diferenciat en cultiu competent per a realitzar estudis de secreció regulada de pèptids.
2. Analitzar proteïnes exocítiques astroglials, la regulació de la seva expressió i la seva implicació en la secreció regulada.
3. Identificació i anàlisi de nous components moleculars de la via de secreció regulada de pèptids en astròcits.





**RESULTATS**

---



## CAPÍTOL I

### La senyalització per AMP cíclic reprimeix l'activació i promou la maduració en els astròcits

Sonia Paco<sup>1</sup>, Manuela Hummel<sup>2</sup>, Virginia Pla<sup>1</sup>, Lauro Sumoy<sup>3</sup>, Fernando Aguado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain. <sup>2</sup> Centre for Genomic Regulation, Barcelona E-08003, Spain, <sup>3</sup> Institute for Predictive and Personalized Medicine of Cancer, Badalona E-08916, Spain

En preparació

#### Resum

La senyalització per AMPc produeix canvis dramàtics a la morfologia i a la fisiologia dels astròcits. Malgrat això, la seva implicació en l'adquisició del fenotip i els mecanismes transcripcionals implicats no es coneixen.

En aquest treball analitzem el transcriptoma global d'astròcits en cultiu tractats amb anàlegs del AMPc. Un gran volum de transcrits, que corresponen a 6296 gens anotats, van ser regulats de forma diferencial per la via del AMPc. Els anàlegs del AMPc augmenten l'expressió dels gens involucrats tradicionalment en les funcions dels astròcits madurs, com són el control homeostàtic, el suport metabòlic i estructural a les neurones, l'activitat antioxidant i la comunicació; mentre que disminuïa considerablement l'expressió de transcrits relacionats amb la proliferació i la immaduresa. A més a més, els gens típicament activats en els astròcits reactius com els mediadors de la resposta immunològica i els components de la cicatriu, estan reprimits pel AMPc. Els anàlisis d'enriquiment de grups gènics (GSEA) i l'avaluació *in situ* de l'expressió gènica dels astròcits en diferents estats mostra que la senyalització per AMPc confereix un perfil transcripcional madur i semblant a *in vivo* als astròcits en cultiu.

Aquests resultats mostren que la senyalització per AMPc és una via clau per restringir les característiques d'immaduresa i activació astrogial promovent la seva maduració.



## CYCLIC AMP SIGNALING REPRESSES ACTIVATION AND PROMOTES MATURATION IN ASTROCYTES

Sonia Paco<sup>1</sup>, Manuela Hummel<sup>2</sup>, Virginia Pla<sup>1</sup>, Lauro Sumoy<sup>3</sup>, and Fernando Aguado<sup>1</sup>

From Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain<sup>1</sup>, Centre for Genomic Regulation, Barcelona E-08003, Spain<sup>2</sup>, Institute for Predictive and Personalized Medicine of Cancer, Badalona E-08916, Spain<sup>3</sup>

### ABSTRACT

cAMP signaling produces dramatic changes in astrocyte morphology and physiology. However, its involvement in phenotype acquisition and the transcriptionally mediated mechanisms of action are largely unknown. Here we analyzed the global transcriptome of cultured astroglial cells incubated with activators of cAMP pathways. A bulk of astroglial transcripts, 6,296 annotated genes, were differentially regulated by cAMP signaling. cAMP analogs strongly upregulated genes involved in typical functions of mature astrocytes, such as homeostatic control, metabolic and structural support to neurons, antioxidant defense and communication, whereas they downregulated a considerable number of proliferating and immaturity-related transcripts. Moreover, genes typically activated in reactive cells, such as immunological mediators and scar components, were repressed by cAMP. Gene Set Enrichment Analysis and evaluation *in situ* of gene expression in astrocytes in different states showed that cAMP signaling conferred a mature and *in vivo*-like transcriptional profile to cultured astrocytes. These results indicate that cAMP signaling is a key pathway restricting developmental and activation features of astrocytes and promoting their maturation. A positive modulation of cAMP signaling is suggested to suppress the mechanisms of activation driven by pathological situations and to promote the physiologically normal state of differentiated astrocytes.

### INTRODUCTION

Mature astrocytes ensheath synapses and fine blood vessels, within the neuro-glio-vascular units, to shape the functional micro-architecture of the central nervous system (CNS). Through an array of transporters, ion channels and released and adhesion molecules, astrocytes play key roles in the regulation of extracellular fluid homeostasis, integrity of the blood-brain barrier and assurance of metabolic demand and antioxidant defense of neurons [1,2]. Astrocytes also make a crucial contribution to communication, operating within glial networks through gap junctions and hemichannels and bidirectionally with neurons and

endothelial cells via diffusible and surface molecules [3-5]. Characteristically, in response to CNS insults, such as trauma, epilepsy or degenerative diseases, astrocytes become reactive and play a critical role in neuroinflammation and scar formation [6,7].

In contrast to neurons, little is known about the intracellular signaling of astrocytes, and the pathways controlling their differentiation and activation have not been elucidated. By means of STAT transcription factors, cytokines of the interleukin-6 family are key cues in the specification and differentiation of astroglial cells. Moreover, Smad transcription factors activated by bone morphogenetic proteins also promote astroglialogenesis, through their interaction with STAT3 [8]. Strikingly, analysis of glial activation in pro-inflammatory cytokine-administered and genetically-modified mice has shown that JAK-STAT3 signaling is also a key pathway through which astrocytes become reactive [9-11]. In addition to activating kinase-dependent receptors, G-protein coupled receptors can trigger astroglial genesis and maturation via cAMP [12-15]. Changes in cell morphology and protein expression induced by cAMP have long been considered a feature of astrocyte activation [16-19]. However, the precise significance of the cAMP pathway in the maturation and activation of these cells remains elusive. Here we studied the net impact of the cAMP signaling pathway on astrocytes by analyzing the global transcriptome of cultured cells incubated with permeable cAMP analogs. Moreover, we perform Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of cAMP-regulated genes and contrasted our findings with recent microarray reports and the *in vivo* expression patterns of astrocytes. Our findings indicate that cAMP signaling restricts developmental and activation features of astrocytes and promotes their maturation.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Animals-* OF1 mice were provided by Charles River Laboratories, Inc. (Lyon, France), kept under controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C), humidity (40–60%), and light (12-h cycles) and treated in accordance with the European Community Council Directive (86/609/EEC) on animal welfare. Under ketamine/xylazine anesthesia, stab wound lesions were made in the parietal cortex with a scalpel blade as described previously [20].

*Astrocyte cultures-* Cultures were prepared from the cerebral cortex of two-day-old mice [21]. Most cell culture reagents were obtained from GIBCO (Invitrogen, Paisley, UK). Briefly, the cerebral cortex was isolated and the meninges were carefully dissected out. Cortical tissues were then minced and incubated in 0.25% trypsin and 0.01% DNase. Dissociated cells were seeded in flasks and grown in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium and F-12 (1:1) containing 10% FBS, 10 mM HEPES and penicillin/streptomycin at 37°

C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. At confluence (days 10–12), the flasks were shaken overnight and the cells were rinsed, detached and subcultured onto poly-L-lysine-coated plastic culture dishes and coverslips. Treatment with 1mM 8Br-cAMP (Biolog, Life Science Institute, Bremen, Germany) was administered two day after subculturing and prolonged for 8 days to induce described morphological and physiological changes [12,13].

*RNA Extraction and Reverse Transcription-* RNA was isolated from triplicate cultures from the four individual experiments. Extractions were performed using using Trizol® Reagent (Invitrogen™) following the manufacturer's instructions. The quantity and quality of isolated RNAs were determined with a NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and a Bioanalyzer 2100 (Agilent, Waldbronn, Germany). The RNA integrity numbers (RIN) in all cases ranged from 8.7 to 10, thereby indicating minimal RNA degradation [22]. First-strand DNA was synthesized using the Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). 1 µg of total RNA was added to kit components and nuclease-free water to 20 µl. Reactions containing nuclease-free water instead of enzyme served as a negative control. Reactions were incubated at 25°C for 10 min, 50°C for 30 min, 85°C for 5 min. They were then chilled on ice. E.coli RNase H was added and incubated at 37°C for 20 min. The samples were then cooled to 4°C and finally stored at -20°C.

*Microarray Analysis-* RNA (500 ng) was labeled using Agilent's Low Input RNA Labeling Kit, which involves reverse transcribing the mRNA in the presence of T7-oligo-dT primer to produce cDNA and then *in vitro* transcribing with T7 RNA polymerase in the presence of Cy3-CTP or Cy5-CTP to produce labeled cRNA. The labeled cRNA was hybridized to the Agilent Mouse 4x44K 60-mer oligo microarray according to the manufacturer's protocol. The arrays were washed, dried by centrifugation and scanned on an Agilent G2565BA microarray scanner at 100% PMT and 5 µm resolution. Data were extracted using Genepix 6.0 (Molecular Devices) software using the irregular spot finding feature.

*Microarray Statistical Processing-* Log<sub>2</sub>ratio values were computed for all pairs of control and cAMP-stimulated samples. Per-probe log<sub>2</sub>ratios were aggregated to per-gene values by taking median values. Analysis for differential expression on a gene-by-gene basis was performed by limma [23] while distinguishing biological from technical replicates (dye-swap hybridizations). Correction for multiple testing was done using the False Discovery Rate (FDR) method. The lists of regulated genes were brought into biological context by Gene Ontology scoring using GSEA [24]. Also, for cross-study comparisons GSEA, was applied. This approach was used to test gene sets of interest (defined as lists of differentially expressed gene symbols derived from other studies) for significant enrichment among differentially



expressed genes within our study. Only studies performed on mouse from which astrocyte cultures were obtained and maintained under similar conditions to those in the present study were considered. To compare the gene sets by Venn diagrams, we fixed the same fold change cut-off at 1.5.

*Quantitative Real-Time PCR Analysis-* RT-qPCR was carried out using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) on an Applied 7700 machine, using the primers indicated in Supplementary Table 1, and following the manufacturer's protocol. A dilution series (100–10–3) of total cDNA was prepared to determine the standard curve (relative quantification). The samples (in triplicates) were amplified according to the following protocol: 10 min at 95 °C, 42 cycles: 15 s at 95 °C, 15 s annealing temperature (60°C), 30 s at 72 °C. To control the specificity of the reaction, melting-curve analysis was performed after amplification. In addition, PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis to confirm the size of the amplified targets. Levels of Tbp were used as normalization controls and relative mRNA levels were calculated as indicated by Pfaffl et al. [25].

*Western blotting-* Cultured cells were lysed in ice-cold 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 1% Triton-X 100 and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Samples were electrophoresed in 10% SDS-PAGE (BioRad) and then transferred to nitrocellulose membranes (Whatman® Schleicher & Schuell, Keene, NH). The membranes were blocked in a solution containing 5% non-fat milk powder in TBST (140 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4 and 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature and then incubated with primary antibodies (Supplementary Table 2) in blocking buffer for 2 h at room temperature. After several washes in blocking solution, the membranes were incubated for 1 h with HRP-conjugated secondary antibodies (DAKO, Glostrup, Denmark). Bound antibodies were visualized with enhanced chemiluminescence reagents PIERCE® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

*Immunocytochemistry-* Cells grown on glass coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. Adult and postnatal (P5) animals were perfused transcardially under deep anesthesia with the same fixative. Brains were removed from the skulls, postfixed for 4 h and cryoprotected overnight at 4 °C by immersion in a 30% sucrose solution. Forty-micrometer-thick frozen sections were obtained with a cryostat and collected in PBS. To suppress nonspecific binding, cell cultures and brain sections were incubated in PBS containing 10% FBS, 0.1% Triton X-100, 0.2% glycine, and 0.2% gelatin for 1 h at room temperature. Incubations with the primary antibodies (Supplementary Table 8) were carried

out overnight at 4 °C in PBS containing 1% FBS, 0.1% Triton X-100, and 0.2% gelatin. Cell cultures and brain sections were processed for immunofluorescence using secondary fluorochrome-conjugated antibodies (Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 568, Molecular Probes, Eugene, OR). Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes). Cell-containing coverslips and histological sections were mounted with Mowiol. Double immunofluorescences were performed by using primary antibodies raised in different species. Images were obtained with a Leica TCS SPE scanning confocal microscope. The specificity of the immunostaining was tested by omitting the primary antibodies or by replacing them with an equivalent concentration of nonspecific IgG. No immunostaining was observed in these conditions. Student's t-test was used for statistical evaluation and data were expressed as mean  $\pm$  SEM.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Genome-wide transcriptional regulation in astrocytes by cAMP signaling.*

To activate cAMP signaling we augmented intracellular levels by exposing cultured astrocytes to the permeable cAMP analog 8Br-cAMP. Before and after treatment cell cultures were essentially formed by astrocytes (>95% GFAP+ cells). Sustained elevated intracellular cAMP levels altered the number and morphology of astrocytes. Quantitative analysis showed almost 25% less GFAP+ astrocytes after treatment compared with controls ( $54.21 \pm 0.78$  cell/mm<sup>2</sup> and  $72.08 \pm 1.24$  cell/mm<sup>2</sup>, respectively,  $p=0.006$ ). In agreement with previous studies [12,21], control flat polygonal-shaped astroglial cells were converted into process-bearing stellate astrocytes (Fig 1). Microarray analysis showed that 6,296 of 16,594 annotated genes with assigned gene symbol were differentially expressed by a factor of 1.2 or greater (and FDR q-value <5%) in 8Br-cAMP-treated astrocytes. The full list of differentially expressed genes is shown in Supplementary Table 3. Approximately, one-third of the regulated elements on the array corresponded to ESTs and genes of unknown function. Of the 6,296 genes with significant regulation 42.2% were upregulated by cAMP while the rest were downregulated.

We validated the present array results by analyzing astrocyte expression of the mRNA and protein of 10 representative genes after cAMP augmentation (Figs 1 and 2). qPCR analysis was performed on the cell cycle regulator cyclin D1 (Ccnd1), the peptidase inhibitor cystatin C (Cst3), the calcium-dependent exocytotic SNARE Vamp2, the NMDA receptor subunit NR2C (Grin2c), the adhesion component claudin 10 (Cldn10) and the thyroid hormone transporter Slco1c1. A correlation was found between RT-qPCR and array results for each gene (Fig 2A). cAMP-induced changes of cyclin D1, cystatin C, Vamp2 and the apoptotic regulator Bid, as

well as their time dependence, were further corroborate at protein level by immunoblotting (Fig 2B). No changes on the array were found for non-regulated genes, as shown for the ubiquitous exocytotic protein Snap23 (Fig 2B). Immunofluorescence for the proliferation marker Mki67, the polyamine enzyme Ssat (Sat1) and the NR2C receptor demonstrated that cAMP-dependent gene regulation occurred in GFAP-identified astrocytes (Fig 1). Furthermore, previous studies showing that cAMP regulates the expression of intermediate filaments (GFAP and Nes), glutamate transporters (Slc1a2 and Slc1a3), deiodinases (Dio2), and secretogranins (Scg2 and Scg3) in astrocyte further validate the present transcriptomic results [13,14,20,26, Supplementary Table 3].

*Elevated cAMP restricts the activation of astrocytes and promotes their differentiation*

The functional roles of up- and downregulated cAMP-responsive genes were categorized by Gene Ontology enrichment analysis using GSEA. GO categories with GSEA q-value <2% were considered relevant. We calculated the relative proportion of genes in the core enrichment of each GO category and grouped them in general categories (Fig 3). All the GO categories enriched with differentially regulated genes are shown in the bar plot of Supplementary Figure 1.

More than half (55.2%) the upregulated genes in enriched GO categories corresponded to cell metabolism and transporters. Thus, genes involved in the uptake and degradation of neurotransmitters such as glutamate, glycine and catecholamines were overexpressed after treatment (Slc1a2, Glul, Gldc and MaoB). Ion channels, pumps and transporters with key homeostatic and metabolic functions were also preferentially upregulated by cAMP. For instance, genes participating in the membrane transport of K<sup>+</sup> (Kcnn2), Cl<sup>-</sup> (Clcn2), Ca<sup>2+</sup> (Atp2a2 and Atp2b2), water (Aqp4), glucose (Slc2a1), thyroid hormones (Slco1c1 and Slc16a2), and oligopeptides (Slc15a2) were activated by cAMP signaling. Moreover, an increase of cAMP levels induced expression of genes coding for a wide variety of astrocytic metabolic enzymes, such as most aldehyde dehydrogenases, tRNA ribonucleases and GPI transamidases. Interestingly, the third functional category of genes upregulated by cAMP was associated with antioxidant activities (Table 1). Thus, genes encoding for antioxidant enzymes and molecules, such as catalase, superoxide dismutases, metallothioneins, heme oxygenases and NADPH-quinone oxidoreductases were found to be through microarray analysis. Enhanced cAMP also upregulated numerous genes related to the glutathione system and transport of antioxidant vitamins. The observation that cAMP agonists upregulated genes typically implicated in biological processes of mature astrocytes indicates that cAMP signaling promotes cell differentiation.

GO categories enriched with downregulated genes were associated mainly with proliferating and immaturity-related features of astrocytes (Table 2). Thus, 71.5% of the genes were involved in the general categories cell cycle and apoptosis, cell signaling, cytoskeleton, cell shape and motility, and cell development. Expression of genes typically involved in mitotic processes was dramatically decreased, such as those encoding for the DNA polymerases and the proliferation antigen Mki67. Transcripts of proliferation and cell death regulators, such as mitogens and morphogens (IGF-1, PDGF and BMP4), cyclins, caspases and proapoptotic Bcl2 family members (e.i., Casp8, Bid and Bax) were reduced after exposure to cAMP. Moreover, numerous genes involved in cytoskeletal organization, such as Rho GTPases, myosins, actins, tropomyosins, kinesins and septins, were notably repressed. Among the GO categories enriched with downregulated genes, those typically of reactive astrocytes such as components of the extracellular matrix and mediators of the immune response were predominantly enriched. Thus, mRNA expression of tenascin C, nidogens and many collagens and chondroitin and heparan sulfate proteoglycans was reduced. Interestingly, the enzymes responsible for the major postranscriptional modifications of proteoglycans and collagens were widely downregulated (sulfotransferases and lysyl oxidases). Finally, prolonged cAMP signaling stimulation in astrocytes induced a downregulation of numerous mediators of the immune response, such as cytokines, chemokines and components of the major histocompatibility complex and phagocytotic and adhesion processes (e.g., Tnf, Ccl2, Tgfb1, Cxcl10, Csf1r, H2-D1, B2m, Gulp1 and Icam1). We conclude that cAMP contributes to the restriction of developmental and activation features of astrocytes.

*cAMP signaling confers a mature in vivo-like transcriptional profile to cultured astrocytes.*

To substantiate the net phenotype induction of cAMP signaling on astroglial cells, we applied GSEA analysis to contrast the present gene profiles with previous microarray studies describing the transcriptome signatures of astrocytes *in vivo* in a range of states. First, we compared our genome profiling results with gene sets of developing and mature brain astrocytes reported by Cahoy et al. [27]. We found that cAMP-induced upregulated genes were significantly enriched for the mature profile of astrocytes (Fig 4A, C). The 166 common transcripts included metabolic (Agxt2l1), antioxidant (Sod3) and signaling (Gjb6) genes. Conversely, 258 genes downregulated by cAMP, such as Pold1, Ccna2 and Npy, were enriched for the developmental gene set of astrocytes (Fig 4 A,C). The full lists are shown in Supplementary Table 4 and 5. We conclude that cAMP signaling causes the global transcriptome of astrocytes to become more differentiated. Previous electrophysiological and biochemical studies demonstrating that cAMP elevation induces the acquisition of mature astrocyte signatures, such as proliferation arrest, membrane conductances, neurotransmitter

uptake and cytoskeletal construction further substantiate a relevant contribution of this pathway to astrocyte maturation [12-15]. In addition to supporting roles to neurons, astrocytes are dynamic regulatory elements implicated in the physiology of neural circuits [4,5]. The observed regulation of connexins and pannexins provides evidence for the crucial contribution of intracellular cAMP levels to glial crosstalk. Interestingly, cAMP augmentation also influences astroglial components of the so-called "tripartite synapse". Here we show that the NMDA receptor subunit, NR2C, and the SNARE proposed to mediate astrocyte-to-neuron communication, VAMP-2 [28], were found to be under control of cAMP concentrations. These results together previous observations on regulated exocytosis implicate cAMP as a second messenger involved in glial communication [5,29].

Next, we compare our profiles of cAMP-regulated genes with genes overexpressed in activated astrocytes. Due to the lack of microarray reports of reactive astrocytes *in vivo*, we compared cAMP-regulated gene sets with previous studies performed on cultured astrocytes stimulated with pro-inflammatory cytokines [30,31]. It has been established that *in vitro* administration of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  recapitulate many aspects of reactive astrogliosis, mainly those related to immunity processes [32]. Genes downregulated by cAMP were significantly enriched in upregulated gene sets of astrocytes treated with IFN- $\gamma$  alone (n = 313 genes) or with a mix of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  (n = 183 genes) (Figure 4A,C). Remarkably, more than a quarter of the genes upregulated by each inflammatory treatment were downregulated by cAMP. Gene sets downregulated by cAMP and upregulated by IFN- $\gamma$  alone and by the cytokine mix shared 17 genes in common, 11 related to immune response (i.e. Ccl2, Icam1) and 4 to proteasomal and lysosomal components (i.e. Ctsc). The full gene list is in Supplementary Table 4. These data suggest that cAMP analogs restrict the inflammatory response to activation of astrocytes.

Our findings demonstrate a wide cAMP-induced downregulation of genes related to the main hallmarks of astroglial activation, such as hyperplasia, cytoskeletal rearrangement, triggering of immunological reactions and production of scar components. Many genes associated with proliferation and cytoskeletal components upregulated during activation were downregulated by cAMP (as shown for Mki67 and Nes). This is expected because developing and reactive astrocytes share some cellular features. Moreover, cAMP elevation also represses a number of genes codifying for immunological mediators and scar components which are overexpressed in reactive astroglia (cytokines, chemokines, collagens, sulfated proteoglycans and adhesion molecules). Although some transcripts implicated in glial activation were upregulated by cAMP (i.e. the complement protein C3), our results suggest that cAMP signaling essentially represses astroglial activation. This conclusion may diverge from the

assumption by some authors that cAMP analogs in cultured astrocytes promote activation [16-19]. However, this consideration was taken on the basis of changes in shape stellation and GFAP expression, which are also typical attributes of maturing astrocytes [13,14,33]. Noteworthy, our results showing an opposite transcriptome regulation by cAMP and glial-activating cytokines are consistent with previous studies demonstrating that elevated cAMP in astrocytes antagonizes the cytokine-induced expression of adhesion molecules involved in neuroinflammation [30]. Moreover, a repressive role for cAMP in glial activation is consistent with the observations that cAMP pathways are involved in the reduction and promotion of the glial activation triggered by anti-inflammatory and pro-inflammatory extracellular agents [35-37]. Finally, the observation of cAMP-induced upregulation of repressors of the glial inflammatory response, such as *Socs1* (2.3 fold) and *Nr4a2/Nurr1* (10.5 fold) [38,39], further support the notion that cAMP signaling repress glial activation.

In contrast to other neural cell types, such as neurons and oligodendrocytes, astroglial cells grown in culture do not accurately reflect their attributes *in vivo*. For instance, cultured astrocytes display a high proliferative rate and deficient glutamate clearance, and they lack cell processes and membrane K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> conductances [12,13]. Recently, it has been revealed that *in vitro* astrocytes show an immature, somewhat reactive, transcriptional profile [27,40] (see also overlap between developing and *in vitro* sets in Fig. 4C). Therefore by comparing our results with gene sets of Cahoy et al. [27], we also examined whether cAMP-induced changes make the features of cultured astrocytes more like those observed *in vivo*. Surprisingly, 334 out of 1147 genes upregulated by cAMP were significantly enriched in the mRNA signature of brain-purified astrocytes (*in vivo* set), whereas a 30% of cAMP-downregulated genes were common with the upregulated set of cultured astrocytes (*in vitro* set) (Fig 4A-C). For instance, the enzyme *Dio2*, the immunosuppressor *Nr4a2*, the antioxidant *Cat* and the Notch pathway effector *Hes5* were overexpressed by cAMP, whereas a strong downregulation was found for many annexins, caveolins and IGFbps. The full gene lists are shown in Supplementary Table 7 and 8. Moreover, around two-thirds of the overlapped genes in the cAMP-upregulated/mature and cAMP-downregulated/developing groups were shared with *in vivo* (i.e. *Adra2a*, *Grin2c*, and *Kcnn2*) and *in vitro* (i.e. collagens, nidogens and kinesins) enriched gene sets, respectively. Our observation that the transcriptome of cultured astrocytes acquires a greater resemblance to that of *in vivo* cells when these cells are exposed to 8Br-cAMP may indicate that cAMP signaling confers astrocytes an *in vivo*-like phenotype by repressing activation and promoting differentiation.

We next evaluated the regulation of representative astroglial genes controlled by cAMP in the cerebral cortex *in situ* in a range of states. *Mki67* and *Nes* genes were downregulated

by cAMP in our cultures (-5 and -4.2 fold), but upregulated in acute-purified developing astrocytes (10.9 and 3.6 fold). Conversely, mRNA expression of the NMDA receptor subunit NR2C was upregulated by cAMP (3.9 fold) as well as in isolated matured astrocytes (5.9 fold) [this study, 27]. In agreement with the proliferative state of cells, many nuclei of GFAP- and Nestin-positive astrocytes were immunolabeled for Mki67 in histological sections of postnatal and injured adult cortex, but not in the intact adult brain (Fig. 5). Although recent studies have shown that NR2C mRNA increases with age in cortical astrocytes *in situ* [41,42], the location of NMDA receptor protein in glial cells *in vivo* is unknown. Here we show the protein expression of NR2C subunit in many astrocytes in the adult cerebral cortex (Fig 5), without changes after a stab wound lesion (data not shown). In conclusion, the present GSEA results provide a comprehensive database of transcripts involved in the acquisition of a mature astrocyte phenotype regulated by the cAMP pathway.

The induction of target genes and cellular programs regulated by the cAMP pathway is highly dependent on cellular contexts [43]. For instance, elevated cAMP results in cell-cycle arrest in astrocytes but induces proliferation of neurons [14,44]. We postulate that the potent gene regulation by cAMP in astrocytes shown here is conveyed through PKA and the subsequent activation of the CREB transcription factors. Moreover, the recruitment of specific CREB regulatory partners, the activation of PKA-independent pathways and a secondary gene regulation may also collaborate to shape the individual astrocyte transcriptome elicited by cAMP signaling [44,45].

In conclusion, we here show that the net effect of cAMP signaling is to restrict developmental and activation features of astrocytes and promote their maturation. Therefore, we propose that controlled positive modulation of cAMP signaling could be used to suppress the mechanisms of activation driven by pathological situations and to promote the physiologically normal state of differentiated astrocytes.

#### REFERENCES

1. Wang, D.D., and Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol.* **86**, 342-367.
2. Kimelberg, H.K. (2010). Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist.* **16**, 79-106.
3. Abbott, N.J., Rönnebeck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* **7**, 41-53.

4. Scemes, E., Suadicani, S.O., Dahl, G., and Spray, D.C. (2007). Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol.* **3**, 199-208.
5. Perea, G., Navarrete, M., and Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* **32**, 421-431.
6. Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* **28**, 138-145.
7. Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* **32**:638-647.
8. Miller, F.D., and Gauthier, A.S. (2007). Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* **54**, 357-369.
9. Giulian, D., Woodward, J., Young, D.G., Krebs, J.F., and Lachman, L.B. (1988). Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci* **8**, 2485-2490.
10. Yong, V.W., Moudjian, R., Yong, F.P., Ruijs, T.C., Freedman, M.S., Cashman, N., and Antel, J.P. (1991). Gamma-interferon promotes proliferation of adult human astrocytes in vitro and reactive gliosis in the adult mouse brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7016-7020.
11. Herrmann, J.E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T.K., Korsak, R.A., Takeda, K., Akira, S., and Sofroniew, M.V. (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* **28**, 7231-7243.
12. Ferroni, S., Marchini, C., Schubert, P., and Rapisarda, C. (1995). Two distinct inwardly rectifying conductances are expressed in long term dibutyl-AMP treated rat cultured cortical astrocytes. *FEBS Lett* **367**, 319-325.
13. Schlag, B.D., Vondrasek J.R., Munir, M., Kalandadze, A., Zeleniaia, O.A., Rothstein, J.D., Robinson, M.B. (1998). Regulation of the glial Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol Pharmacol* **53**, 355-369.
14. McManus, M.F., Chen, L.C., Vallejo, I., and Vallejo, M. (1999). Astroglial differentiation of cortical precursor cells triggered by activation of the cAMP-dependent signaling pathway. *J Neurosci* **19**, 9004-9015.
15. Cebolla, B., Fernández-Pérez, A., Perea, G., Araque, A., and Vallejo, M. (2008). DREAM mediates cAMP-dependent, Ca<sup>2+</sup>-induced stimulation of GFAP gene expression and regulates cortical astroglialogenesis. *J Neurosci* **28**, 6703-6713.



16. Fedoroff, S., McAuley, W.A., Houle, J.D., and Devon, R.M. (1984). Astrocyte cell lineage. V. Similarity of astrocytes that form in the presence of dBcAMP in cultures to reactive astrocytes in vivo. *J Neurosci Res*. **12**, 14-27.
17. Miller, C., Tsatas, O., and David, S. (1994). Dibutyryl cAMP, interleukin-1 beta, and macrophage conditioned medium enhance the ability of astrocytes to promote neurite growth. *J Neurosci Res*. **38**, 56-63.
18. Bochelen, D., Langley, K., Adamczyk, M., Kupferberg, A., Hor, F., Vincendon, G., and Mersel, M. (2000). 7beta-hydroxysterol is cytotoxic to neonatal rat astrocytes in primary culture when cAMP levels are increased. *J Neurosci Res*. **62**, 99-111.
19. Dagainakatte, G.C., Gadzinski, A., Emnett, R.J., Stark, J.L., Gonzales, E.R., Yan, P., Lee, J.M., Cross, A.H, and Gutmann, D.H. (2008). Expression profiling identifies a molecular signature of reactive astrocytes stimulated by cyclic AMP or proinflammatory cytokines. *Exp Neurol*. **210**, 261-267.
20. Paco, S., Pozas, E., and Aguado, F. (2010). Secretogranin III is an astrocyte granin that is overexpressed in reactive glia. *Cereb Cortex*. **20**, 1386-1397.
21. Paco, S., Margelí, M.A., Olkkonen, V.M., Imai, A., Blasi, J., Fischer-Colbrie, R., and Aguado, F. (2009). Regulation of exocytotic protein expression and Ca<sup>2+</sup>-dependent peptide secretion in astrocytes. *J Neurochem*. **110**, 143-156.
22. Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. **7**:3.
23. Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* **3**, Article 3.
24. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., and Mesirov, J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 15545-15550.
25. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. **29**, e45.
26. Lamirand, A., Pallud-Mothré, S., Ramaugé, M., Pierre, M., and Courtin, F. (2008). Oxidative stress regulates type 3 deiodinase and type 2 deiodinase in cultured rat astrocytes. *Endocrinology* **149**, 3713-3721.

27. Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J., and Barres B.A.. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*. **28**, 264-278.
28. Perea, G., and Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*.**317**, 1083-1086.
29. Shiga, H., Murakami, J., Nagao, T., Tanaka, M., Kawahara, K., Matsuoka, I., and Ito, E. (2006). Glutamate release from astrocytes is stimulated via the appearance of exocytosis during cyclic AMP-induced morphologic changes. *J Neurosci Res*. **84**, 338-347.
30. Falsig, J., Pörzgen, P., Lund, S., Schrattenholz, A., and Leist, M. (2006). The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function. *J Neurochem*.**96**, 893-907.
31. Halonen, S.K., Woods, T., McInnerney, K., and Weiss L.M..(2006). Microarray analysis of IFN-gamma response genes in astrocytes. *J Neuroimmunol*.**175**, 19-30.
32. John, G.R., Lee, S.C., and Brosnan, C.F. (2003). Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist***9**, 10-22.
33. Wandosell, F., Bovolenta, P., and Nieto-Sampedro, M. (1993). Differences between reactive astrocytes and cultured astrocytes treated with di-butyl-tyr-yl-cyclic AMP. *J Neuropathol Exp Neurol*.**52**, 205-215.
34. Ballestas, M.E., and Benveniste, E.N. (1997) Elevation of cyclic AMP levels in astrocytes antagonizes cytokine-induced adhesion molecule expression. *J Neurochem*. **69**, 1438-1448.
35. Zhang, Y., Luo, Y., Zhai, Q., Ma, L., and Dorf, M.E. (2003). Negative role of cAMP-dependent protein kinase A in RANTES-mediated transcription of proinflammatory mediators through Raf. *FASEB J*.**17**, 734-736.
36. Delgado, M. (2003). Inhibition of interferon (IFN) gamma-induced Jak-STAT1 activation in microglia by vasoactive intestinal peptide: inhibitory effect on CD40, IFN-induced protein-10, and inducible nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem*. **278**:27620-27629.
37. Lee, H., Suk, K. (2004). Selective modulation of microglial signal transduction by PACAP. *Neuroreport*.**15**, 1469-1474.

38. Qin, H., Niyongere, S.A., Lee, S.J., Baker, B.J., and Benveniste, E.N. (2008). Expression and functional significance of SOCS-1 and SOCS-3 in astrocytes. *J Immunol* **181**, 3167-3176.
39. Saijo, K., Winner, B., Carson, C.T., Collier, J.G., Boyer, L., and Rosenfeld, M.G., Gage FH, Glass CK. 2009. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* **137**, 47-59.
40. Ståhlberg, A., Andersson, D., Aurelius, J., Faiz, M., Pekna, M., Kubista, M. and Pekny, M. (2011). Defining cell populations with single-cell gene expression profiling: correlations and identification of astrocyte subpopulations. *Nucleic Acids Res* **39**, e24.
41. Karavanova, I., Vasudevan, K., Cheng, J., and Buonanno, A. (2007). Novel regional and developmental NMDA receptor expression patterns uncovered in NR2C subunit-beta-galactosidase knock-in mice. *Mol Cell Neurosci* **34**, 468-480.
42. Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., Chen, L., Chen, L., Chen, T.M., Chin M.C., Chong, J., Crook, B.E., Czaplinska, A., Dang, C.N., Datta, S., Dee, N.R., Desaki, A.L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T.A., Donelan, M.J., Dong, H.W., Dougherty, J.G., Duncan, B.J., Ebbert, A.J., Eichele, G., Estin, L.K., Faber, C., Facer, B.A., Fields, R., Fischer, S.R., Fliss, T.P., Frensley, C., Gates, S.N., Glattfelder, K.J., Halverson, K.R., Hart, M.R., Hohmann, J.G., Howell, M.P., Jeung, D.P., Johnson, R.A., Karr, P.T., Kawal, R., Kidney, J.M., Knapik, R.H., Kuan, C.L., Lake, J.H., Laramie, A.R., Larsen, K.D., Lau, C., Lemon, T.A., Liang, A.J., Liu, Y., Luong, L.T., Michaels, J., Morgan, J., Morgan, R.J., Mortrud, M.T., Mosqueda, N.F., Ng, L.L., Ng, R., Orta, G.J., Overly, C.C., Pak, T.H., Parry, S.E., Pathak, S.D., Pearson, O.C., Puchalski, R.B., Riley, Z.L., Rockett, H.R., Rowland, S.A., Royall, J.J., Ruiz, M.J., Sarno, N.R., Schaffnit, K., Shapovalova, N.V., Sivisay, T., Slaughterbeck, C.R., Smith, S.C., Smith, K.A., Smith, B.I., Sodt, A.J., Stewart, N.N., Stumpf, K.R., Sunkin, S.M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C.D., Thaller, C., Thompson, C.L., Varnam, L.R., Visel, A., Whitlock, R.M., Wohnoutka, P.E., Wolkey, C.K., Wong, V.Y., Wood, M., Yaylaoglu, M.B., Young, R.C., Youngstrom, B.L., Yuan, X.F., Zhang, B., Zwingman, T.A., and Jones, A.R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**, 168-176.
43. Zhang, X., Odom, D.T., Koo, S.H., Conkright, M.D., Canettieri, G., Best, J., Chen, H., Jenner, R., Herbolsheimer, E., Jacobsen, E., Kadam, S., Ecker, J.R., Emerson, B., Hogenesch, J.B., Unterman, T., Young, R.A., and Montminy, M. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 4459-4464.

44. Dugan, L.L., Kim, J.S., Zhang, Y., Bart, R.D., Sun, Y., Holtzman, D.M., and Gutmann, D.H. (1999). Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *J Biol Chem.* **274**, 25842-25848.
45. Lastres-Becker, I., Fernández-Pérez, A., Cebolla, B., and Vallejo, M. (2008). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates glial fibrillary acidic protein gene expression in cortical precursor cells by activating Ras and Rap1. *Mol Cell Neurosci.* **39**, 291-301.

#### FOOTNOTE

This work was supported by Spanish Ministry of Science and Innovation Grants BFU2007-67889 and BFU2010-22132 to F.A. We are grateful to Robin Rycroft for editorial assistance.

#### ABBREVIATIONS

FDR, false discovery rate; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GSEA, gene set enrichment analysis; NES, normalized enrichment score, NR2C, NMDA receptor subunit 2C.

#### FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Regulation of microarray expression in identified single astrocytes in culture.** Double immunofluorescence confocal images of the astrocyte marker GFAP (red) and three proteins differentially regulated by cAMP (green) in control and treated cells. Mki67 and Ssat were analyzed in permeabilized astrocytes and NR2C in non-permeabilized cells. Nuclear Mki67 immunofluorescence was abundant in control astrocytes, but almost absent in cAMP-treated cells. Diffuse cytosolic Ssat and extracellular clusters of NR2C were intensely labeled in treated cells. Yellow signal in the Ssat labeling indicates colocalization with GFAP cytoskeleton. Note the star-shaped morphology acquired by astrocytes exposed to permeable cAMP agonists. Scale bar: 10  $\mu$ m.

**Figure 2. Validation of microarray expression data for selected differentially expressed genes in cultured astrocytes at the mRNA and protein levels.** (A) Comparison of cDNA microarray and qRT-PCR data. (B) Western blotting analysis of cAMP-regulated genes in control and treated astrocytes.

**Figure 3. Global GO classification of gene expression profile of cAMP-treated astrocytes.** Pie charts depicting the relative proportions of significant up- and downregulated genes in general categories containing distinctive GO terms. The GO analysis was performed using GSEA (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). Detailed GO terms are shown in Supplementary Figure 1.

Figure 4. GSEA analysis comparing the gene profile of cAMP-treated astrocytes with the transcriptome signatures of astroglial cells in different states. (A) The upregulated gene set identified in cAMP-treated astrocytes is significantly enriched in mature and *in vivo* astroglial cells, while the cAMP-induced downregulated gene set is significantly enriched in developing, *in vitro* and proinflammatory cytokine-treated astrocytes. FDR q-value, False discovery rate; NES, Normalized Enrichment Score. (B) Representative GSEA analysis showing the plots of cAMP-regulated gene profile with *in vivo* (n = 2821 genes) and *in vitro* (n = 2105 genes) gene sets obtained from Cahoy et al., 2008. Signal-to-Noise ratio statistic was used to rank the genes on the basis of their correlation with either the upregulation (red) or downregulation (blue). On each panel, the vertical black lines indicate the position of each gene of the set in the ordered, non-redundant data set. The green curve corresponds to the enrichment profile curve, which is the running sum of the weighted enrichment score obtained with GSEA software. (C) Proportional Venn diagrams representing the overlap of astroglial genes differentially expressed by cAMP compared to the gene sets in different astrocyte states (fold change cut-off 1.5 in each case).

Figure 5. *In situ* expression of astroglial genes controlled by cAMP in the cerebral cortex in different states. Confocal images of double immunofluorescences of Mki67, Nestin, NR2C and GFAP in the hippocampal dentate gyrus (Mki67/GFAP) and the stratum radiatum of the CA1 region (NR2C/GFAP), and upper layers of neocortex (Mki67/Nestin) of postnatal and adult brains. Cortical lesions were analyzed 5 days after a stab wound injury in the contralateral (control) and ipsilateral (lesion) hemispheres. Arrows point to identified astrocytes expressing only GFAP. Arrowheads identify double labeled cells. Crosses and the asterisk indicate the lateral ventricle and the brain surface, respectively. Scale bar: 10  $\mu$ m.

\*Figures suplementàries incloses al CD.

Supplementary Figure 1. Barplot of enriched Gene Ontology categories. The barplot shows negative log<sub>10</sub> q-values of Gene Ontology categories significantly enriched (q-value <0.02) with regulated genes according to GSEA analysis. The greater the bar height, the more significant the enrichment of the respective GO category. The vertical line indicates a q-value of 0.02. Enrichment analysis was done separately for downregulated genes (green bars) and upregulated genes (red bars). Categories are grouped into the three ontologies, as indicated within the bar labels (MF: Molecular Function, CC: Cellular Component, BP: Biological Process). The bar widths are proportional to the numbers of genes associated with the respective GO categories. The solid-colored part of the bars indicates the fraction of genes within the "core enrichment" of the respective category, as defined by GSEA analysis.

**Supplementary Table 1. Full list of significantly regulated genes in cAMP-treated cells.** Differential expression analysis on a gene-by-gene basis was done using linear models (limma). The table contains all genes with FDR q-values <5% and absolute fold changes > 1.2 and is sorted on the basis of fold changes in decreasing order. The first eight columns show a color representation of the log<sub>2</sub>ratios for each two-color hybridization of a cAMP-treated together with a control sample. The sign of dye-swap hybridization log<sub>2</sub>ratios (indicated by 'DS' in the column name) was flipped, such that values have the same "direction" as in the direct hybridizations, i.e. red (green) indicates up- (down-) regulation in cAMP-treated as compared to Control. The 9th column is the average log<sub>2</sub>ratio between cAMP-treated and Control samples. In addition to gene symbol and gene description, the remaining three columns show (symmetric) fold changes, limma p-values and FDR q-values.

**Supplementary Tables 2-6. Lists of genes regulated in cAMP-treated cells and present in published astrocyte signatures.** Genes that are regulated in cAMP-treated cells (genes within the "core enrichment" as defined by GSEA analysis), and that are reported to be regulated in previously published astrocyte signatures: mature (Supplementary Table 2), developing (Supplementary Table 3), cytokine-treated (Supplementary Table 4), *in vivo* (Supplementary Table 5), and *in vitro* (Supplementary Table 8) astrocytes. The lists represent the respective intersections in the Venn diagrams of Figure 4C. In GSEA analysis, genes were ranked on the basis of signal-to-noise ratio within the microarray data, starting with strongly upregulated and ending with strongly downregulated genes. The third column of the tables indicate the rank of the respective gene, i.e. low rank values indicate strong upregulation and high ones close to the maximal value of 21,492 indicate strong downregulation.

**Supplementary Table 7. Primers used in this study.**

**Supplementary Table 8. Antibodies used in this study.**

Table 1

*Antioxidant-associated genes upregulated by cAMP in astrocytes (fold-change)*


---

Catalase	Cat (2.2)
Superoxidase dismutases	Sod2 (1.4), Sod3 (5.3)
Peroxiredoxins and sulfiredoxins	Prdx1 (1.8), Prdx2 (1.5), Prdx5 (1.5), Srxn1 (4.1)
Cystine/glutamate transporter	Slc7a11 (9.6)
Glutamate-cysteine ligases	Gclc (5.3), Gclm (3.1)
Glutathione synthetase and transferases	Gss (1.5), Gsta1 (15.7), Gsta2 (6.9), Gsta3 (6.6), Gsta4 (2.3), Gstk1 (1.4), Gstm5 (1.6), Mgst1 (4.9), Mgst2 (7.7)
Glutathione peroxidases and reductases	Gpx4 (1.6), Gsr (1.5)
NADPH-quinone oxidoreductase and heme oxygenase	Nqo1 (4.4), Hmox1 (1.6)
Thioredoxins and thioredoxin reductases	Txn2 (1.6), Txnrd1 (3.3)
Metallothioneins and selenoproteins	Mt1 (1.5), Mt2 (1.5), Sepp1 (1.3)
Ascorbate and glucose/dehydroascorbate transporters	Slc23a2 (4.5), Slc2a1 (3.9), Slc2a4 (1.4), Slc2a8 (1.7), Slc2a13 (2.2)
$\alpha$ -tocopherol transfer protein	Ttpa (2.2)

---

Table 2  
Selected categories and genes down-regulated by cAMP elevation in astrocytes

General category GO category	NES	FDR q-value	Gene	ID	Protein name	FC
<b>Cell cycle and apoptosis</b>						
Mitosis	-1,70	0,019	<b>Ccna2</b>	12428	cyclin A2	- 4,2
DNA directed DNA polymerase activity	-0,17	0,014	<b>Pold1</b>	18971	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit	-2,3
Cytokinesis	-1,71	0,018	<b>Myh10</b>	77579	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	-4,2
<b>Cell signalling</b>						
Ras protein signal transduction	-1,72	0,016	<b>Igf1</b>	16000	insulin-like growth factor 1	-6,1
Neuropeptide hormone activity	-1,92	0,0061	<b>Npy</b>	109648	neuropeptide Y	- 3,5
<b>Cytoskeleton, cell shape and motility</b>						
Collagen	-1,82	0,0095	<b>Col5a2</b>	12832	collagen type V $\alpha$ 2	- 6,7
Structural constituent of cytoskeleton	-1,80	0,011	<b>Tpm1</b>	22003	tropomyosin 1, alpha	-3,1
<b>Cell development</b>						
Cell development	-1,77	0,014	<b>Igfbp3</b>	16009	insulin-like growth factor binding protein 3	- 4,1
<b>Cellular metabolism</b>						
Proteoglycan metabolic process	-1,70	0,019	<b>Chst7</b>	60322	chondroitin 6-sulfotransferase 7	- 2,9
<b>Immune response</b>						
Inflammatory response	-1,73	0,016	<b>Ccl2</b>	20296	chemokine (C-C motif) ligand 2	- 2,1
			<b>Cxcl10</b>	15945	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-3,7
<b>Others</b>						
Lipid raft	-2,05	0,0094	<b>Cav1</b>	12389	caveolin 1	- 4,0



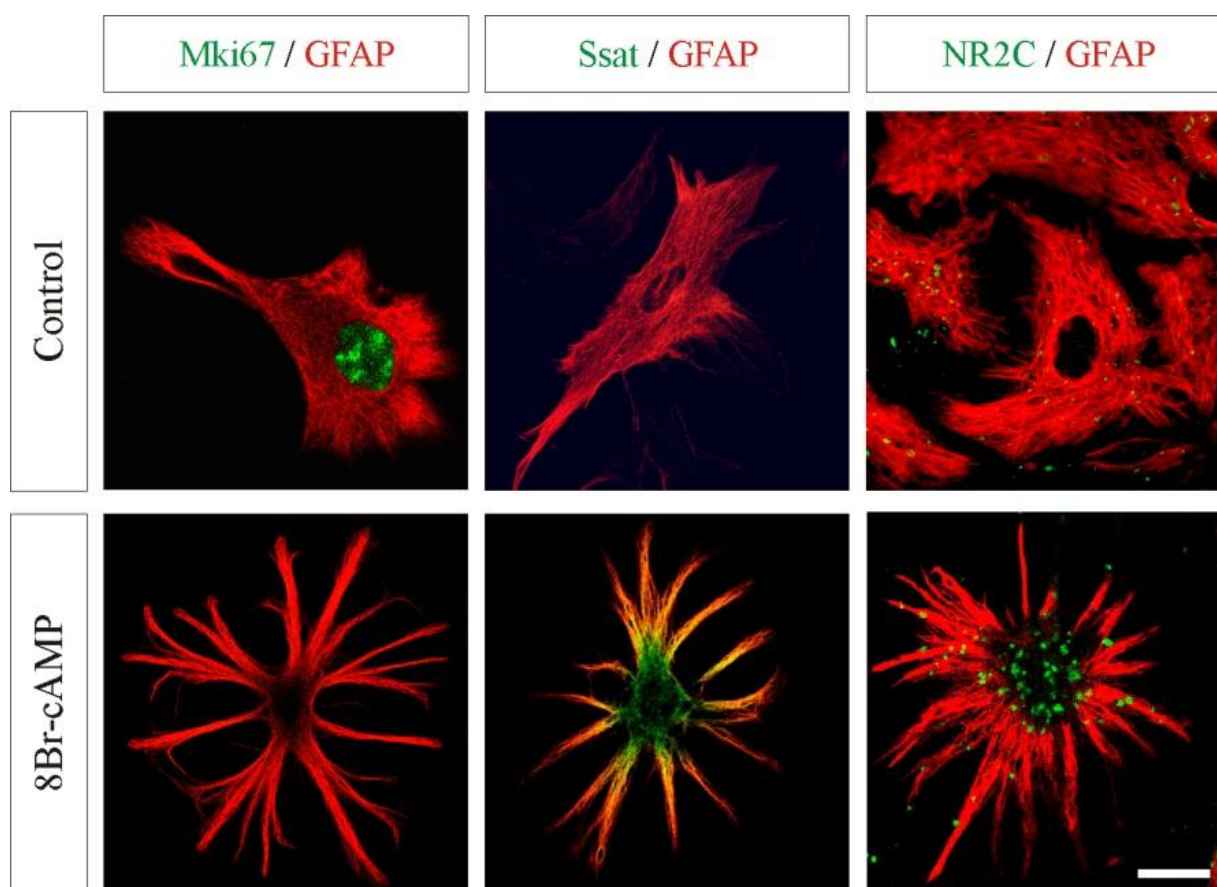


Figure 1

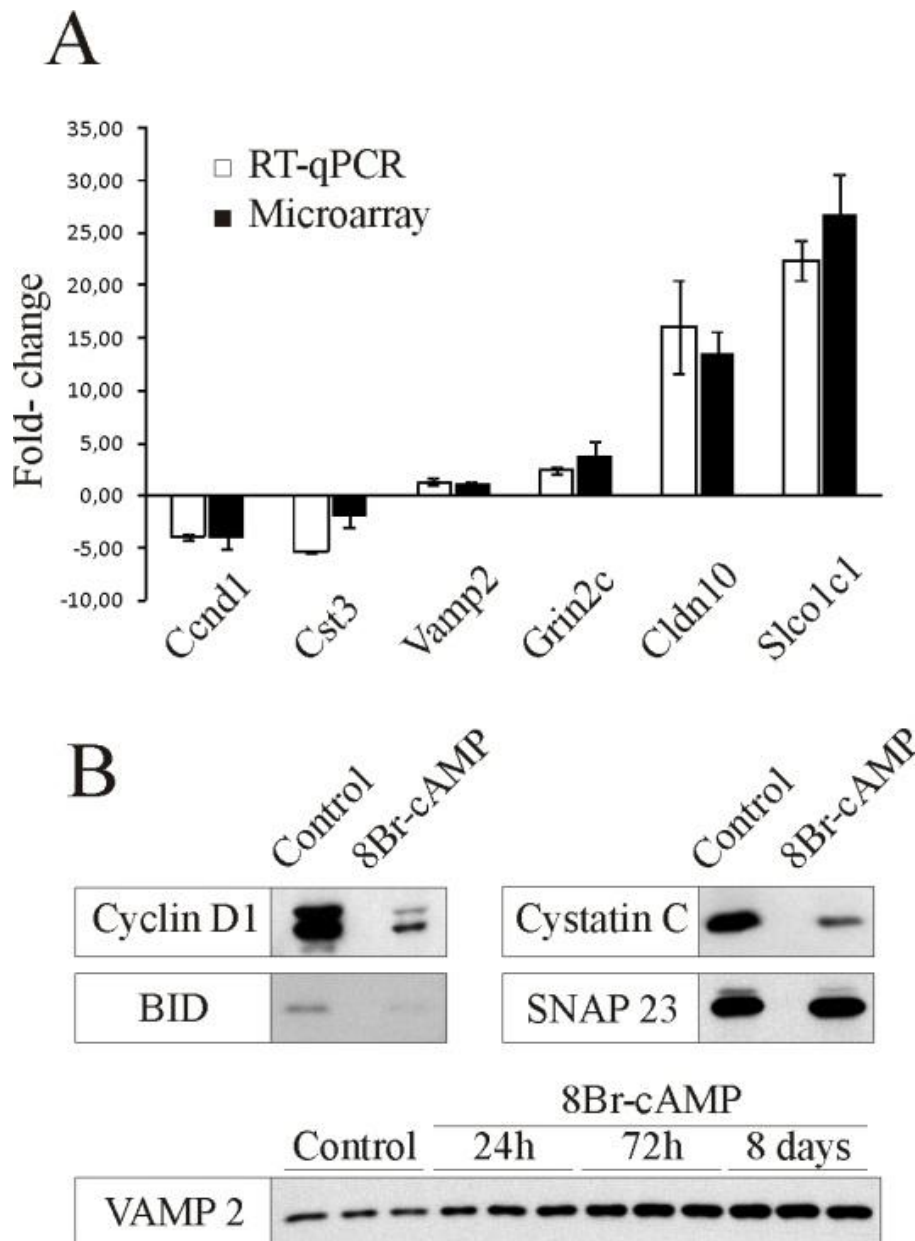


Figure 2

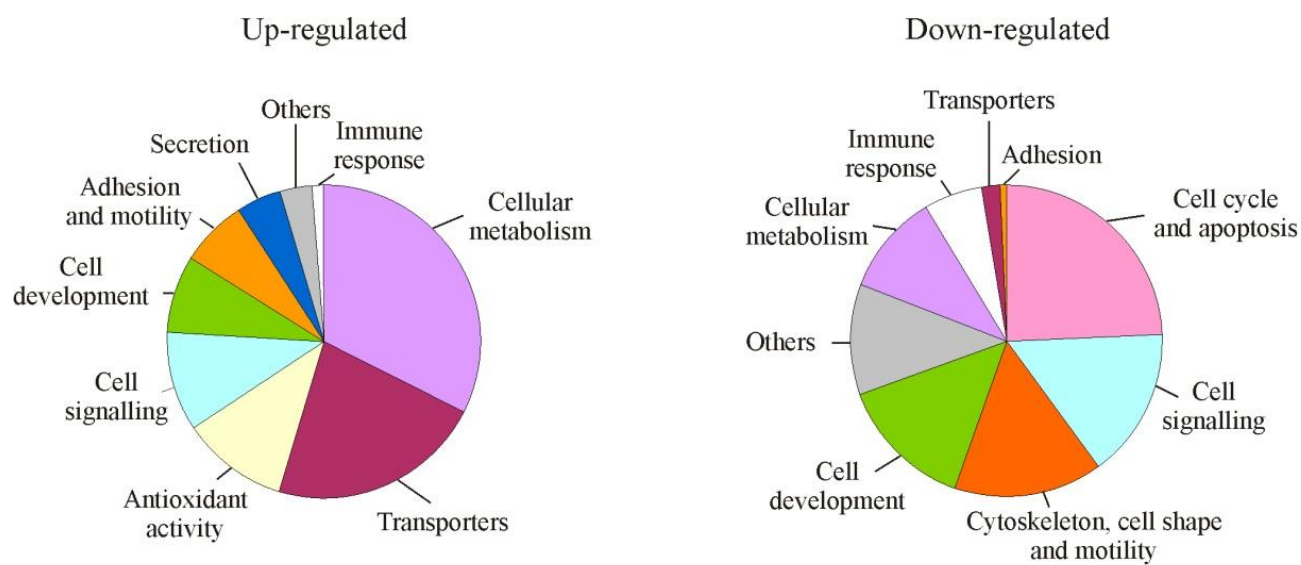


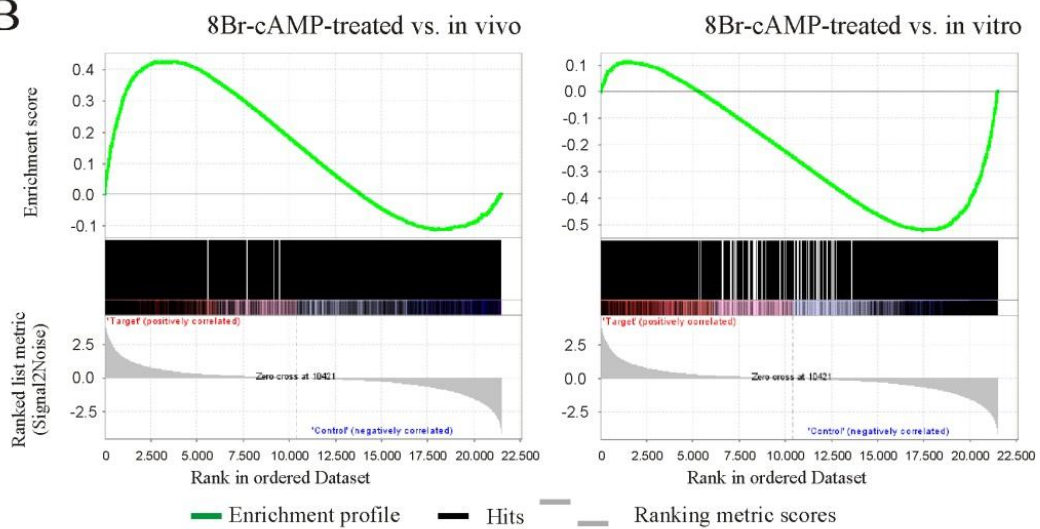
Figure 3

A

Comparison between enriched genes in 8Br-cAMP-treated cultured cells and other described conditions in murine astrocytes

Gene sets	Enriched in	FDR q-value	NES
Mature vs. developing <sup>27</sup>	cAMP upregulation	0.0003	1.814142
Developing vs. mature <sup>27</sup>	cAMP downregulation	0.0	-1.8752508
In vivo vs. in vitro <sup>27</sup>	cAMP upregulation	0.002	1.7864597
In vitro vs. in vivo <sup>27</sup>	cAMP downregulation	0.0	-1.9545795
IFN $\gamma$ -treated vs. control <sup>31</sup>	cAMP downregulation	0.0	-1.9171501
TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and IFN $\gamma$ -treated vs. control <sup>30</sup>	cAMP downregulation	0.0	-1.967048

B



C

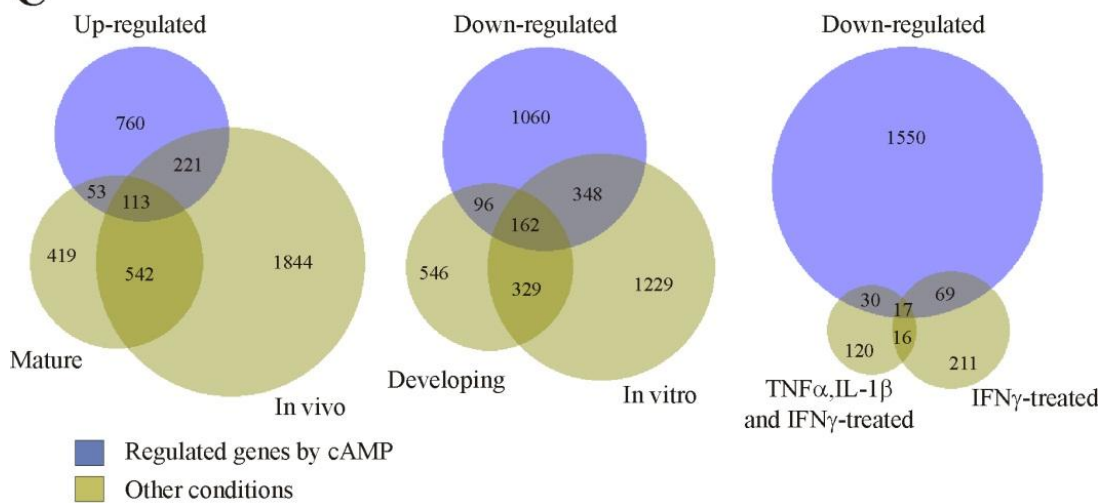


Figure 4

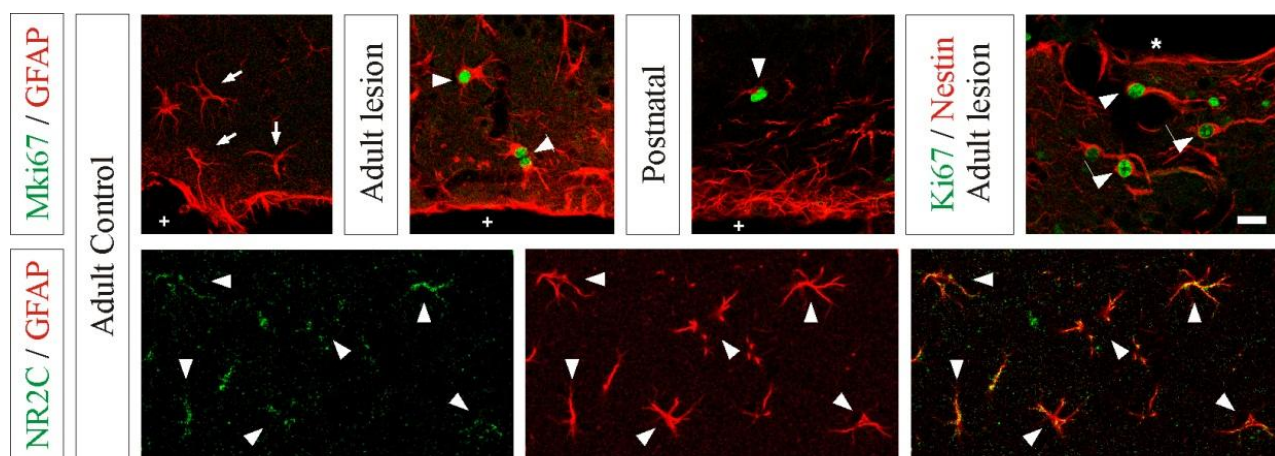


Figure 5

## CAPÍTOL II

### L'AMP cíclic regula l'expressió de proteïnes exocítiques i potencia la secreció regulada de pèptids en astròcits en cultiu

Sonia Paco<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Ángeles Margelí<sup>1</sup>, Vesa M. Olkkonen<sup>2</sup>, Akane Imai<sup>3</sup>, Joan Blasi<sup>4</sup>,  
Reiner Fischer-Colbrie<sup>5</sup>, Fernando Aguado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Universitat de Barcelona, Barcelona E-08028, Spain. <sup>2</sup>Department of Molecular Medicine, National Public Health Institute, Helsinki, Finland. <sup>3</sup>Department of Biochemistry, The Nippon Dental University, Niigata, Japan. <sup>4</sup>Department de Patologia i Terapèutica Experimental, IDIBELL-Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain. <sup>5</sup>Department of Pharmacology, Medical University of Innsbruck, Austria.

Publicat a la revista J Neurochem. 2009 Jul;110(1):143-56.

#### Resum

L'alliberació vesicular de neurotransmissors, pèptids i factors neurotròfics per part dels astròcits influeix el desenvolupament, la funció y la plasticitat neuronal. Malgrat això, els mecanismes moleculars de la secreció en els astròcits són poc coneguts. En aquest estudi demostrem que els astròcits en cultiu expressen diverses proteïnes SNARE i isoformes de Munc 18, sent sintaxina-4, SNAP23, VAMP3 i Munc18c les majoritàries. L'expressió de les proteïnes típicament implicades en la secreció regulada per calci de neurotransmissors i hormones s'incrementa específicament en cultius d'astròcits per la presència de 8Br-cAMP, usat com a agent diferenciador. Contràriament, l'administració de citocines pro-inflamatòries que provoquen la formació de glia reactiva indueix l'augment de l'expressió de proteïnes exocítiques de distribució més ubiqua. A més, els tractaments a llarg termini amb 8Br-cAMP incrementen marcadament el contingut cel·lular del marcador de vesícules peptídica secretogranina-2. Els assajos d'alliberació realitzats en astròcits tractats amb 8Br-cAMP mostren que tant l'alliberació basal com l'estimulada de secretogranina-2 són dependents de la concentració intracel·lular de calci. Tal i com es mostra amb l'alliberació de la hormona quimèrica ANP.emd en cèl·lules transfectades, el tractament amb 8Br-cAMP en astròcits potencia l'alliberació de pèptids regulada per calci. Per tant, concloem que els astròcits expressen, respecte a les neurones, un patró distintiu de components moleculars necessari per l'exocitosi i que aquest patró varia en funció de l'estat en que es troben. L'augment de la secreció regulada de pèptids i la sobreexpressió de determinades proteïnes exocítiques en astròcits tractats amb 8Br-cAMP suggereix un important paper de la secreció dependent de calci en cèl·lules glials diferenciades.



## Regulation of exocytotic protein expression and Ca<sup>2+</sup>-dependent peptide secretion in astrocytes

Sonia Paco,\* Maria A. Margelí,\* Vesa M. Olkkonen,† Akane Imai,‡ Juan Blasi,§ Reiner Fischer-Colbric¶ and Fernando Aguado\*

\*Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

†National Institute for Health and Welfare, and FIMM, Institute for Molecular Medicine Finland, University of Helsinki, Biomedicum, Helsinki, Finland

‡Department of Biochemistry, The Nippon Dental University, Niigata, Japan

§Department of Pathology and Experimental Therapeutics, IDIBELL-University of Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

¶Department of Pharmacology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

### Abstract

Vesicular transmitter release from astrocytes influences neuronal development, function and plasticity. However, secretory pathways and the involved molecular mechanisms in astroglial cells are poorly known. In this study, we show that a variety of SNARE and Munc18 isoforms are expressed by cultured astrocytes, with syntaxin-4, Munc18c, SNAP-23 and VAMP-3 being the most abundant variants. Exocytotic protein expression was differentially regulated by activating and differentiating agents. Specifically, proteins controlling Ca<sup>2+</sup>-dependent secretion in neuroendocrine cells were up-regulated after long-term 8Br-cAMP administration in astrocytes, but not by proinflammatory cytokines. Moreover, 8Br-cAMP treatment greatly increased the cellular content of the peptidic vesicle

marker secretogranin-2. Release assays performed on cAMP-treated astrocytes showed that basal and stimulated secretogranin-2 secretion are dependent on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. As shown release of the chimeric hormone ANP.emd from transfected cells, cAMP-induced differentiation in astrocytes enhances Ca<sup>2+</sup>-regulated peptide secretion. We conclude that astroglial cells display distinctive molecular components for exocytosis. Moreover, the regulation of both exocytotic protein expression and Ca<sup>2+</sup>-dependent peptide secretion in astrocytes by differentiating and activating agents suggest that glial secretory pathways are adjusted in different physiological states.

**Keywords:** astrocyte, calcium, microglia, Munc18, regulated secretion, SNARE.

*J. Neurochem.* (2009) **110**, 143–156.

Astrocyte-secreted peptidergic and non-peptidergic transmitters regulate development, physiology and pathology of neuronal circuits (Araque *et al.* 2001; Volterra and Meldolesi 2005). For instance, astroglial-derived thrombospondins and ApoE-containing lipoproteins control synaptogenesis, while astrocytic glutamate, ATP and D-serine modulate synaptic transmission and network activity (Mauch *et al.* 2001; Fellin *et al.* 2004; Christopherson *et al.* 2005; Pascual *et al.* 2005; Panatier *et al.* 2006; Perea and Araque 2007). Moreover, proinflammatory cytokines, growth factors and amino acids released from glia have been associated with neurological disorders and neurodegenerative diseases (Allan and Rothwell 2001; Halassa *et al.* 2007). Although certain chemical messengers can be released from astrocytes by mechanism other than exocytosis, secretory vesicular fusion

is considered as the main astroglial pathway in the glia-neuron signaling (Evanko *et al.* 2004; Volterra and Meldolesi 2005; Montana *et al.* 2006). As astrocytes can communicate

Received January 8, 2009; revised manuscript received April 9, 2009; accepted April 11, 2009.

Address correspondence and reprint requests to Dr Fernando Aguado, Department of Cell Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, Barcelona E-08028, Spain. E-mail: faguado@ub.edu

**Abbreviations used:** BAPTA, 1,2-bis(2-amino-phenoxy)ethane-*N*, *N'*, *N'*-tetraacetic acid; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GFP, green fluorescent protein; IFN, interferon; IL, interleukin; PBS, phosphate-buffered saline; SCG-2, secretogranin-2; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SNAP, synaptosomal-associated protein; SNAREs, *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors; TNF, tumor necrosis factor; TPA, phorbol-12-myristate-13-acetate; VAMP, vesicle-associated membrane protein.



with neighboring neurons, synapses and capillaries by raising the intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , a transmitter release regulated by  $\text{Ca}^{2+}$  in astrocytes was originally proposed (Haydon and Carmignoto 2006; Iadecola and Nedergaard 2007). It has now been shown that astrocytes release gliotransmitters such as glutamate and ATP by a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis (for review, see Montana *et al.* 2006). However, the intracellular transport pathways in these cells are as yet poorly characterized (Bezzi *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005; Mothet *et al.* 2005; Bowser and Khakh 2007; Zhang *et al.* 2007; Li *et al.* 2008). Even less is known about the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of the peptide secretion from astrocytes (Calegari *et al.* 1999; Krzan *et al.* 2003).

The core secretory machinery for vesicle exocytosis consists of *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNAREs) and *sec1*/Munc18-like proteins (Jahn *et al.* 2003). During vesicular secretion the plasma membrane Q-SNAREs syntaxin and synaptosomal-associated protein (SNAP)-25 interact with the vesicular R-SNAREs vesicle-associated membrane protein (VAMP) (also known as synaptobrevin) to form a fusion complex which is tightly regulated by Munc18 (Jahn and Scheller 2006; Toonen and Verhage 2007). Each exocytotic protein is represented by multiple, closely related isoforms: SNAP-25 and -23; syntaxin-1, -2, -3 and -4; VAMP-1, -2 and -3; Munc18a, b and c (Jahn and Scheller 2006; Toonen and Verhage 2007). Distinctive sets of exocytotic protein isoforms have been associated with different exocytosis events. For instance, the set of syntaxin-1A/SNAP-25/VAMP-2/Munc18a is classically involved in  $\text{Ca}^{2+}$  regulated secretion in neurons and endocrine cells; the cell surface translocation of the glucose transporter 4 in insulin-responding cells and the tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$  release from macrophages depends on syntaxin-4/SNAP-23/VAMP-2-3/Munc18c; and apical membrane traffic in epithelial cells are controlled by syntaxin-3/SNAP-23/VAMP-3/Munc18b (Riento *et al.* 1998; Pagan *et al.* 2003; Toonen and Verhage 2007; Smithers *et al.* 2008). In recent years, considerable attention has been focused on the astrocyte expression and function of the originally described neuronal specific SNAREs (Montana *et al.* 2006). Thus, several studies have demonstrated that the neuronal-enriched VAMP-2 is expressed in astrocytes and involved in glial  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent release of non-peptidergic transmitters (Parpura *et al.* 1995; Araque *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2004a; Pascual *et al.* 2005; Perea and Araque 2007). However, other SNARE isoforms, including SNAP-23 and VAMP-3, which are barely expressed in neurons but importantly involved in different non-neuronal secretory processes, were robustly detected in astrocytes (Parpura *et al.* 1995; Hepp *et al.* 1999; Maienschein *et al.* 1999). As astrocytes are not specialized in secretion but rather display a broader range of functions, it is expected that the molecular machinery for astroglial exocytosis differs from that operating in neurons. To the best of our knowledge, molecular exocytotic machinery in astroglial cells and its

regulation under different cellular states has not yet been comprehensively identified. In this study, we show the detailed expression pattern of exocytotic protein isoforms in cultured astrocytes. Moreover, we report regulation of the expression of these proteins in glial cells exposed to proinflammatory and differentiating agents. Finally, we found a correlation between over-expression of certain exocytotic proteins and enhancement of the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated peptide secretion in cAMP-differentiated astrocytes.

## Material and methods

### Antibodies and reagents

Actin, syntaxin-1 and  $\beta$ -tubulin isotype III (Tuj-1) monoclonal antibodies were obtained from Sigma-Aldrich (Diesenhofen, Germany). Antibodies to syntaxin-2, VAMPs, SNAP-23, and csp were purchased from Synaptic Systems (SYSY, Goettingen, Germany). Antibodies against Munc18a, synaptogyrin and syntaxin-4 were obtained from BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA), glial fibrillary acidic protein (GFAP), GluR5, and NG2 were obtained from Chemicon (Temecula, CA, USA) and CD11b from Serotec (Oxford, UK). Synaptophysin, p-STAT-1 and SNAP-25 monoclonal antibodies were obtained from Dako-Cytomation (Glostrup, Denmark), Zymed Laboratories (South San Francisco, CA, USA) and Sternberg Monoclonals Inc. (Baltimore, MD, USA), respectively. Monoclonal antibodies to Rip, SV-2,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase alpha1 subunit and  $\beta$ -tubulin were purchased from Developmental Studies Hybridoma Bank (Department of Biological Sciences, The University of Iowa, Iowa city, IA, USA). Polyclonal antibodies against syntaxin-3, syntaxin-4, Munc18b, Munc18c, and secretogranin-2 (SCG-2) were described elsewhere (Fischer-Colbrie *et al.* 1993; Riento *et al.* 1998; Torrejón-Escribano *et al.* 2002; Imai *et al.* 2004). Antibodies against green fluorescent protein (GFP) were raised in female New Zealand rabbits and were generated and purified as described previously (Majó *et al.* 1998).

Recombinant mouse TNF $\alpha$ , interleukin (IL)- $\beta$ 1 and interferon (IFN)  $\gamma$  were purchased from Preprotech, Inc. (London, UK) and 8Br-cAMP from Biolog, Life Science Institute (Bremen, Germany). 1,2-bis(2-amino-phenoxy)ethane-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid (BAPTA)-AM was from Invitrogen (Paisley, UK). Most chemicals and cell culture reagents were obtained from Sigma-Aldrich and Gibco (Invitrogen), respectively.

### Cell culture

The epithelial MDCK, glioma C6 (ATCC, Rockville, MD, USA) and U373 (ECACC, Salisbury, UK) cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum with penicillin/streptomycin at 37°C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere.

Astrocyte and neuron cultures were obtained from OF1 mice (Charles River Laboratories, Inc., Lyon, France). Animals were kept under controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humidity (40–60%) and light (12 h cycles) and treated in accordance with the European Community Council Directive (86/609/EEC) on animal welfare.

Astrocyte cultures were prepared from the cerebral cortex of 2-day-old mice as described previously (McCarthy and de Vellis 1980). Briefly, the cerebral cortex was isolated and the meninges were

carefully dissected away. Cortical tissues were then minced and incubated in 0.25% trypsin and 0.01% Dnase. Dissociated cells were seeded in flasks and grown in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium and F-12 (1 : 1) containing 10% fetal bovine serum, 10 mM HEPES and penicillin/streptomycin at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. At confluence (days 10–12), the flasks were shaken overnight and the cells were rinsed, detached and subcultured onto poly-L-lysine-coated plastic culture dishes and coverslips. Under these conditions, cell cultures were essentially formed by astrocytes and virtually devoid of neurons (92.2 ± 1.3% and 0.2 ± 0.2% GFAP<sup>+</sup> and Tuj-1<sup>+</sup> cells, respectively) (Fig. S1). Moreover, a small percentage of microglia (5.2 ± 1% CD11b<sup>+</sup> cells) and immature oligodendrocytes (2.6 ± 1.2% NG2<sup>+</sup> cells) was also detected (Fig. S1). Treatments with 0.01–1 mM 8Br-cAMP, 20 ng/mL TNF $\alpha$ , 20 ng/mL IL- $\beta$ 1, and 20 ng/mL IFN $\gamma$  were administered 1 day after subculturing. Astrocytes cultures were transfected with ANP.emd (Burke *et al.* 1997) using Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) and peptide release was assayed 48 h later. Because transfection efficacy was low in replated astrocytes, ANP.emd release was assayed in primary astrocyte cultures (> 95% of transfected cells were GFAP<sup>+</sup>).

Neuronal cultures were prepared from the cerebral cortex of E16 mouse embryos. After trypsin and Dnase treatment, dissociated cells were seeded onto poly-L-lysine-coated culture plates. Neurons were grown in Neurobasal medium containing B27 and N2 supplements (Invitrogen), glutamine and penicillin/streptomycin at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 10 days. During the first 4 days in culture were also supplemented with 20  $\mu$ g/mL 5-Fluoro-2'-deoxyuridine and 50  $\mu$ g/mL uridine (Sigma-Aldrich) to inhibit mitotic activity of glial cells. Tuj-1 immunostaining showed that more than 99% of the cells were neurons.

### Western blotting

Cultured cells and tissues were homogenized in ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Samples of post-nuclear lysates were electrophoresed in 12% and 8% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and then transferred to nitrocellulose membranes (Whatman® Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA). Urea–SDS gels were used to improve resolution of proteins of low molecular weight (Ruiz-Montasell *et al.* 1996). The membranes were blocked in a solution containing 5% non-fat milk powder in Tris-buffered saline with Tween (140 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4 and 0.1% Tween 20) for 1 h at 22–24°C and then incubated with primary antibodies in blocking buffer for 2 h or overnight at 22–24°C or 4°C, respectively. After several washes with blocking solution, the membranes were incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Vector, Burlingame, CA, USA). Bound antibodies were visualized with enhanced chemiluminescence reagents ECL™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Blot images were captured with a scanner and densitometric values were obtained using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). To obtain crude membranes, cultured cells were homogenized in 5 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 0.25 mM sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA and protease inhibitors. The suspension was centrifuged at 600 g for 10 min at 4°C and the

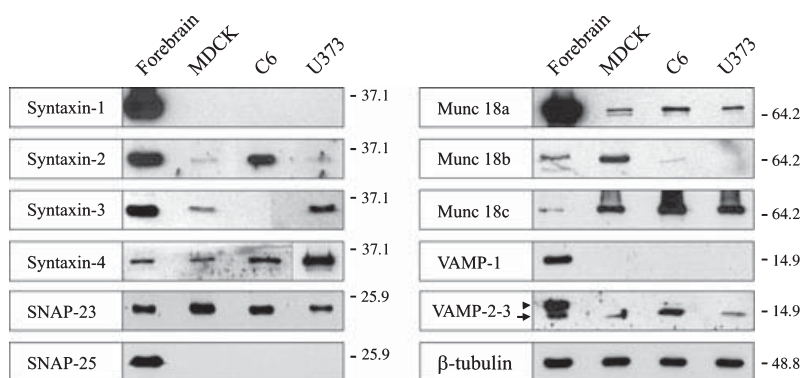
resulting post-nuclear supernatant was centrifuged at 120 000 g for 30 min at 4°C. The pellet was solubilized in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EGTA and 1% Triton X-100. Density gradient subcellular fractions from astrocytes cultures were obtained as previously reported (Majó *et al.* 1998). Cell cultures were homogenized in 0.3 M sucrose, 4 mM HEPES, pH 7.0 and protease inhibitors and centrifuged for 5 min at 600 g. The post-nuclear supernatants were collected, and subfractionated by centrifugation on a 0.3–2.0 M discontinuous sucrose gradients at 100 000 g overnight in a SW41 rotor (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA). Aliquots from gradient fractions were precipitated with 5% trichloroacetic acid, resuspended in SDS-sample buffer and analyzed by SDS–PAGE and immunoblotting.

### Immunocytochemistry

Cells grown on glass coverslips or plastic tissue dishes were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) solution and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. To suppress non-specific binding, cells were incubated in 10% serum-PBS containing 0.02% Triton X-100, 0.2% glycine and 0.2% gelatin for 1 h at 22–24°C. Then, cells were incubated with the different primary antibodies diluted in 1% serum-PBS containing 0.2% gelatin and 0.2% gelatin overnight at 4°C. After washing, the cells were incubated with secondary fluorochrome-conjugated antibodies (Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 568; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and the nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes). The specificity of the immunoreaction was tested by omitting the primary antibody or by replacing it with an equivalent concentration of non-specific IgG. No immunostaining was observed in these conditions. Double immunofluorescences were performed by using primary antibodies raised in different species. Cell-type percentages in control and treated cultures were evaluated in cells grown on similar plastic dishes used for western blotting analysis. Fluorescent images were obtained with the Olympus fluorescent BX-61 (Olympus Corp., Tokyo, Japan) and Leica TCS SPE scanning confocal microscopes. (Leica microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

### Peptide release

Astrocytes were seeded in poly-L-lysine-coated tissue culture dishes, to minimize cell loss; 100- and 35-mm culture plates were used to analyze SCG-2 and ANP.emd release, respectively. Before the release experiment, astrocytes were rinsed twice with serum-free medium and deprived for 2 h. Cells were rinsed again and incubated in serum free-medium containing 1  $\mu$ M ionomycin and 0.1  $\mu$ M phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA) or dimethylsulfoxide as control at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. At the indicated times after incubation, conditioned medium was collected and lysis buffer was added to the cells (see above). Cell media were centrifuged at 600 g for 5 min to remove dislodged cells and proteins were precipitated with 5% trichloroacetic acid using bovine serum albumin as carrier. In some cases, proteins from the media were concentrated by Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation; Beverly, MA, USA) and then precipitated with 5% trichloroacetic acid. SCG-2 and ANP.emd were analyzed both in media and cells by SDS–PAGE and immunoblotting with antibodies against SCG-2 and GFP, respectively.



**Fig. 1** Immunoblot analysis of exocytotic proteins in astroglial cell lines. Ten micrograms of proteins of forebrain, epithelial MDCK cells and astroglioma C6 and U373 cells were analyzed by immunoblotting for the presence of syntaxin-1–4, SNAP-23, SNAP-25, Munc18a–c, and VAMP-1–3.  $\beta$ -tubulin was used as a loading control. The arrow-

head and arrow indicate the VAMP-2 and VAMP-3 bands, respectively, recognized by the same antibody. In the C6 and U373 cells, syntaxin-4 was identified by species-specific antibodies. The mobility of molecular mass markers (in kDa) is indicated, here and in subsequent figures.

### Statistical analysis

Student's *t*-test was used for statistical evaluation. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

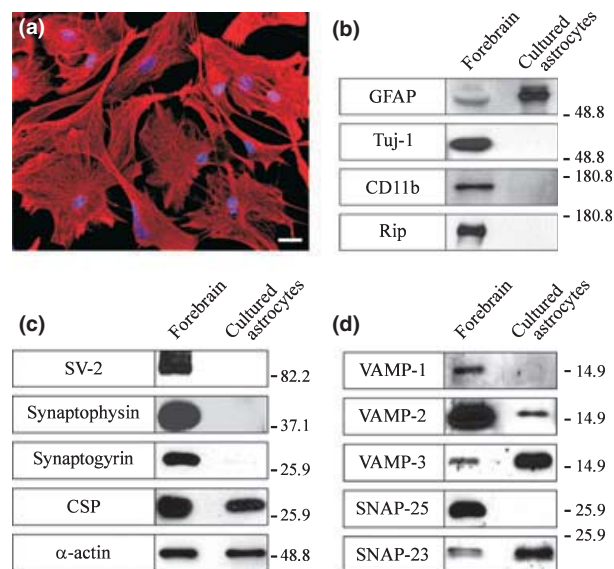
## Results

### Differential expression of exocytotic proteins in cultured astrocytes

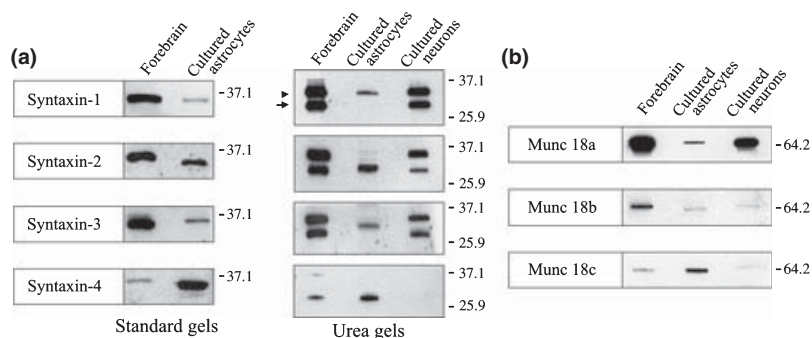
To study the expression of exocytotic proteins in astrocytes, first we analyzed their presence in the astroglial cell lines C6 and U373 by western blotting (Fig. 1). The isoform specificity of antibodies was confirmed by parallel analysis of lysates from brain and the epithelial cell line MDCK. In astroglial cell lines, expression of SNAP-23 and VAMP-3 was abundant, VAMP-2 barely detected and SNAP-25 and VAMP-1 undetectable. Among the plasma membrane syntaxins, type 4 was consistently expressed in C6 and U373 cells. Syntaxin-2 was highly expressed in C6 but not in U373 cells, while the opposite was observed for syntaxin-3. Extremely low levels were detected for syntaxin-1 (only revealed by over-exposure of the film; data not shown). Finally, expression of Munc18a was found to be high in brain lysates, but low in glial cell lines. Conversely, Munc18c expression was low in brain lysates, but very high in glial cell lines.

Next, we analyzed the expression of exocytotic proteins in astrocytes from primary culture. GFAP was highly enriched in the glial cultures, consistent with a strong prevalence of astrocytes (Fig. 2a, b and Fig. S1). Analysis of different vesicular proteins revealed that csp, VAMP-3 and, to a lesser extent, VAMP-2 were present in astrocyte cultures (Fig. 2c and d). In contrast, glial cultures lacked of the typical neuronal proteins SV-2, synaptophysin and synaptogyrin (Fig. 2c) (Zhang *et al.* 2004a,b). The Q-SNARE protein SNAP-23 was detected in astrocytes, but SNAP-25 was not (Fig. 2d).

Syntaxin forms 1–4 were all detected in astroglial cultures, but at different levels (Fig. 3a). Thus, the most abundant syntaxins were forms 4 and 2, whereas syntaxin-1 was poorly represented (Fig. 3a). Because syntaxin-1, -2, and -3 display a variety of isoforms, arising from related gene products or because of alternative splicing (Bennett *et al.* 1993), we



**Fig. 2** Exocytotic proteins in cultured astrocytes. (a) GFAP immunofluorescence (red) and DAPI nuclear staining (blue) show that astrocytes are the main cell type present in cell cultures. Scale bar: 30  $\mu$ m. (b) Immunoblot analysis of cell-type markers of forebrain and cultured astrocytes. (c) Immunoblot analysis of the neuronal exocytotic proteins SV-2, synaptophysin, synaptogyrin and csp.  $\alpha$ -actin was used as a loading control. (d) Identification of SNARE protein isoforms VAMP-1–3 and SNAP-25 and -23 in astroglial cultures. In (b–d), 3 and 10  $\mu$ g of protein/lane were loaded from forebrain and cultured astrocytes, respectively.



**Fig. 3** Differential expression of syntaxin and Munc18 isoforms in astrocyte and neuron cultures. (a) Immunoblot analysis of the four plasma membrane syntaxins in forebrain and astrocyte and neuron cultures by standard and urea gels. The arrowhead and arrow indicate

analyzed the expression pattern of syntaxin isoforms by resolving astroglial and neuronal lysates in urea-SDS gels. As shown in Fig. 3(b), brain and cultured neurons expressed the two syntaxin-1 isoforms equally (Bennett *et al.* 1993; Ruiz-Montasell *et al.* 1996). In contrast, syntaxin-1B was consistently revealed as the only syntaxin-1 isoform expressed in glial cell cultures (Fig. 3a). Separate bands were also resolved for syntaxin types 2 and 3 in brain and cultured neurons (Fig. 3a). Once more, only a single band for each syntaxin was detected in astrocyte cultures (Fig. 3a). Because no information is available about the electrophoretic mobility of individual syntaxin-2 and -3 isoforms, a mobility-based identification of particular isoforms is not feasible. Moreover, syntaxin-4 was clearly represented in astrocyte cultures, but not in neuronal cells (Fig. 3a). Cultured astrocytes mainly expressed Munc18c and Munc18a, whereas a weak signal was found for Munc18b (Fig. 3b). The localization of SNARE and Munc18 proteins in single astrocytes is shown by immunofluorescence.

We conclude that, as compared to neurons, astrocytes display a distinctive profile of exocytotic proteins. The characteristic expression pattern of exocytotic proteins in astrocytes suggests their involvement in specialized membrane fusion processes.

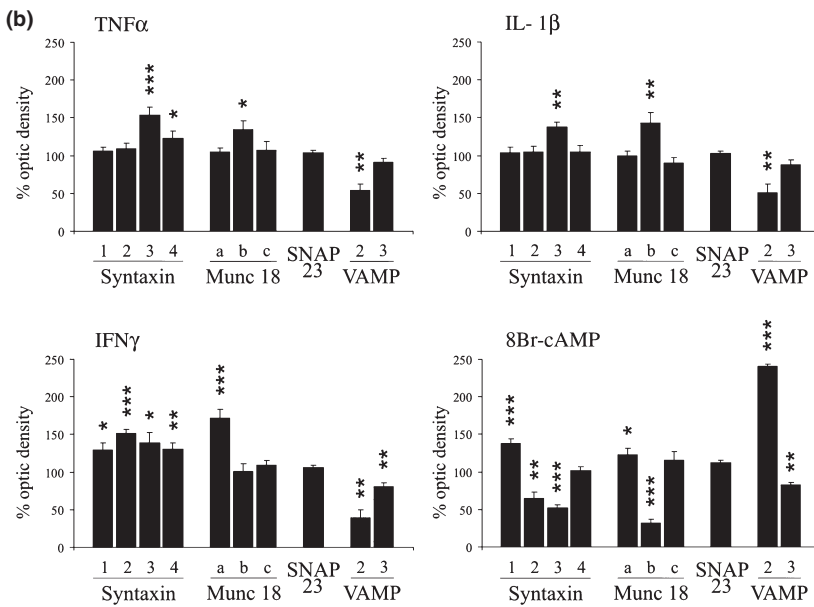
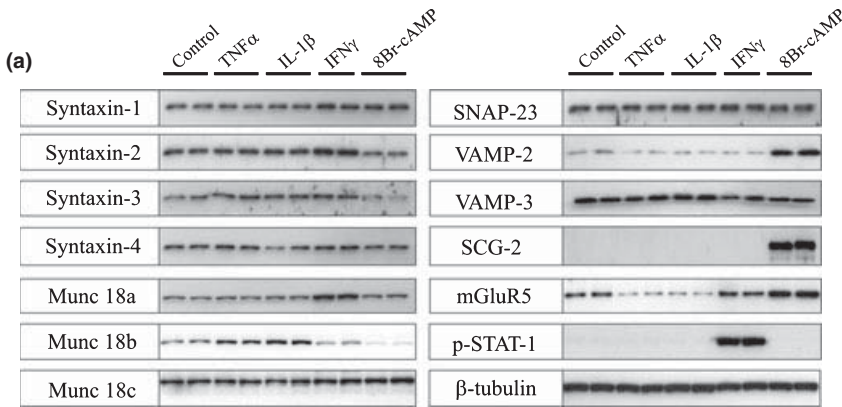
#### Proinflammatory and differentiating agents exert opposite effects on the expression of exocytotic proteins in cultured glial cells

Specialized astrocyte functions depend on the cellular state. For instance, neural homeostasis and synaptic function are controlled by differentiated astrocytes, whereas a reactive glial phenotype is involved in repair and inflammatory processes (Kettenmann and Ransom 2004). To associate particular exocytotic proteins with different astrocyte states, the expression of exocytotic protein isoforms was analyzed in astrocyte cultures treated with activating and differentiating agents. Expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR5, the glutamate transporter GLT-1, phos-

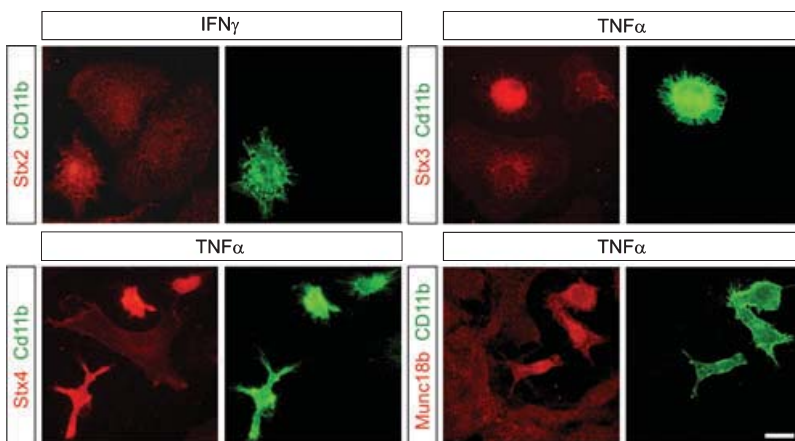
phorylated STAT-1 transcription factor and  $\beta$ -tubulin were used as positive and loading controls (Schlag *et al.* 1998; Tilleux *et al.* 2007).

The proinflammatory molecules  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , and  $\text{IFN}\gamma$  were used for activation of glial cultures (John *et al.* 2003). Western blotting analysis revealed that  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  treatments mainly enhanced the content of syntaxin-3 and Munc18b in astrocyte cultures, compared to untreated cells (Fig. 4a,b). Moreover,  $\text{IFN}\gamma$  exposure increased the amount of Munc18a and syntaxin types, whereas VAMP-2 was consistently decreased in each proinflammatory treatment (Fig. 4a,b). Levels of exocytotic protein in single astrocytes were determined by double-labeling immunofluorescence. No evident changes in the fluorescence intensity were detected in astrocytes after cytokine treatments (data not shown). Because long-term exposure of primary cultures to cytokines could alter cell composition, percentages of cellular populations were analyzed in treated cultures. The number of oligodendrocytes was slightly increased by  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  administration; however, the cell population showing the most marked changes during cytokine treatments was microglia (Fig. S1; Ganter *et al.* 1992; Arnett *et al.* 2001). Thus, microglia population was 3.49-, 2.35-, and 1.47-fold higher after  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , and  $\text{IFN}\gamma$  treatments, respectively (Fig. S1). Importantly, strong immunofluorescence for syntaxin-2, -3, and -4 and Munc18b was detected in cytokine-treated microglial cells, compared to astrocytes (Fig. 5). We conclude that proinflammatory cytokine administration changes the content of different exocytotic proteins in cultured glial cells. Moreover, we show for the first time that microglial cells express non-conventional brain exocytotic proteins abundantly. Because proinflammatory cytokine treatments enhanced microglial population in primary cultures, it is conceivable that an increase in non-astrocytic populations may contribute to the observed cytokine-induced changes in exocytotic proteins.

To induce a differentiated phenotype of astrocytes we exposed cell cultures to permeable cAMP analogs (Shain



**Fig. 4** Expression of exocytotic proteins in cultured glial cells during proinflammatory and differentiating treatments. (a) Cell lysates (10 μg of protein/lane) from cell cultures treated with TNFα (20 ng/mL), IL-1β (20 ng/mL), IFNγ (20 ng/mL), and 8Br-cAMP (1 mM) for 8 days were analysed by SDS/PAGE and immunoblotting by using antibodies recognizing syntaxin-1–4, Munc18a–c, SNAP-23, VAMP-2–3, and SCG-2. mGluR5 and p-STAT-1 were detected as a positive controls and β-tubulin as a loading control. (b) Histogram summarizing the effect of proinflammatory and differentiating treatments on the content of exocytotic proteins in glial cultures. Bars represent percent variation after treatments with respect to the control value. Values represent the mean ± SEM of at least three independent experiments performed in duplicate. Asterisks indicate differences from controls (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; and \*\*\**p* < 0.001).



**Fig. 5** Exocytotic proteins in cultured microglia after incubations with proinflammatory cytokines. Cultures treated with TNFα and IFNγ for 8 days were double-immunolabeled with antibodies against syntaxin-2–4 and Munc18b and the microglial marker CD11b. Photographs show a stronger labeling for exocytotic proteins in microglial cells (CD11b<sup>+</sup>) compared with astrocytes (CD11b<sup>-</sup> cells). Scale bar: 20 μm.

*et al.* 1987; Ferroni *et al.* 1995; Schlag *et al.* 1998; McManus *et al.* 1999). 8Br-cAMP-induced differentiation in astrocytes was recognized by the distinctive star-shaped GFAP morphology (Fig. 5 and Fig. S1) and the up-regulation of the glutamate transporter GLT-1 (data not shown)

(Schlag *et al.* 1998). In contrast to proinflammatory treatments, the large prevalence of astrocytes was consistently preserved in cell cultures after cAMP treatment (95.1 ± 1% GFAP<sup>+</sup> cells; Fig. S1). Interestingly, exocytotic proteins whose levels were enhanced by proinflammatory cytokines,

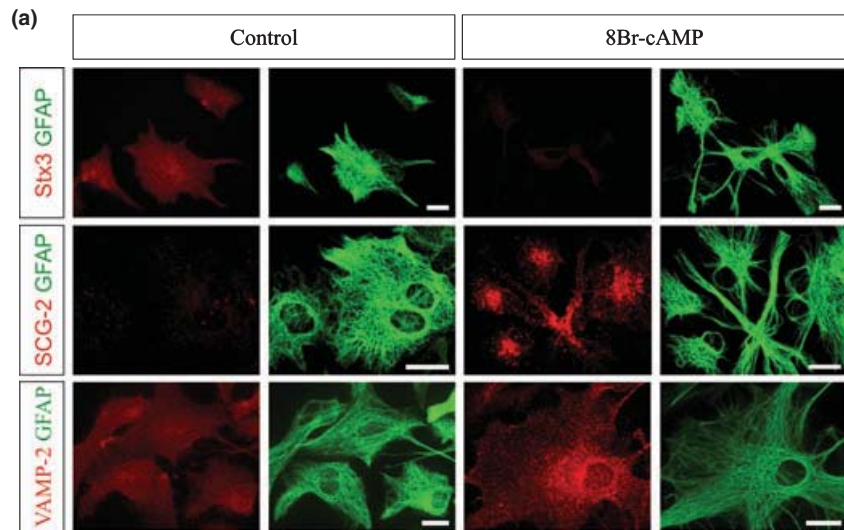
such as syntaxin-2 and -3 and Munc18b, were substantially down-regulated after 8Br-cAMP treatment (Fig. 4a,b). On the contrary, the content of typical proteins that control Ca<sup>2+</sup>-dependent secretion, such as VAMP-2, syntaxin-1 and Munc18a, were up-regulated (Fig. 4a,b). We further examined the content of the chromogranin-SCG family member, SCG-2 in treated cultures. SCG-2 is considered a peptidergic vesicle marker of the regulated secretory pathway with important intracellular roles in sorting and secretory granule formation (Taupenot *et al.* 2003). 8Br-cAMP administration dramatically increased the cellular content of SCG-2 whereas administration of cytokines did not (Fig. 4a). Immunofluorescence analysis confirmed that the main cAMP-induced changes detected in culture lysates did occur in single astroglial cells. For instance, Fig. 6a shows the opposite regulation of syntaxin-3 and the vesicular proteins SCG-2 and VAMP-2 by 8Br-cAMP in GFAP<sup>+</sup> astrocytes. Finally, the expression regulation of exocytotic and secretory protein levels by cAMP was time- and dose-dependent, as shown for SCG-2 (Fig. 6b and c).

Taken together, the present results show that proinflammatory and differentiating agents exert opposite effects on

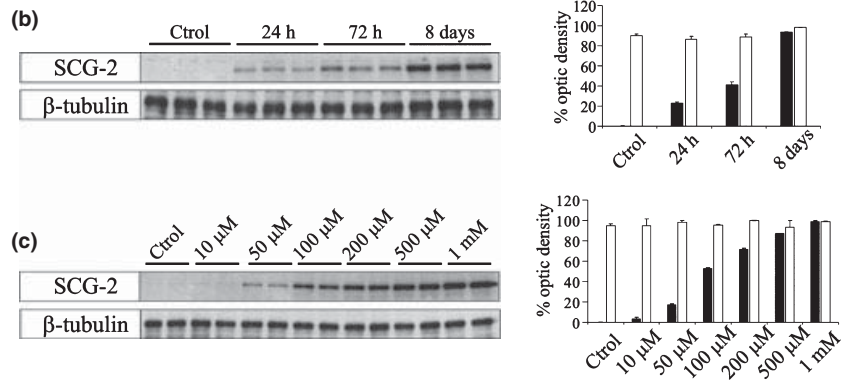
the expression of exocytotic proteins in cultured glial cells. Moreover, proteins typically involved in the Ca<sup>2+</sup>-regulated secretory pathway are specifically up-regulated in astrocytes by long-term administration of cAMP analogs.

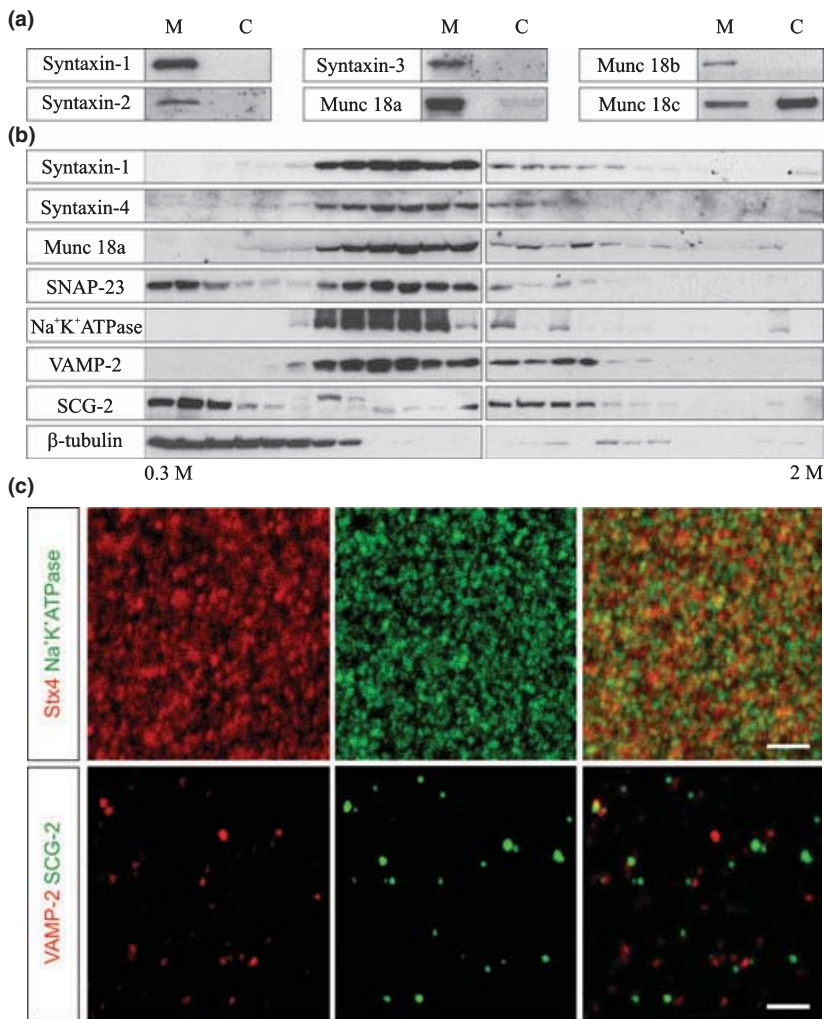
**Ca<sup>2+</sup>-dependence of basal and stimulated SCG-2 release in cAMP-treated astrocytes**

The above data showing the distinctive regulation of exocytotic and secretory proteins in cultured astrocytes may suggest that cAMP-induced differentiation makes regulated secretion in astrocytes more efficient. Therefore, we next investigated Ca<sup>2+</sup>-triggered peptide release in 8Br-cAMP-exposed astrocytes. Firstly, we examined the subcellular localization of secretory components in cAMP-treated astrocytes. SNARE proteins are integral and palmitoylated proteins, whereas cytosolic Munc18 isoforms are associated with the plasma membrane by syntaxin interaction (Jahn and Scheller 2006; Toonen and Verhage 2007). Crude membrane fractionation showed a differential distribution of Munc18 isoforms in astrocytes (Fig. 7a). Thus, while Munc18 types a and b were entirely associated with



**Fig. 6** Regulation of exocytotic and secretory proteins in astrocytes by 8Br-cAMP. (a) Cultured cells treated with 1 mM 8Br-cAMP for 8 days were double-immunolabeled with antibodies against syntaxin-3, SCG-2 or VAMP-2 and GFAP. Note the GFAP rearrangement and the opposite changes in syntaxin-3 and SCG-2 and VAMP-2 immunostaining in astrocytes induced by 8Br-cAMP. Scale bar: 20 μm. (b) Progressive 8Br-cAMP-induced increase of SCG-2 content over time. (c) 8Br-cAMP dose-dependent regulation of SCG-2 content. In (b and c) 10 μg of cell lysates were analyzed by immunoblotting. Solid and open bars represent the content of SCG-2 and β-tubulin, respectively.



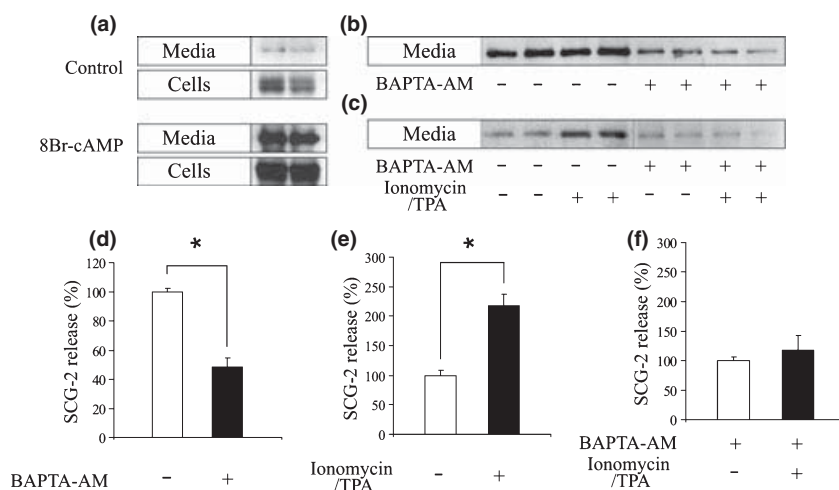


**Fig. 7** Subcellular distribution of exocytotic proteins in 8Br-cAMP-treated astrocytes. (a) Membrane (M) and cytosol (C) distribution of astroglial Munc18 isoforms. (b) Equilibrium sucrose density gradient analysis of exocytotic proteins in astrocytes. The blots are representative of four independent experiments. (c) Representative confocal analysis of syntaxin-4 and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase or VAMP-2 and SCG-2 in a single section. Scale bar: 1  $\mu$ m.

membranes, a substantial pool of Munc18c was found in the cytosolic fractions (Fig. 7a). We also characterized subcellular membranous compartments of astrocyte proteins by density gradient fractionation and immunofluorescence (Fig. 7b,c). Syntaxin and Munc18 proteins were essentially detected in fractions containing the plasma membrane marker Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (Fig. 7b). In agreement with this, equivalent immunostaining patterns for syntaxins and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase were observed in the astrocyte plasma membrane by confocal microscopy (Fig. 7c, see also Fig. 5 for lower magnification of syntaxin-4 immunolabeling). Like the syntaxins, the t-SNARE SNAP-23 was localized in plasma membrane-enriched fractions, however, an apparently unpalmitoylated soluble form was also found (Fig. 7b). VAMP-2 and VAMP-3 were mainly detected in light membrane fractions, consistent with their location on non-peptide transmitter-containing small vesicles (Fig. 7b). SCG-2 was observed in heavy membrane and cytosolic fractions, corresponding to intact and broken secretory granules, respectively (Fig. 7b). The parallel regulation by 8Br-cAMP and the colocalization in subcellular

fractions of SCG-2 and VAMP-2 could indicate the coexistence of these proteins in individual vesicles. However, double immunolabeling revealed that SCG-2 and VAMP-2 were mainly associated with different vesicle subsets (SCG-2<sup>+</sup>/VAMP-2<sup>+</sup> vesicles 4.7  $\pm$  1.1%,  $n$  = 1039 vesicles, Fig. 7c). According to the SNARE hypothesis, these data show that different exocytotic proteins in astrocytes are correctly positioned to underlie secretion (Jahn and Scheller 2006).

Next, we analyzed the Ca<sup>2+</sup>-regulated secretion of astroglial peptides by monitoring SCG-2 release. As shown above, SCG-2 levels were very low in cell lysates of non-treated cultures, but dramatically increased by cAMP exposure (Fig. 8a). The amounts of SCG-2 released into the media were relative to the cell content. Basal secretion over 3 h was almost undetectable in untreated cultures, but very high in treated cells (Fig. 8a). Because SCG-2 expression was weak in non-treated astrocytes, the Ca<sup>2+</sup>-dependence of SCG-2 secretion was only analyzed in 8Br-cAMP-treated cells. First, we considered whether intracellular Ca<sup>2+</sup> contributes to the basal release of astroglial SCG-2. We used the membrane



**Fig. 8**  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of SCG-2 secretion from astrocytes. (a) Basal release over 3 h (media) and cellular content (10  $\mu\text{g}$  of protein/lane; cells) of SCG-2 in untreated (control) and 8Br-cAMP-treated (8Br-cAMP) astrocytes. (b) Representative immunoblotting of the basal SCG-2 secretion over 2 h from BAPTA-unloaded or -loaded 8-Br-cAMP-differentiated astrocytes. (c) Immunoblot illustrating the stimulated SCG-2 secretion over 10 min from BAPTA-unloaded

or -loaded 8-Br-cAMP-differentiated astrocytes. Each lane represents proteins from one individual culture dish (a–c). (d–f) Histograms showing quantification of released SCG-2 in the media from 2 h basal (d) and 10 min stimulated BAPTA-unloaded (e) or -loaded (f) 8-Br-cAMP-differentiated astrocytes. Values represent the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Asterisks indicate differences from controls ( $*p < 0.001$ ).

permeable chelator BAPTA-AM to sequester free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Comparing the amount of released SCG-2 into the media over 2 h, we found that BAPTA loading markedly reduced basal SCG-2 secretion in astrocytes (to 48.4% of the control; Fig. 8b). Conversely, we triggered  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation by using the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore ionomycin together the protein kinase C (PKC) activator TPA. Stimulation with 1  $\mu\text{M}$  ionomycin and 100 nM TPA for 10 min increased SCG-2 release from astrocytes to 218.7% of basal levels (Fig. 8e). Moreover, the prevention of the ionomycin/TPA-triggered enhancement of SCG-2 secretion by BAPTA-AM pretreatment supports the involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  in the release of this protein (Fig. 8e). These results show that SCG-2 secretion from long-term cAMP treated astrocytes displays a marked dependence on the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

#### cAMP-induced differentiation enhances $\text{Ca}^{2+}$ -regulated secretion of peptides in astrocytes

To compare the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated peptide secretion in untreated and cAMP-treated astrocytes we carried out release assays with the emdGFP-tagged hormone ANP.emd (Burke *et al.* 1997). This fusion hormone has previously been used to show a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis of exogenous peptides in cultured astrocytes by life imaging (Krzan *et al.* 2003). ANP.emd was correctly detected in transfected astrocyte lysates by western blotting using new generated antibodies against GFP (Fig. 9a; Burke *et al.* 1997). Moreover, intense emd fluorescence in astrocytes was specifically detected in SCG-2-containing secretory vesicles (ANP.emd<sup>+</sup>/SCG-2<sup>+</sup> vesicles 98.86  $\pm$  0.48%,  $n = 614$  vesicles) (Fig. 9b,c).

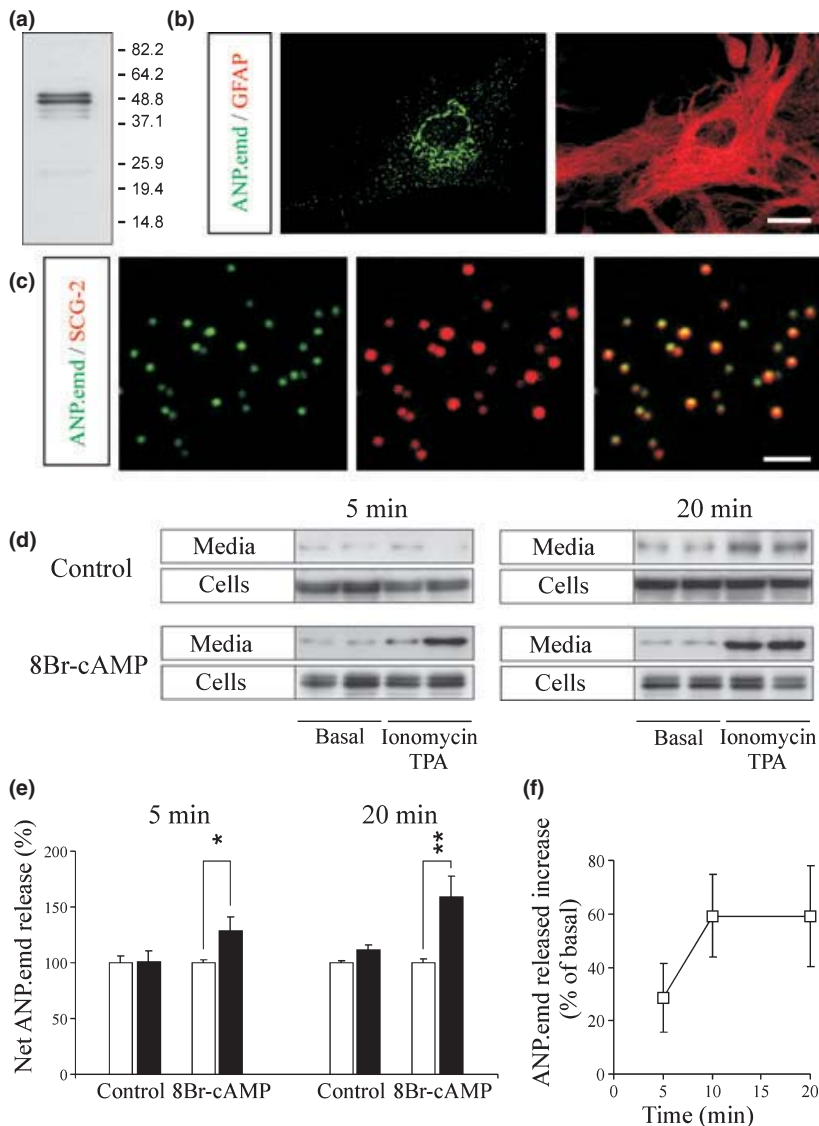
$\text{Ca}^{2+}$ -triggered secretion of chimeric ANP was analyzed in the culture media of control and cAMP-differentiated astrocytes by western blotting. In control cells, compared with unstimulated cultures, no changes were observed in the released ANP.emd after exposure to ionomycin/TPA stimulus (Fig. 9d,e). In striking contrast, cAMP-differentiated astrocytes showed a notable  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated hormone secretion. Thus, a significant increase over the basal release was noticed for the ANP.emd secreted as soon as five min after ionomycin/TPA administration (Fig. 9d,e). At the two times analyzed, a significant enhancement of 128% (5 min) and 159% (20 min) of  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered hormone secretion was found in differentiated astrocytes compared with control cells (Fig. 9e). Furthermore, consistent with a stimulus-regulated secretory pathway, ANP.emd release from differentiated astrocytes showed a non-linear response with the highest secretion occurring during the first minutes (Fig. 9f). We conclude that cAMP-induced astrocyte differentiation increases regulated peptide secretion.

## Discussion

### Exocytotic molecular components in astrocytes

Here, we show the comprehensive profile of the core proteins of the exocytotic machinery in cultured astrocytes. Characteristically, the main isoforms of the R- and Q-SNARE and Munc18 families detected in astrocytes greatly differ from those expressed by neurons. Thus, while neurons mainly display syntaxin-1, Munc18a, SNAP-25, and VAMP-2, the





**Fig. 9** Enhanced  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered ANP.emd secretion in 8Br-cAMP-treated astrocytes. (a) Immunoblot analysis of 10  $\mu\text{g}$  of protein from ANP.emd-transfected cell lysate using antibodies against GFP. (b) Distribution of ANP.emd fluorescence in identified astrocytes (GFAP<sup>+</sup>), scale bar: 15  $\mu\text{m}$ . (c) Confocal analysis of ANP.emd and SCG-2 in a single section, scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . (d) Immunoblots illustrating the ionomycin/TPA-stimulated ANP.emd secretion over 5 and 20 min from transfected undifferentiated (control) and 8-Br-cAMP-differentiated (8Br-cAMP) cells. Each lane represents all the proteins present in the medium and cell lysate from one individual culture plate. (e) Histograms showing quantification of released ANP.emd in the media of undifferentiated and 8-Br-cAMP-differentiated astrocytes 5 and 20 min after ionomycin/TPA addition. Values were normalized to total ANP.emd and represent the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Asterisks indicate differences from controls (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ).

predominant expression of syntaxin-4, Munc18c, SNAP-23, and VAMP-3 is a hallmark of normal and tumor-derived astroglial cells. Therefore, astroglial cells display distinctive molecular components for exocytosis.

The number of proteins involved in the later steps of membrane fusion is rather limited; however, a large number of isoforms of the core proteins have been identified (Jahn and Scheller 2006). Here, we reveal that astrocytes express a number of isoform proteins for their exocytotic molecular machinery. The prevalence of the Q-SNARE SNAP-23 in astrocytes is in agreement with previous studies and supports the notion that the SNAP-23 isoform replaces SNAP-25 functions in non-neuroendocrine cells (Parpura *et al.* 1995; Ravichandran *et al.* 1996; Hepp *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2004a; Montana *et al.* 2006). According to previous reports, we found that the isoforms involved in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neurosecretion syntaxin-1, Munc18a, and VAMP-2 are

present both in neurons and astrocytes (Maienschein *et al.* 1999; Montana *et al.* 2006; Parpura *et al.* 1995; Zhang *et al.* 2004a). Interestingly, we found the 1B variant as the only syntaxin-1 detected in astrocytes, in accordance with the heterogeneous distribution reported for the syntaxin-1 isoforms (Ruiz-Montasell *et al.* 1996; Aguado *et al.* 1999). Because glial cells are no *professional* secretory cells, it is conceivable that limited quantities of these proteins are sufficient to underlie the regulated secretion reported for astrocytes (Calegari *et al.* 1999; Coco *et al.* 2003; Krzan *et al.* 2003; Bezzi *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005; Mothet *et al.* 2005; Bowser and Khakh 2007; Zhang *et al.* 2007).

In addition to the proteins mediating  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered exocytosis, astrocytes abundantly express syntaxin-4 and -2, Munc18c and VAMP-3. Although the functional significance of these ubiquitous exocytotic proteins in the CNS is poorly known, a role in the stimulus-dependent secretion has

been proposed in non-neural cell types (Flaumenhaft 2003; Imai *et al.* 2004; Borisovska *et al.* 2005). Therefore, astrocyte-enriched exocytotic isoforms may participate in regulated glial secretion. One basic question about SNARE isoforms is whether co-expression of different members of the same family represents a redundant mechanism or confers specificity (Jahn and Scheller 2006). Recent studies using knockout mice have suggested that although different Q-SNARE isoforms can underlie the same exocytotic process, particular variants confer distinctive properties to support specialized secretory functions (Sørensen *et al.* 2003). Moreover, specific VAMP isoforms selectively drive the secretion of granule subsets in mast cells (Puri and Roche 2008). Thus, it is possible that the presence of a variety of SNARE isoforms in astrocytes reflects heterogeneity in the glial secretory exocytosis. Particularly, the recent evidence that astrocytes display a prominent  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent lysosomal exocytosis suggests that syntaxin-4 and SNAP-23 contribute to regulated lysosomal fusion (Rao *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007; Li *et al.* 2008). Finally, as astrocyte-enriched exocytotic proteins are involved in membrane fusion processes with non-secretory purposes (i.e. receptor, channel and transporter translocation), specific interaction among different syntaxin, VAMP, and Munc18 isoforms could underlie astroglial non-secretory exocytosis (Chieriegatti and Meldolesi 2005; Stenovec *et al.* 2008). Future loss-of-function experimental approaches are required to elucidate the contribution of distinctive SNARE isoforms to specialized glial exocytosis.

#### **Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytotic apparatus and peptide secretion in 8Br-cAMP-differentiated astrocytes**

Most studies analyzing the regulated secretory pathway in astrocytes have been performed on primary cultures (Calegari *et al.* 1999; Araque *et al.* 2000; Coco *et al.* 2003; Krzan *et al.* 2003; Bezzi *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2004a,b; Mothet *et al.* 2005; Bowser and Khakh 2007; Zhang *et al.* 2007; Chen *et al.* 2005). Although the precise state of cultured astrocytes is controversial, it is thought that astroglial cells in culture display a non-fully differentiated phenotype and are probably activated (Kettenmann and Ransom 2004). Long-term treatment of astrocytes cultures with permeable cAMP analogs induces morphological (stellate appearance), biochemical [production of GFAP and inositol (1,4,5)-trisphosphate] and physiological (membrane  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  conductances and glutamate clearance) changes which are believed as indicators for astrocyte differentiation (Shain *et al.* 1987; Ferroni *et al.* 1995; Schlag *et al.* 1998; McManus *et al.* 1999). We show here that a set of proteins typically involved in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent transmitter release are differentially up-regulated in astrocyte cultures during cAMP-induced differentiation. This finding may suggest that cAMP exposure increases regulated secretion in astrocytes. A study showing that long-term addition of dibutyryl cAMP increased syntaxin-1 and VAMP-2 content

and the evoked-release of glutamate in cultured astrocytes supports these observations (Shiga *et al.* 2006).

In agreement with previous reports (Fischer-Colbrie *et al.* 1993; Calegari *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2007), we observed that SCG-2 content and secretion in cultured astrocytes is extremely low. In contrast, and consistent with the presence of a functional cAMP-response element in the SCG-2 promoter (Taupenot *et al.* 2003), we found that content of SCG-2 is dramatically enhanced by 8Br-cAMP in astrocytes. As originally detected in non-treated astrocytes by the sensitive techniques radioimmunoassay and metabolic labeling (Fischer-Colbrie *et al.* 1993; Calegari *et al.* 1999), we show that basal SCG-2 secretion from cAMP-treated astrocytes is very high. Moreover, we demonstrate here that basal SCG-2 secretion in astroglial cells is dependent on resting  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . These findings agree with the proposal that the astrocyte-expressed Q-SNARE SNAP-23 leads to high levels of basal secretion of peptidergic hormones at low  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Chieriegatti *et al.* 2004). Taking advantage of the increased levels of intracellular SCG-2 because of 8Br-cAMP, we show here that a  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered release of endogenous glial peptides is detected in the culture medium as soon as 5 min after stimulus (data not shown). The  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence on SCG-2 release was further confirmed by the virtual abolition of ionomycin/TPA-triggered secretion by pre-incubation of astrocytes with the fast  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA-AM. These data support the idea that astrocytes display a  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated secretory pathway (Montana *et al.* 2006). Furthermore, we propose the use of permeable cAMP analogs as a *priming* treatment to study regulated secretion of endogenous peptides in cultured astrocytes.

A  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent release of peptides has been shown in cultured astrocytes after ionomycin application by imaging fluorescence of transfected ANP.emd (Krzan *et al.* 2003). However, under similar conditions, we were not able to detect a increase of released ANP.emd in the medium. The limited number of  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated exocytosis rapidly detected by live imaging probably cannot be distinguished from the basal secretion in the media by immunoblot analysis over longer times. In contrast to untreated cells, elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in cAMP-differentiated astrocytes causes an increase in released ANP.emd. This finding indicates that cAMP signaling improves the regulated secretory pathway in astrocytes. Moreover, the differential changes of exocytotic proteins detected in astrocytes during cAMP-induced differentiation suggest the involvement of distinctive exocytotic proteins in regulated peptide release. Because astrocytes secrete proteins that control development and activity of neuronal circuits, a functional role for  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated release of peptides from astrocytes *in vivo* is conceivable.

#### **Exocytotic proteins in activated glia**

TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN $\gamma$  are potent proinflammatory cytokines activating astrocytes and microglial cells *in vivo* and

*in vitro* (John *et al.* 2003). In the present study, we show that exocytotic protein content in astrocyte cultures is changed by proinflammatory cytokines. Although certain proteins, such as VAMP-2, were similarly regulated by the three cytokines, other, such as Munc18a and Munc18b, were equally changed by TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  but differently affected by IFN $\gamma$ . These different responses are probably related to divergences in the signaling initiated by IFN $\gamma$  and those triggered by TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Even though very limited information is available about the secretory machinery in activated astrocytes, the identification of Munc18a (Stxbp1) as a gene induced in response to IFN $\gamma$  in cultured astrocytes by microarray analysis supports the notion that exocytotic proteins are adjusted during astroglial activation (Halonen *et al.* 2006). Interestingly, long-term administration of proinflammatory and differentiating agents exerts opposite effects on the expression levels of distinctive exocytotic proteins in cultured astrocytes. Because astrocytes are very versatile, it is conceivable that expression of exocytotic protein in astrocytes could be regulated during different cellular states to achieve specific exocytotic processes.

Importantly, the present results show for the first time that a set of exocytotic proteins (i.e. syntaxin-2, -3, and -4) are robustly expressed by microglia. Recently, the over-expression of these proteins during macrophage activation and their involvement in cytokine release was reported (Pagan *et al.* 2003). Therefore, exocytotic proteins controlling the secretion of adverse mediators in inflammatory diseases have been proposed as novel targets for therapy (Stow *et al.* 2006). Because it is believed that cultured microglia display a permanent state of activation, the exocytotic proteins detected in microglia might reflect the composition of the exocytotic machinery in activated cells (Kettenmann and Ransom 2004). As microglia and astroglial cells are resident mediators of immune and inflammatory responses in the CNS, a role for glial exocytotic proteins in neuroinflammation is suggested.

## Acknowledgements

We thank Drs E. Levitan and I. Cristea for ANP.emd and GST-GFP constructs, respectively; Drs E. Soriano, B. Castellano, F. Pérez-Brangulí, and E. Pozas for helpful discussions; and C. Evans for editorial assistance. Antibodies to Rip, SV-2, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase  $\alpha$ 1 subunit and  $\beta$ -tubulin were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa. This study was supported by Spanish Ministry of Education and Science Grants BFU-2004-01154 and BFU2007-67889 to FA and BFU2005-02202 to JB.

## Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Cellular composition of astroglial cultures after cytokine and cAMP treatments.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## References

- Aguado F., Majó G., Ruiz-Montasell B., Llorens J., Marsal J. and Blasi J. (1999) Syntaxin 1A and 1B display distinct distribution patterns in the rat peripheral nervous system. *Neuroscience* **88**, 437–446.
- Allan S. M. and Rothwell N. J. (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 734–744.
- Araque A., Li N., Doyle R. T. and Haydon P. G. (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci.* **20**, 666–673.
- Araque A., Carmignoto G. and Haydon P. G. (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 795–813.
- Arnett H. A., Mason J., Marino M., Suzuki K., Matsushima G. K. and Ting J. P. (2001) TNF $\alpha$  promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat. Neurosci.* **4**, 1116–1122.
- Bennett M. K., Garcia-Ararras J. E., Elferink L. A., Peterson K., Fleming A. M., Hazuka C. D. and Scheller R. H. (1993) The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* **74**, 663–673.
- Bezzi P., Gunderson V., Galbete J. L., Seifert G., Steinhäuser C., Pilati E. and Volterra A. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* **7**, 613–620.
- Borisovska M., Zhao Y., Tsytsyura Y., Glyvuk N., Takamori S., Matti U., Rettig J., Südhof T. and Bruns D. (2005) v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *EMBO J.* **24**, 2114–2126.
- Bowser D. N. and Khakh B. S. (2007) Two forms of single-vesicle astrocyte exocytosis imaged with total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 4212–4217.
- Burke N. V., Han W., Li D., Takimoto K., Watkins S. C. and Levitan E. S. (1997) Neuronal peptide release is limited by secretory granule mobility. *Neuron* **19**, 1095–1102.
- Calegari F., Coco S., Taverna E., Bassetti M., Verderio C., Corradi N., Matteoli M. and Rosa P. (1999) A regulated secretory pathway in cultured hippocampal astrocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 22539–22547.
- Chen X., Wang L., Zhou Y., Zheng L. H. and Zhou Z. (2005) ‘Kiss-and-run’ glutamate secretion in cultured and freshly isolated rat hippocampal astrocytes. *J. Neurosci.* **25**, 9236–9243.
- Chieragatti E. and Meldolesi J. (2005) Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 181–187.
- Chieragatti E., Chicka M. C., Chapman E. R. and Baldini G. (2004) SNAP-23 functions in docking/fusion of granules at low Ca<sup>2+</sup>. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1918–1930.
- Christopherson K. S., Ullian E. M., Stokes C. C., Mullen C. E., Hell J. W., Agah A., Lawler J., Moshier D. F., Bornstein P. and Barres B. A. (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* **120**, 421–433.
- Coco S., Calegari F., Pravettoni E., Pozzi D., Taverna E., Rosa P., Matteoli M. and Verderio C. (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J. Biol. Chem.* **278**, 1354–1362.
- Evanko D. S., Zhang Q., Zorec R. and Haydon P. G. (2004) Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia* **47**, 233–240.
- Fellin T., Pascual O., Gobbo S., Pozzan T., Haydon P. G. and Carmignoto G. (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* **43**, 729–743.

- Ferroni S., Marchini C., Schubert P. and Rapisarda C. (1995) Two distinct inwardly rectifying conductances are expressed in long term dibutyl- $\gamma$ -cyclic-AMP treated rat cultured cortical astrocytes. *FEBS Lett.* **367**, 319–325.
- Fischer-Colbrie R., Kirchmair R., Schobert A., Olenik C., Meyer D. K. and Winkler H. (1993) Secretogranin II is synthesized and secreted in astrocyte cultures. *J. Neurochem.* **60**, 2312–2314.
- Flaumenhaft R. (2003) Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1152–1160.
- Ganter S., Northoff H., Männel D. and Gebicke-Härter P. J. (1992) Growth control of cultured microglia. *J. Neurosci. Res.* **33**, 218–230.
- Halassa M. M., Fellin T. and Haydon P. G. (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol. Med.* **13**, 54–63.
- Halonen S. K., Woods T., McInerney K. and Weiss L. M. (2006) Microarray analysis of IFN $\gamma$  response genes in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* **175**, 19–30.
- Haydon P. G. and Carmignoto G. (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol. Rev.* **86**, 1009–1031.
- Hepp R., Perraut M., Chasserot-Golaz S., Galli T., Aunis D., Langley K. and Grant N. J. (1999) Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23. *Glia* **27**, 181–187.
- Iadecola C. and Nedergaard M. (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* **10**, 1369–1376.
- Imai A., Nashida T. and Shimomura H. (2004) Roles of Munc18-3 in amylase release from rat parotid acinar cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **422**, 175–182.
- Jahn R. and Scheller R. H. (2006) SNAREs – engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 631–643.
- Jahn R., Lang T. and Südhof T. C. (2003) Membrane fusion. *Cell* **112**, 519–533.
- John G. R., Lee S. C. and Brosnan C. F. (2003) Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist* **9**, 10–22.
- Kettenmann H. and Ransom B. R. (2004) Neuroglia, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford.
- Krzan M., Stenovec M., Kreft M., Pangrsic T., Grile S., Haydon P. G. and Zorec R. (2003) Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes. *J. Neurosci.* **23**, 1580–1583.
- Li D., Ropert N., Koulakoff A., Giaume C. and Oheim M. (2008) Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J. Neurosci.* **28**, 7648–7658.
- Maienschein V., Marxen M., Volknandt W. and Zimmermann H. (1999) A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia* **26**, 233–244.
- Majó G., Aguado F., Blasi J. and Marsal J. (1998) Synaptobrevin isoforms in secretory granules and synaptic-like microvesicles in anterior pituitary cells. *Life Sci.* **62**, 607–616.
- Mauch D. H., Nägler K., Schumacher S., Göritz C., Müller E.-C., Otto A. and Pfrieger F. W. (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **294**, 1354–1357.
- McCarthy K. D. and de Vellis J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* **85**, 890–902.
- McManus M. F., Chen L. C., Vallejo I. and Vallejo M. (1999) Astroglial differentiation of cortical precursor cells triggered by activation of the cAMP-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* **19**, 9004–9015.
- Montana V., Malarkey E. B., Verderio C., Matteoli M. and Parpura V. (2006) Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia* **54**, 700–715.
- Mothet J. P., Pollegioni L., Ouanounou G., Martineau M., Fossier P. and Baux G. (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 5606–5611.
- Pagan J. K., Wylie F. G., Joseph S., Widberg C., Bryant N. J., James D. E. and Stow J. L. (2003) The t-SNARE syntaxin 4 is regulated during macrophage activation to function in membrane traffic and cytokine secretion. *Curr. Biol.* **13**, 56–60.
- Panatier A., Theodosis D. T., Mothet J. P., Touquet B., Pollegioni L., Poulain D. A. and Oliet S. H. (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* **125**, 775–784.
- Parpura V., Fang Y., Basarsky T., Jahn R. and Haydon P. G. (1995) Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS Lett.* **377**, 489–492.
- Pascual O., Casper K. B., Kubera C., Zhang J., Revilla-Sanchez R., Sul J. Y., Takano H., Moss S. J., McCarthy K. and Haydon P. G. (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* **310**, 113–116.
- Perea G. and Araque A. (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* **317**, 1083–1086.
- Puri N. and Roche P. A. (2008) Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 2580–2585.
- Rao S. K., Huynh C., Proux-Gillardeaux V., Galli T. and Andrews N. W. (2004) Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 20471–20479.
- Ravichandran V., Chawla A. and Roche P. A. (1996) Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *J. Biol. Chem.* **271**, 13300–13303.
- Riento K., Galli T., Jansson S., Ehnholm C., Lehtonen E. and Olkkonen V. M. (1998) Interaction of Munc-18-2 with syntaxin 3 controls the association of apical SNAREs in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **111**, 2681–2688.
- Ruiz-Montasell B., Aguado F., Majó G., Chapman E. R., Canals J. M., Marsal J. and Blasi J. (1996) Differential distribution of syntaxin isoforms 1A and 1B in the rat central nervous system. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 2544–2552.
- Schlag B. D., Vondrasek J. R., Munir M., Kalandadze A., Zelenaia O. A., Rothstein J. D. and Robinson M. B. (1998) Regulation of the glial Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol. Pharmacol.* **53**, 355–369.
- Shain W., Forman D. S., Madelian V. and Turner J. N. (1987) Morphology of astroglial cells is controlled by  $\beta$ -adrenergic receptors. *J. Cell Biol.* **105**, 2307–2314.
- Shiga H., Murakami J., Nagao T., Tanaka M., Kawahara K., Matsuoka I. and Ito E. (2006) Glutamate release from astrocytes is stimulated via the appearance of exocytosis during cyclic AMP-induced morphologic changes. *J. Neurosci. Res.* **84**, 338–347.
- Smithers N. P., Hodgkinson C. P., Cuttle M. and Sale G. J. (2008) Insulin-triggered repositioning of munc18c on syntaxin-4 in GLUT4 signalling. *Biochem. J.* **410**, 255–260.
- Sørensen J. B., Nagy G., Varoquaux F., Nehring R. B., Brose N., Wilson M. C. and Neher E. (2003) Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* **114**, 75–86.
- Stenovec M., Kreft M., Grile S., Pangrsic T. and Zorec R. (2008) EAAT2 density at the astrocyte plasma membrane and Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis. *Mol. Membr. Biol.* **25**, 203–215.
- Stow J. L., Manderson A. P. and Murray R. Z. (2006) SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 919–929.

- Taupenot L., Harper K. L. and O'Connor D. T. (2003) The chromogranin-secretogranin family. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1134–1149.
- Tilleux S., Berger J. and Hermans E. (2007) Induction of astrogliosis by activated microglia is associated with a down-regulation of metabotropic glutamate receptor 5. *J. Neuroimmunol.* **189**, 23–30.
- Toonen R. F. and Verhage M. (2007) Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control. *Trends Neurosci.* **30**, 564–572.
- Torrejón-Escribano B., Gómez de Aranda I. and Blasi J. (2002) SNARE expression and distribution during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *FEBS Lett.* **512**, 275–281.
- Volterra A. and Meldolesi J. (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 626–640.
- Zhang Q., Fukuda M., Van Bockstaele E., Pascual O. and Haydon P. G. (2004a) Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 9441–9446.
- Zhang Q., Pangrsic T., Kreft M., Krzan M., Li N., Sul J. Y., Halassa M., Van Bockstaele E., Zorec R. and Haydon P. G. (2004b) Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 12724–12733.
- Zhang Z., Chen G., Zhou W., Song A., Xu T., Luo Q., Wang W., Gu X. S. and Duan S. (2007) Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat. Cell Biol.* **9**, 945–953.

## CAPÍTOL III

### Secretogranina III és una granina astrocitària que es sobreexpressa en glia reactiva

Sonia Paco<sup>1</sup>, Esther Pozas<sup>2</sup>, Fernando Aguado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain. <sup>2</sup>Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institute for Biomedical Research of Barcelona (IIBB), CSIC-IDIBAPS, Spain

Publicat a la revista *Cereb Cortex*. 2010 Jun;20(6):1386-97.

#### Resum

Els astròcits alliberen de manera constitutiva i regulada importants mediadors de la comunicació glia-neurona. Entre ells trobem transmissors peptídics i no peptídics que influeixen el desenvolupament, la funcionalitat i la plasticitat neuronal. Malgrat això, són pràcticament inexistent les evidències experimentals de la presència *in vivo* de components moleculars de la via de secreció regulada en astròcits. Les granines són marcadors neuroendocrins de la via de secreció regulada de pèptids. És una família molt àmplia que inclou la secretogranina III (SgIII). Intracel·lularment, les granines tenen un paper important en la classificació i agregació de pèptids de la via regulada i conseqüentment en la biogènesi de vesícules de secreció. A més, la seva proteòlisi dona lloc a pèptids bioactius amb funcions de senyalització intercel·lular.

En aquest treball analitzem la producció, la regulació i l'alliberació de la SgIII en astròcits *in vitro* i *in vivo*. Tant les neurones com els astròcits en cultiu sintetitzen i secreten SgIII. A diferència de les neurones, els astròcits alliberen una forma de SgIII no processada. *In vivo*, la SgIII és sintetitzada per ambdues poblacions, encara que els nivells més alts d'expressió es troben en els astròcits. Característicament, tant a nivell de mRNA com de proteïna, els nivells d'expressió de SgIII augmenten notablement en astròcits reactius en lesions de l'escorça cerebral.

Aquests resultats impliquen la SgIII a la via de secreció astroglial *in vivo*. A més, la sobreexpressió de SgIII en astròcits reactius suggereix un paper d'aquesta granina glial en els processos activats en el dany cerebral.



## Secretogranin III Is an Astrocyte Granin That Is Overexpressed in Reactive Glia

Sonia Paco<sup>1</sup>, Esther Pozas<sup>2</sup> and Fernando Aguado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain and <sup>2</sup>Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institute for Biomedical Research of Barcelona, CSIC-IDIBAPS, Barcelona E-08036, Spain

**Astrocytes release peptide and nonpeptide transmitters that influence neuronal development, function, and plasticity. However, the molecular components of the astroglial secretory pathways in vivo are largely unknown. Here, we analyze in astrocytes the production, expression regulation, trafficking, and release of secretogranin III (SgIII), a member of the multifunctional granin family. We show that astroglial cells in culture synthesize and release a nonprocessed form of SgIII. In vivo studies show that many neuronal populations produce and transport SgIII. In particular, the highest SgIII expression in the cerebral cortex in vivo is present in astroglial cells. Both SgIII protein and mRNA are abundantly detected in cortical astrocytes and in Bergmann glial cells. Moreover, the levels of SgIII mRNA and protein in reactive astrocytes, induced by perforating injury increase dramatically. These results implicate SgIII in the astrocyte secretory pathway in vivo and show that its expression is finely regulated during glial activation. The robust expression of SgIII in astrocytes and its regulation in the injured brain suggest both intracellular and extracellular roles for this glial granin in the physiology and repair/damage of neuronal circuits.**

**Keywords:** astrocyte, brain injury, glial activation, secretogranin, secretory pathway

### Introduction

Exocytotic vesicular secretion of signaling molecules contributes to glia–neuron communication (Araque et al. 2001; Volterra and Meldolesi 2005). In particular, astrocyte-secreted glutamate, adenosine triphosphate (ATP) and D-serine regulate neuronal physiology by modulating synaptic transmission and network activity (Pascual et al. 2005; Panatier et al. 2006; Perea and Araque 2007). In addition to nonpeptide transmitters, peptides and proteins released from astrocytes, such as growth factors, cytokines, and extracellular components, control the development, plasticity, and pathology of neuronal circuits (Allan and Rothwell 2001; Christopherson et al. 2005). Although astrocyte vesicular secretion is crucial for neuronal function, secretory pathways remain poorly characterized. It has now been shown that astroglial cells contain competent compartments and molecular machinery for a regulated secretory pathway (for review, see Montana et al. 2006). Thus, astrocytes can release gliotransmitters, such as glutamate, ATP, and neuropeptide Y, from synaptic-like microvesicles, lysosomes, and secretory granules in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner (Bezzi et al. 2004; Zhang et al. 2007; Ramamoorthy and Whim 2008). However, the molecular components of the transmitter secretory pathway in glia in vivo are largely unknown (Fiacco et al. 2009).

A biochemical hallmark of neuroendocrine secretory granules is the storage and release of uniquely acidic proteins known as granins, which are considered markers of the regulated secretory pathway (Taupenot et al. 2003; Helle 2004). The granin family comprises the “classical” members: chromogranin A (CgA), chromogranin B (CgB), and secretogranin II (SgII); and the 5 less known secretogranin III (SgIII, 1B1075 gene product), secretogranin IV (HISL-19 antigen), secretogranin V (neuroendocrine secretory protein 7B2), secretogranin VI (NESP55), and secretogranin VII (the nerve growth factor inducible protein VGF; Taupenot et al. 2003; Helle 2004; Montero-Hadjadje et al. 2008). Intracellularly, granins have a role in the sorting and aggregation of secretory products in the trans-Golgi network and in the subsequent biogenesis of secretory granules (Taupenot et al. 2003; Helle 2004). Moreover, proteolytic processing of these proteins, as for prohormones, gives rise to bioactive peptides (e.g., catestatin and secretoneurin) with autocrine, paracrine, and endocrine functions (Simon et al. 1988; Shyu et al. 2008).

In endocrine cells, SgIII is a key sorting receptor for peptide hormones (for review, see Takeuchi and Hosaka 2008). Moreover, SgIII has recently been shown to be expressed and released by nonneuroendocrine cell types that display a regulated secretory pathway, such as platelets and mast cells (Coppinger et al. 2004; Prasad et al. 2008). Here, we studied the little known SgIII in rodent astrocytes. We show that a nonprocessed form of SgIII is produced and released by cortical astrocytes in primary cultures. In brain sections, SgIII transcripts and protein were found in neuronal populations and abundantly in cortical astrocytes. Moreover, SgIII expression was specifically upregulated in reactive astrocytes after perforating brain injury. These results show that SgIII is a reliable component of the astrocyte secretory pathway and suggest important roles for glial SgIII in the glia–neuron communication.

### Materials and Methods

#### *Antibodies and Reagents*

Polyclonal antibodies against SgIII were purchased from Sigma–Aldrich (Deisenhofen, Germany) and Proteintech Group Inc. (Chicago, IL). SgII antibodies were kindly provided by Dr R. Fischer-Colbric. Monoclonal antibodies against synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25), glial fibrillary acidic protein (GFAP), neuronal nuclei (NeuN), carboxypeptidase E (CPE), FLAG,  $\beta$ -tubulin, and vimentin were obtained from Sternberg Monoclonals Inc. (Baltimore, MD), Chemicon (Temecula, CA), BD Transduction Laboratories (San Jose, CA), Sigma–Aldrich, and Developmental Studies Hybridoma Bank (Department of Biological Sciences, The University of Iowa, Iowa city, IA). Polyclonal antibody to Olig2 was from Chemicon. FLAG-tagged rat SgIII (1–471) cDNA was a gift of Dr M. Hosaka. Brefeldin A was obtained by Sigma–Aldrich and 8Br-cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) was



from Biolog Life Science Institute (Bremen, Germany). Most chemicals and cell culture reagents were from Sigma-Aldrich and GIBCO (Invitrogen, Paisley, UK), respectively.

### Animals

OF1 mice were provided by Charles River Laboratories, Inc. (Lyon, France), and Sprague-Dawley rats were obtained from the Laboratory Animal Service of the University of Barcelona. Animals were anesthetized with ketamine (Ketolar, Parke-Davis, Barcelona, Spain) and xylazine (Rompun, Bayer Healthcare, Kiel, Germany). Stab wound lesions were made as described previously (Aguado et al. 2002). Under anesthesia, adult animals were fixed to a stereotaxical frame, and the cerebral cortex was then stabbed with a #11 scalpel blade. The wounds were 3-mm long and 2-mm deep at 1.5 mm from and parallel to midline and ran 0.5 mm away from the Bregma over the right parietal cortex. To provoke secretory protein accumulation in neural bodies, colchicine was administered intracerebroventricular (i.c.v.) (Aguado et al. 1999). Seventy-five microgram of colchicine in 10  $\mu$ L of phosphate-buffered saline (PBS) was stereotaxically injected in the lateral ventricle of adult rats. Sham-operated controls only received 10  $\mu$ L of PBS. Animals were kept under controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C), humidity (40–60%), and light (12-h cycles) and treated in accordance with the European Community Council Directive (86/609/EEC) on animal welfare. Every effort was made to minimize animal suffering. In all in vivo experimental conditions, at least 4 animals were used per time-point.

### Cell Cultures

The COS kidney epithelial cell line was grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum with penicillin/streptomycin at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. COS cell line was transfected with FLAG-SgIII using Lipofectamin 2000, and peptide expression was assayed 48 h later.

Astrocyte cultures were prepared from the cerebral cortex of 2-day-old mice as described previously (Paco et al. 2009). Briefly, the cerebral cortex was isolated, and the meninges were carefully dissected away. Cortical tissues were then minced and incubated in 0.25% trypsin and 0.01% DNase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Dissociated cells were seeded in flasks and grown in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium, and F-12 (1:1) containing 10% fetal bovine serum, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid and penicillin/streptomycin at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. At confluence (days 10–12), the flasks were shaken over night, and the cells were rinsed, detached, and subcultured at a density of 50 000 cells/cm<sup>2</sup> on poly-L-lysine-coated plastic culture dishes and coverslips. Under these conditions, cell cultures were essentially formed by astrocytes (>92% GFAP<sup>+</sup> cells) and virtually devoid of neurons (<0.5% Tuj-1<sup>+</sup> cells). A small percentage of microglia and immature oligodendrocytes (<8% CD11b<sup>+</sup> and NG2<sup>+</sup> cells) was also detected (Paco et al. 2009). Long-term treatment with 8Br-cAMP did not change the cellular composition (Paco et al. 2009). Neuronal cultures were prepared from the cerebral cortex of E16 mouse embryos. After trypsin and DNase treatment, dissociated cells were seeded on poly-L-lysine-coated culture plates. Neurons were grown at a density of 50 000 cells/cm<sup>2</sup> in Neurobasal medium containing B27 and N2 supplements, glutamine, and penicillin/streptomycin at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 10 days. During the first 4 days in culture, the media were also supplemented with 20  $\mu$ g/mL 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 50  $\mu$ g/mL uridine to inhibit the mitotic activity of glial cells. More than 99% of the cells were Tuj-1<sup>+</sup> neurons and less than 1% of the cells were GFAP<sup>+</sup> astrocytes (Paco et al. 2009). In all in vitro conditions, at least 3 independent experiments in duplicate were performed.

### Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

To perform polymerase chain reaction (PCR) experiments, total RNA was purified from the forebrain and from cultured astrocytes of mice using Trizol Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. All RNA obtained was reverse transcribed using pdN6 (random hexamers) and AMV reverse transcriptase (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Then, cDNAs were then amplified with specific primer pairs (5'-3') for SgIII, forward CAATTCAAGCTTCCCCAAA and reverse TTTCACCTGGCTTGCTTCT (NM\_009130); GFAP, forward

TGCTAGCTACATCGAGAAGG and reverse TCCTCTGTCTCTTGCATGTT (NM\_001131020.1); SNAP-25, forward CCTCCACTCTTGCTACCTGC and reverse CTCCTCTGCATCTCCTCCAG (NM\_011428.3); and actin, forward ATATCGCTGCGCTGGTCGTC and reverse AGGATGGCGTGAGG-GAGAGC (NM\_007393.3). PCR products were analyzed on 1–2% agarose gels, and images were captured with a scanner.

### Western Blotting

Cultured cells and tissues were homogenized in ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid, 1% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Samples of postnuclear lysates were electrophoresed in 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; BioRad Laboratories, Hercules, CA) and then transferred to nitrocellulose membranes (Whatman Schleicher & Schuell, Keene, NH). The membranes were blocked in a solution containing 5% nonfat milk powder in tris-buffered saline tween-20 (140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature and then incubated with primary antibodies in blocking buffer for 2 h at room temperature. After several washes in blocking solution, the membranes were incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (VECTOR, Burlingame, CA). Bound antibodies were visualized with enhanced chemiluminescence reagents (GE Healthcare). Blot images were captured with a scanner.

### Peptide Release

Astrocytes and neurons were seeded on poly-L-lysine-coated tissue culture dishes, to minimize cell loss. Before the release experiment, cells were serum starved. Brefeldin A 5  $\mu$ g/mL was incubated with astrocytes for 12 h and with neurons for 4 h. After release, conditioned medium was collected, and lysis buffer was added to the cells (see above). Cell media were centrifuged at 600 g for 5 min to remove dislodged cells, and proteins were precipitated with 5% trichloroacetic acid. Secretory proteins were analyzed in both media and cells by SDS-PAGE and immunoblotting.

### Immunocytochemistry

Cells grown on glass coverslips were washed in ice-cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. Animals were perfused transcardially under deep anesthesia with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. The brains were removed from the skulls, postfixed for 4 h in the same fixative solution, and cryoprotected overnight at 4 °C by immersion in a 30% sucrose solution in 0.1 M PB. Forty-micrometer thick frozen sections were obtained with a cryostat and collected in PBS. Sections processed for the peroxidase method were soaked for 30 min in PBS containing 10% methanol and 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and subsequently washed in PBS. To suppress nonspecific binding, cell cultures and brain sections were incubated in 10% serum-PBS containing 0.1% Triton X-100, 0.2% glycine, and 0.2% gelatin for 1 h at room temperature. Incubations with the primary antibodies were carried out overnight at 4 °C in PBS containing 1% fetal calf serum, 0.1% Triton X-100, and 0.2% gelatin. Some histological sections were processed using the avidin-biotin-peroxidase method (Vectastain ABC kit, VECTOR). The peroxidase complex was visualized by incubating the sections with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS. Sections were mounted, dehydrated, and coverslipped in Eukitt. Cell cultures and some brain sections were processed for immunofluorescence using secondary fluorochrome-conjugated antibodies (Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 568, Molecular Probes, Eugene, OR), and cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Molecular Probes). Cell-containing coverslips and histological sections were mounted with Mowiol. The specificity of the immunostaining was tested by omitting the primary antibodies or by replacing them with an equivalent concentration of nonspecific IgG. No immunostaining was observed in these conditions. Bright field and fluorescent images were obtained with the Olympus fluorescent BX-61 and Leica TCS SPE scanning confocal microscopes.

Double immunolabeling using primary antibodies raised in the same species (SgIII and Olig-2) was performed by a sequential avidin-biotin-peroxidase method (Levey et al. 1986). The first immunostaining was performed as above. The second immunolabeling reaction was

developed in a medium containing 0.01% benzidine dihydrochloride, 0.025% sodium nitroprusside (Merck, Darmstadt, Germany), and 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS, pH 6. Double immunolabeling using primary antibodies raised in different species was performed by incubation with different fluorescent-conjugated secondary antibodies. Colocalization data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean of the colocalization percentage for at least 7 brain sections from 3 animals.

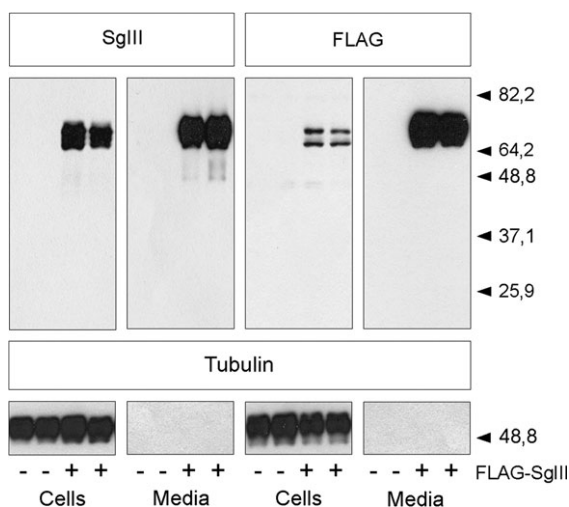
### In Situ Hybridization

Nonradioactive hybridizations were performed on free-floating forebrain sections according to the method of Aguado et al. (2003). Briefly, 4% paraformaldehyde-perfused brains were cryoprotected in 30% sucrose, frozen, and coronally sectioned at 40  $\mu$ m. Antisense, sense, and nonrelated probes were obtained by *in vitro* transcription of the rat SgIII and the mouse neuron-specific cotransporter KCC2 cDNAs in the presence of digoxigenin-UTP (Aguado et al. 2003; Han et al. 2008). Free-floating coronal sections were hybridized with RNA probes. After hybridization, sections were incubated with sheep polyclonal antidigoxigenin Fab fragments conjugated to alkaline phosphatase (Roche Diagnostics) and developed with a BCPI/NTB substrate. To reveal the strong SgIII mRNA expression in glial cells compared with neurons, hybridization reaction was limited. In some hybridized sections, SgIII, GFAP, and NeuN were subsequently detected by immunofluorescence. No signal was detected in control hybridizations performed with sense riboprobe, and a neuronal-restricted expression pattern was obtained with the KCC2 riboprobe.

### Results

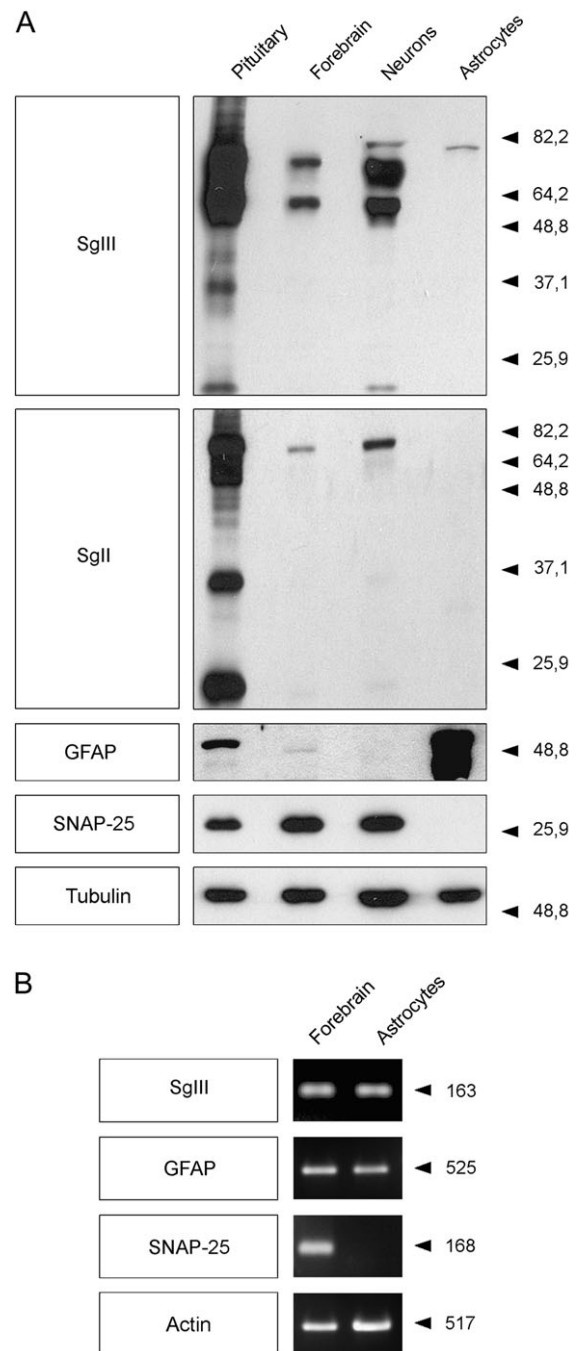
#### A Nonprocessed Form of SgIII Is Produced and Released by Cultured Astrocytes

To identify SgIII, we used 2 different polyclonal antibodies, HPA006880 and 10954-1-AP. We confirmed the specificity of the antibodies detecting FLAG-tagged SgIII expressed in COS cells by western blotting (Fig. 1). HPA006880 and FLAG antibodies recognized the same bands corresponding to SgIII in both cell lysates and media of transfected cultures (Fig. 1). No signal was found when the SgIII antibodies were incubated with mock-transfected COS cells (Fig. 1). Immunofluorescence staining revealed that transfected SgIII was sorted to cytoplasmic compartments (data not shown). Similar results were obtained with 10954-1-AP antibodies (data not shown).

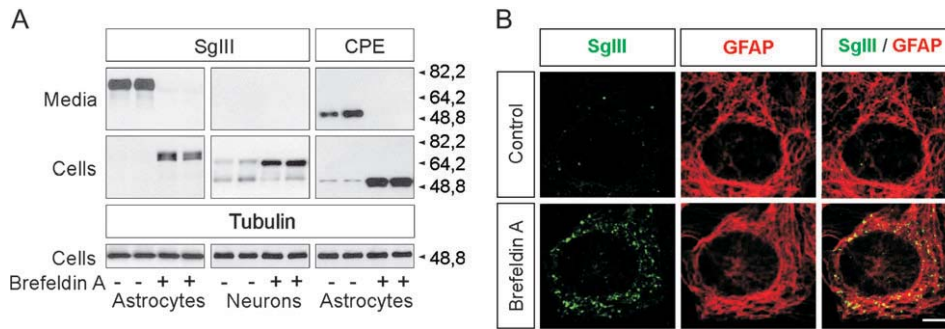


**Figure 1.** Identification of SgIII in COS cells by HPA006880 antibodies. (A) Cell lysates (10- $\mu$ g protein) and the basal release into the media (over night) were analyzed from FLAG-SgIII transfected and mock COS cells by immunoblotting. HPA006880 SgIII antibodies accurately recognize the construct, as do the FLAG antibodies, only in transfected cells but not in mock cells.  $\beta$ -tubulin was used as a loading control. The mobility of molecular mass markers (in kDa) is indicated.

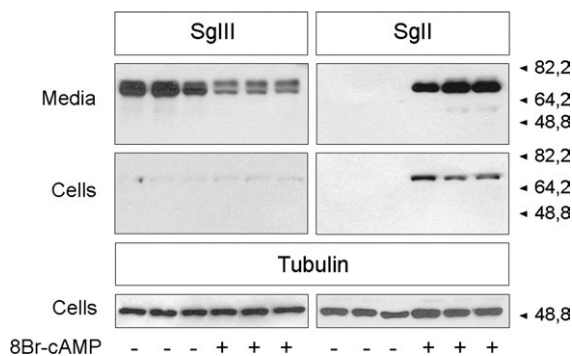
We examined the expression of SgIII by astrocytes analyzing tissues and primary cell cultures. As previously reported (Ottiger et al. 1990), anterior pituitary was a major source of SgIII, whereas brain tissues showed moderate quantities of the granin (Fig. 2A). In endocrine tissues (Fig. 2A), both polyclonal



**Figure 2.** SgIII protein and mRNA expression in cultured astrocytes. (A) A total of 20- $\mu$ g protein samples from pituitary, forebrain and cultured neurons, and astrocytes were analyzed by immunoblotting for the presence of SgIII and SgII. The astroglial and neuronal markers GFAP and SNAP-25, respectively, were used to monitor the purity of the primary cultures.  $\beta$ -tubulin was used as a loading control. The mobility of molecular mass markers (in kDa) is indicated. (B) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of SgIII in forebrain and in cultured astrocytes. Astrocyte culture purity was confirmed by GFAP and SNAP-25 mRNA amplification. Actin was a loading control. Size of amplification products (in bp) is indicated.



**Figure 3.** Trafficking and release of SgIII in cultured astrocytes. (A) Immunoblots illustrating basal SgIII and CPE secretion from astrocyte and neuron cultures treated or not with 5 µg/mL Brefeldin A. Drug administration and release were 12 h for astrocytes and 4 h for neurons. Each lane represents a fraction of the culture media and 10 µg of total protein of cell lysates from individual culture plates. (B). Confocal images of SgIII immunofluorescence in identified astrocytes (GFAP<sup>+</sup>) treated or not with Brefeldin A. Note the Brefeldin A-induced accumulation of SgIII in perinuclear compartments. Scale bar: 1 µm.



**Figure 4.** Differential regulation of SgIII and SgII by cAMP in cultured astrocytes. Representative immunoblotting of basal release (12 h) and cellular content (10 µg of total protein) of SgIII and SgII in untreated and 8Br-cAMP-treated cultured astrocytes. Each lane corresponds to one individual culture plate. β-tubulin is used as a loading control.

antibodies against SgIII recognized the precursor, mature, and cleaved proteins (ranging from 70 to 20 kDa; Holthuis et al. 1996; Han et al. 2008). Precursor and mature SgIII (~70 and 55 kDa bands) were also found in brain and cultured neurons, whereas a higher electrophoretic mobility band (~75–80 kDa; Han et al. 2008) was occasionally detected in cultured neurons (Fig. 2A). SgIII was also observed in lysates of cultured astrocytes but at lower levels. Remarkably, the detected SgIII forms in glial cells corresponded with the largest size forms (Fig. 2A). Electrophoretic mobility of SgIII in cultured astrocytes was the same, irrespective of whether it was detected using either HPA006880 or 10954-1-AP antibodies (data not shown). We also compared SgIII content in cell cultures with another astroglial granin, SgII (Fischer-Colbrie et al. 1993). SgII was hardly detected and only revealed by increasing the amount of total protein loaded on gel (Fig. 2A). Finally, expression of SgIII by cultured astrocytes was further confirmed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Fig. 2B). These data demonstrate that SgIII is expressed by cultured astrocytes.

Next, we analyzed SgIII trafficking and release from cultured astrocytes. SgIII was abundant in the culture medium of astrocytes (as early as 30 min after release) but scarce in cell lysates (Fig. 3A). A double band corresponding to nonprocessed precursor forms was generally observed in astrocyte culture media and cell lysates (Fig. 3A). In agreement with the secretory pathway involved, SgIII released from astrocytes was markedly reduced after administration of Brefeldin A, a drug that blocks

secretion by inhibiting transport from endoplasmic reticulum to the Golgi (Fig. 3A). In contrast, Brefeldin A treatment dramatically increased the SgIII content in cell lysates (Fig. 3A). Immunofluorescence labeling showed the retention of de novo synthesized SgIII in secretory compartments of astrocytes during Brefeldin A treatment (Fig. 3B). Moreover, the granin accumulation in GFAP-positive cells after Brefeldin A treatment further confirmed the SgIII expression by astroglial cells. In contrast to astrocytes, basal secretion of SgIII was extremely low in neurons (Fig. 3A). Moreover, Brefeldin A incubation in neuronal cultures increased the content of the precursor SgIII form, indicating that SgIII retention in early secretory compartments prevents its proteolytic processing in neurons (Fig. 3A). Because it has been proposed that SgIII exerts a role in peptide sorting through its interaction with CPE and astrocytes do synthesize CPE (Vilijn et al. 1989; Hosaka et al. 2005), we compared release of SgIII with CPE from astroglial cells. Brefeldin A-sensitive secretion of glial CPE was very similar to that observed for SgIII, displaying high rates of basal release (Fig. 3A). We conclude that SgIII is produced by cultured astrocytes as a nonprocessed form which is poorly stored and mostly secreted into the media concurrently with CPE.

It has been shown that granin synthesis can respond differently in different cell types to a variety of signaling pathways, including cAMP (Taupenot et al. 2003). To examine whether the content of SgIII in cultured astrocytes is regulated differentially to other glial granins, cell cultures were treated with the permeable cAMP analog 8Br-cAMP (1 mM) for 8 days, and levels of SgIII and SgII were analyzed. Long-term cAMP elevation in astrocytes upregulated SgII in both culture media and cell lysates (Fig. 4). This regulation is consistent with the presence of a functional cAMP response element in the SgII promoter (Taupenot et al. 2003). In contrast, released SgIII was reduced by 8Br-cAMP administration (Fig. 4). No apparent changes were detected in cell lysates (Fig. 4). These results show that SgIII and SgII are differentially regulated in astrocyte by the cAMP signaling pathway.

#### **Cortical Astrocytes Robustly Express SgIII In Vivo**

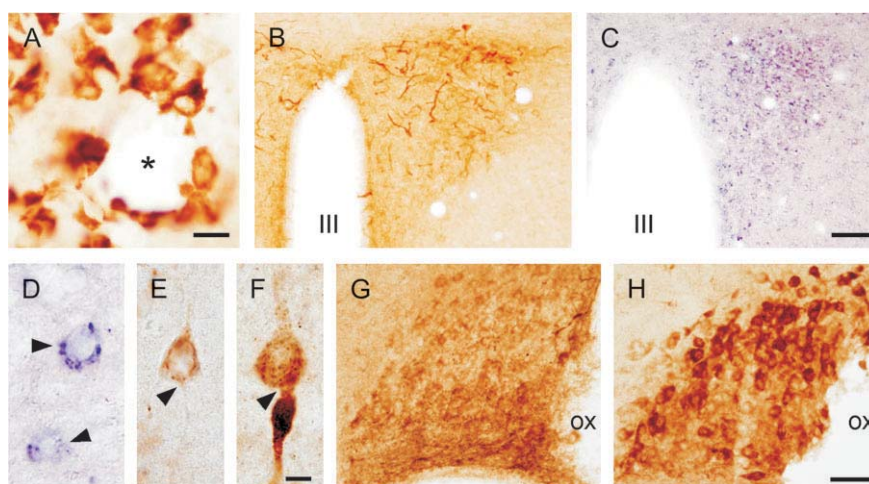
To analyze expression of SgIII by astrocytes in vivo, we combined immunohistochemistry with nonradioactive in situ hybridization on tissue sections. The strongest SgIII immunostaining was detected in endocrine cell subsets of the anterior pituitary and neurosecretory areas of the brain (Fig. 5A,B). Endocrine pituitary cells showed granular staining

throughout the cytoplasm (Fig. 5A), whereas SgIII signal in hypothalamic areas was mainly associated with neuronal fibers (Fig. 5B). The immunostaining for SgIII in neuroendocrine areas was consistently correlated with an mRNA hybridization signal (Fig. 5B,C). In addition to neuroendocrine nuclei, varicose axons, punctate structures, and neuronal cell bodies were immunolabeled for SgIII in most forebrain areas (data not shown). Although many neuronal somata displayed SgIII mRNA hybridization signal, SgIII immunolabeling was weak in neuronal cell bodies (Fig. 5D,E). We examined whether synthesized neuronal SgIII is transported along axons by arresting the axonal transport with colchicine. Although the microtubule disruption colchicine may alter gene expression, protein accumulation in the neuronal bodies and the initial axonal segment by i.c.v. administration is considered the consequence of a transport arresting (Cortés et al. 1990; Aguado et al. 1999). In colchicine-treated brains, SgIII immunolabeling was found accumulated in neuronal bodies in different areas, as shown in the cerebral cortex (Fig. 5E,F). Specifically, strong SgIII immunostaining was detected in dilated proximal axons of large-projection neurons (Fig. 5F). Accordingly with the high levels of SgIII mRNA in neuroendocrine cells, the colchicine-induced SgIII increase in neuronal somata was outstandingly prominent in hypothalamic neurons (Fig. 5G,H). These data show that SgIII is expressed and transported along axons in forebrain neurons.

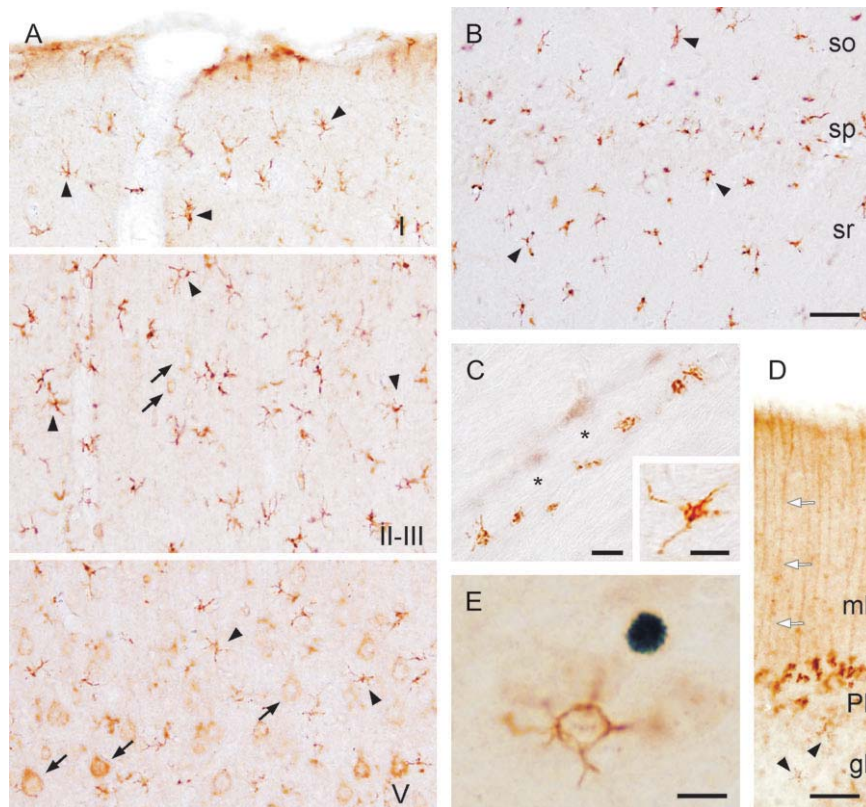
In addition to neurons, a prominent SgIII immunolabeling was observed in cell bodies and thin processes of nonneuronal star-shaped cells in the forebrain (Fig. 6A,B). SgIII stained astroglial-like cells were consistently observed throughout different layers of the cerebral cortex (i.e., neocortex and hippocampus), mainly in the upper layers (Fig. 6A,B). Other areas of the forebrain and mid- and hindbrain also displayed non neuronal Sg-III positive cells (Supplementary Figure S1). Some star-shaped cells showing a faint SgIII labeling were detected in myelinated tracts, such as corpus callosum, fimbria, and the optic nerve (Fig. 6C). Strong labeling for SgIII was detected in Bergmann glial cell bodies located in the Purkinje cell

layer of the cerebellum and their radial processes to the pial surface (Fig. 6D). Double labeling with SgIII and the marker Olig2 indicated that oligodendrocytes did not contain this granin (Fig. 6E). In contrast, we found a widespread colocalization of SgIII with the astrocyte marker GFAP (Fig. 7). For instance, about 96% of SgIII-labeled nonneuronal cells in the piriform cortex ( $96.71 \pm 0.96\%$ ) and hippocampus ( $97.12 \pm 0.95\%$ ) were GFAP<sup>+</sup> (Fig. 7). Characteristically, other GFAP structures, such as cell bodies in the white matter and astrocytic end-feet surrounding blood vessels and the glia limitans displayed weak or absent SgIII immunostaining (Fig. 7). High magnification images performed by confocal microscopy showed that SgIII labeling in astrocytes was typically found as scattered punctate staining in cell bodies and processes (Fig. 7). Parallel double immunofluorescence staining was performed with antibodies against SgII. However, no signal for SgII was detected in GFAP<sup>+</sup> structures (data not shown). These results show that SgIII is a distinctive granin of astrocytes in situ.

Next, expression of SgIII by astrocytes was further investigated by analyzing SgIII transcripts in brain sections. Examination of forebrain showed that the strongest SgIII hybridization signal corresponded to nonneuronal cells (Fig. 8). The SgIII mRNA expression pattern in nonneuronal cells was similar to that observed for SgIII protein. Thus, glial cells displaying SgIII mRNA transcripts were mainly detected in the cerebral cortex and to a lesser extent in other forebrain regions (Fig. 8A-D). Nonneuronal cells expressing high SgIII mRNA levels were distributed throughout the different layers of cortical areas, that is, neocortex and hippocampus (Fig. 8A-D). Hybridization signal was detected as a thin punctate in the processes and somata of glial cells (Fig. 6A,D). Astrocytic identity of glial SgIII expressing cells was demonstrated by double labeling with the marker GFAP in each region analyzed (Fig. 8D,E). Moreover, location of SgIII mRNA and protein in the same glial cells further substantiates the SgIII synthesis in astrocytes (Fig. 8F,H). Taken together, these data show that SgIII is robustly expressed by astrocytes in vivo.



**Figure 5.** In vivo expression and transport of SgIII in neurons and neuroendocrine cells. (A) Cytoplasmic granular immunostaining for SgIII in endocrine cells of the anterior pituitary. Asterisk indicates a blood vessel. (B, C) SgIII immunolabeling (B) and in situ hybridization (C) in the hypothalamic paraventricular nucleus. (D) SgIII mRNA detection in layer V neurons of the somatosensory cortex (arrowheads). (E, F) SgIII immunostaining of layer V pyramidal neurons in untreated (E) and colchicine-treated (F) somatosensory cortex. Arrowheads point to axon hillocks. Note the intense SgIII immunoreactivity accumulated in enlarged axonal fiber and neuronal soma from treated animals. (G, H) Hypothalamic supraoptic nuclei showing SgIII immunolabeling in untreated (G) and colchicine-treated (H) animals. Abbreviations: III, third ventricle; ox, optic chiasm. Scale bar: (A, D-F), 20  $\mu$ m; (B, C, G, H), 50  $\mu$ m.



**Figure 6.** Glial cells display SgIII protein in vivo. (A, B) SgIII immunostaining in astrocyte-like cells located in layer I, II, III, and V of the somatosensory cortex (A) and the CA1 region of the hippocampus (B). Black arrowheads and arrows point to glial cells and neurons, respectively. Note the strong labeling in glial cells compared with neurons. (C) Glial cells immunoreactive for SgIII in the optic nerve (C) and corpus callosum (inset). Asterisks indicate a blood vessel. (D) SgIII immunostaining in Bergmann cells and their radial processes (white arrows) in the cerebellum. (E) Double immunostaining against SgIII (brown) and Olig-2 (blue) in upper layers of the somatosensory cortex showing the lack of SgIII in oligodendrocytes. Abbreviations: gl, granular layer; ml, molecular layer; Pl, Purkinje cell layer; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum. Scale bar: (A, B, D), 50  $\mu$ m; (C), 10  $\mu$ m; (E), 5  $\mu$ m.

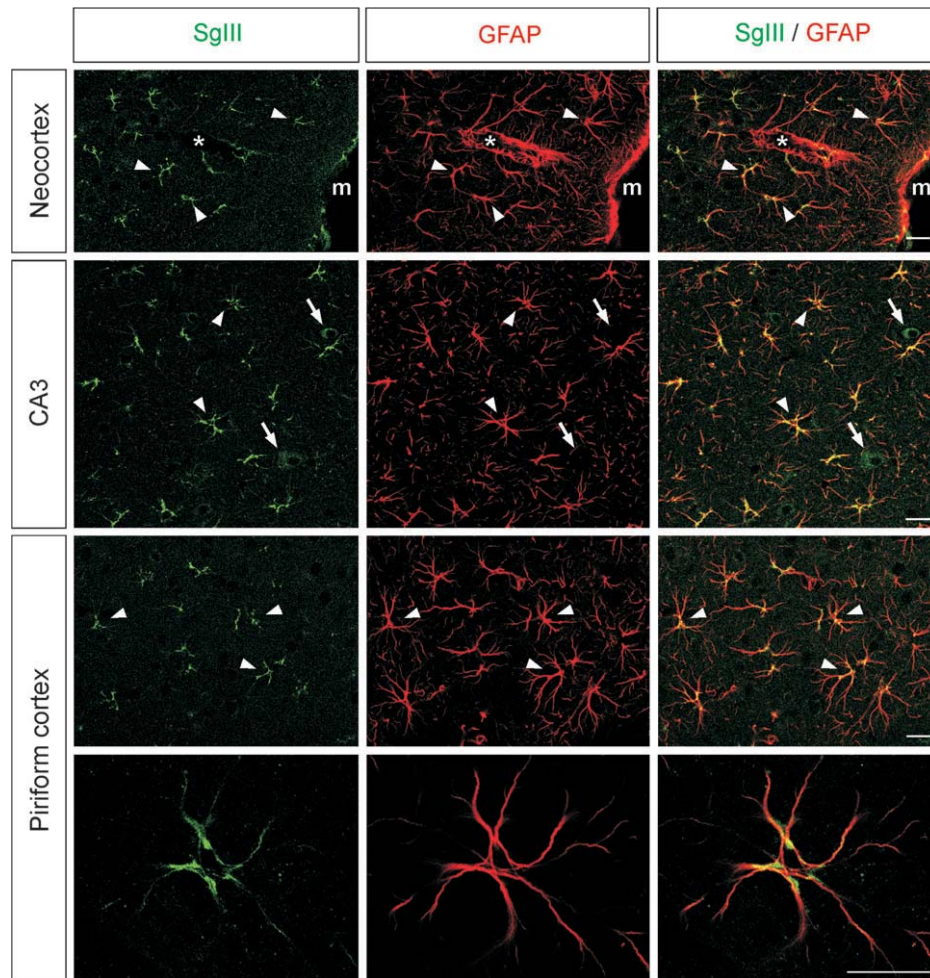
### ***Injury-Induced Reactive Astrocytes Upregulate SgIII Gene Expression***

The functional role of granins in glial cells is unknown. To investigate potential roles of SgIII in astrocyte in vivo, we analyzed regulation of SgIII expression in the injured brain. In response to CNS insults, astrocytes become reactive and exert important roles in repair and damage of neuronal circuits (Sofroniew 2005). We examined responses of SgIII protein and mRNA expression in a model of traumatic brain injury induced by stab wounds (Mathewson and Berry 1985).

SgIII protein was examined in sections from brains obtained 2, 5, and 9 days postinjury. We observed an increase of SgIII immunoreactivity in the vicinity of the wound site in the injured hemisphere (Fig. 9A). This enhancement was noticed after 2 days and peaked at 9 days postinjury (data not shown). Upregulation of SgIII was restricted to hypertrophied astroglial-shaped cells (Fig. 9C,E). Glial SgIII labeling was strongest around the lesion and declined in intensity in proportion to the distance from the wound (Fig. 9A). The highest levels of wound-induced SgIII expression were located throughout the hippocampus, as well as in the white matter tracts, corpus callosum, and fornix (Fig. 9D,E). SgIII also increased in astroglia in the injured neocortex but to a lesser extent (Fig. 9B,C). Patterns of SgIII staining in the noninjured hemisphere resembled those observed in the sham-injured brain (Fig. 9B,D). However, in some cases, glial

cells exhibiting upregulated levels of SgIII were observed in the hippocampus and white matter contralateral to the lesion (data not shown). A  $95.8 \pm 0.72\%$  of the cells showing stabbing-induced upregulation of SgIII were also costained with GFAP (Fig. 9H-J). Astrocytes showing SgIII overexpression in the vicinity of the wound exhibited the main characteristics of reactive cells, such as enhanced content of GFAP, hypertrophy, and thickened processes (Fig. 9H). Reactive distinctiveness of astrocytes was more obvious in the hippocampus and white matter tract than in the neocortex (data not shown). To further confirm the activated state of SgIII<sup>+</sup> glial cells, we performed double labeling with the reactive astrocyte marker vimentin. Astrocytes exhibiting upregulated levels of SgIII in the vicinity of the wound site were strongly immunostained for vimentin (Fig. 9G). In contrast, vimentin immunofluorescence was absent in normal SgIII<sup>+</sup> astrocytes in the contralateral hemisphere (Fig. 9F). For comparative purposes, we examined immunostaining for SgII in damaged sections. In the hippocampus and neocortex, SgII staining was associated with varicose fibers and neuronal cell bodies but consistently not with GFAP<sup>+</sup> astrocytes (Fig. 9K-M). We conclude that perforating brain injury differentially upregulates SgIII content in activated astrocytes.

To assess whether brain stabbing regulates SgIII expression at the mRNA level, we analyzed SgIII transcripts in brains obtained 2 and 4 days postinjury. Although upregulation changes in astrocyte SgIII transcripts were detected in the

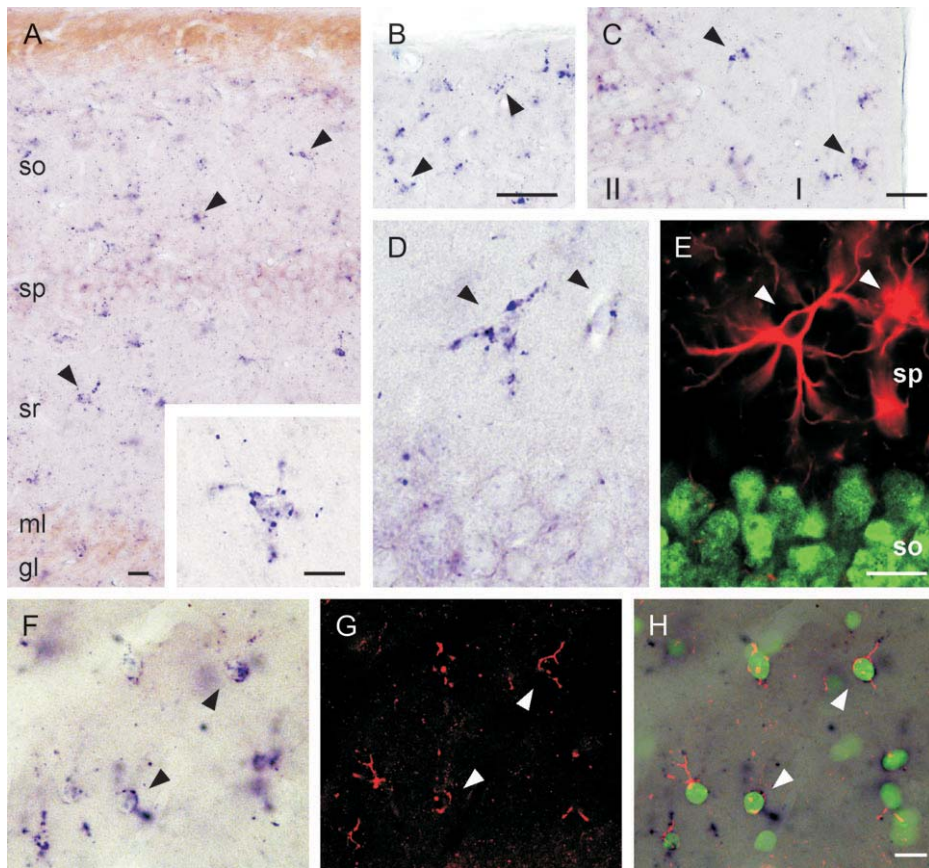


**Figure 7.** Astrocytes in situ express SgIII protein. Confocal images illustrating double immunofluorescence of SgIII and GFAP in the somatosensory and piriform cortex (upper layers) and in the CA3 region of the hippocampus (stratum radiatum). Arrowheads and arrows point to glial cells and neurons, respectively. Note the high degree of colocalization between SgIII and GFAP in astrocytes. The images of the neocortex show the low SgIII immunostaining in astrocyte processes surrounding capillaries (asterisk) and the glia limitans. Abbreviation: m, meninge. Scale bar: 20  $\mu$ m.

ipsilateral hemisphere 2 days after brain stabbing, a dramatic increase of SgIII mRNA hybridization signal was observed 4 days postinjury (Fig. 10A). Changes of glial SgIII mRNA levels in wounded brains mirrored those found for the protein. Thus, we detected an SgIII mRNA overexpression in glial cells around the insult (Fig. 10A). Glial cells showing the most intense SgIII hybridization signal were distributed throughout the hippocampus, corpus callosum, and the neocortex (Fig. 10A–C). Increased levels of SgIII transcripts in glial cells were maximal in the vicinity of the wound and decreased with the distance from the lesion (Fig. 10A). Conversely, SgIII mRNA expression was slightly decreased in neuronal cell bodies adjacent to the lesion (Fig. 10B,C). As expected from the parallel expression changes of SgIII protein and mRNA in glial cells of the damaged hemisphere, upregulated SgIII transcripts and protein were colocalized in  $98.92 \pm 0.39\%$  of glial cells. Furthermore, GFAP immunostaining of SgIII-hybridized sections from wounded brains revealed that almost all ( $98.91 \pm 0.33\%$ ) of the glial cells exhibiting SgIII upregulation were astrocytes (Fig. 10D–F). Taken together, these results show that brain injury markedly induces SgIII gene expression in reactive astrocytes.

## Discussion

In the present study, we show the expression, transcriptional regulation, trafficking, and release of the secretory pathway component SgIII in astroglial cells. Originally, SgIII was identified in CNS neurons and pituitary endocrine cells (Ottiger et al. 1990). More recent reports have analyzed the SgIII expression and function in different secretory cells, but the study of this granin in the brain has been poorly reported (Holthuis et al. 1996; Hosaka et al. 2002; Coppinger et al. 2004; Han et al. 2008; Prasad et al. 2008). We show here that SgIII is synthesized and transported along axons in many neuronal populations, especially in neuroendocrine nuclei and inner layers of the cerebral cortex. In addition to neurons, we reveal that high levels of SgIII mRNA and protein are expressed by astrocytes. These results are consistent with the in situ hybridization data provided by the Allen Brain Atlas indicating that SgIII mRNA is targeted in neurons and glial cells (Lein et al. 2007). By double-labeling analysis, we show that nonneuronal SgIII expression is restricted to astroglial cell populations and that the intensity of such expression varies. Thus, SgIII expression was high in cortical astrocytes and Bergmann glia but low in astrocytes located in white matter tracts. Typical



**Figure 8.** SgIII mRNA transcripts in astrocytes in situ. (A–C) SgIII mRNA hybridization signal in astrocytes (arrowheads) of the CA1 region of the hippocampus (A) and the upper layers of the somatosensory (B) and piriform (C) cortices. (D, E) Triple labeling of SgIII mRNA (blue precipitate, D), GFAP (red, E), and NeuN (green, E) illustrating the transcriptional expression of SgIII in astroglial cells (arrowheads). (F–H) Images showing SgIII mRNA (F) and protein (G) colocalization in the same cells. The composition in (H) merges SgIII mRNA (blue precipitate) and protein (red) labeling and 4',6-diamidino-2-phenylindole staining for cell nuclei (green). Abbreviations: gl, granular layer; ml, molecular layer; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum. Scale bar: (A, C), 20  $\mu$ m; (B), 50  $\mu$ m; (D–H), 10  $\mu$ m.

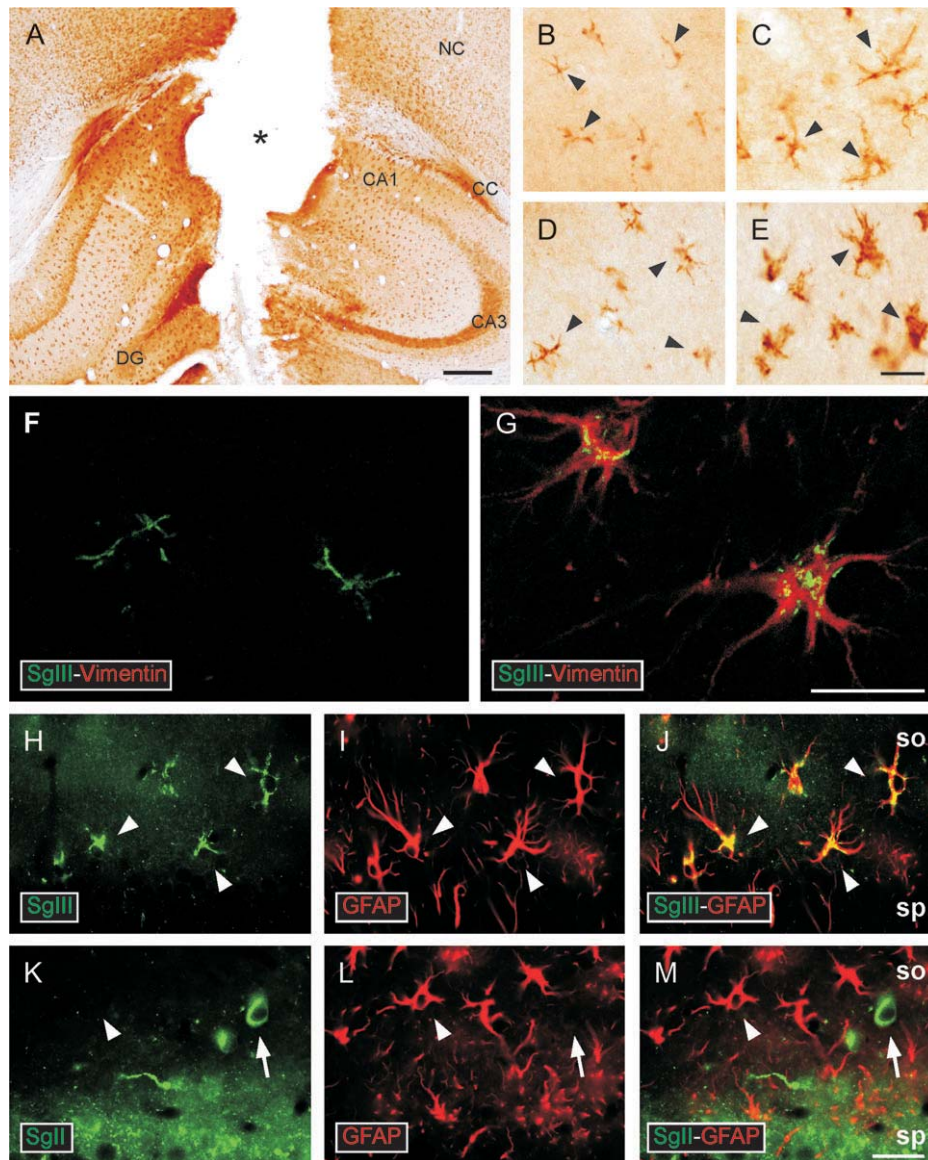
components of the neurotransmitter secretory pathway, such as vesicular transporters and sorting/aggregation and trafficking/exocytic proteins have been shown in astroglial cells (Montana et al. 2006). However, most of these studies were performed on cultured or freshly isolated cells, whereas expression of the secretory pathway machinery in glial cells in situ is largely unknown. Our results implicate SgIII in the astroglial secretory pathway in vivo.

Regulation of the classical granins has been extensively analyzed in the brain under different granin conditions (Winkler and Fischer-Colbrie 1992; Fischer-Colbrie et al. 1995). CgA, CgB, and SgII/secretoneurin are distinctively regulated in neuronal subpopulations after brain insults but not in nonneuronal cells (Martí et al. 2001; Pirker et al. 2001). To our knowledge, the present study is the first to provide evidence of transcriptional control of a granin in glial cells in vivo. Both SgIII mRNA and protein levels were dramatically increased in reactive astrocytes after traumatic brain injury. Moreover, our in vitro and in vivo observations on SgIII and SgII indicate that granin expression in glial cells is differentially controlled. Coordinated regulation of SgIII and the hormone precursor proopiomelanocortin has been shown in *Xenopus* intermediate pituitary during color adaptation (Holthuis and Martens 1996). Based on this parallel transcriptional control, an active role of SgIII in the production and release of secretory peptides was initially suggested (Holthuis and Martens 1996).

Reactive astrocytes, induced by different brain insults, overexpress a variety of secreted peptides (Ridet et al. 1997). For instance, expression of peptide hormones, growth factors, and cytokines, such as adrenomedullin, endothelin, normal growth factor, IL-6, and tumor necrosis factor  $\alpha$  are upregulated in reactive astrocytes (Nie and Olsson 1996; Goss et al. 1998; Acarin et al. 2000; Jahnke et al. 2001). Therefore, we hypothesize an important functional involvement of SgIII in peptide trafficking in activated astrocytes in vivo.

We show here that the SgIII found in and released from astrocytes is larger than that detected in endocrine cells and neurons. A similar noncleaved form of SgIII has recently been identified in PC12 cells and adrenal glands (Han et al. 2008). Because the SgIII prohormone convertases PC1/3 and PC2 have not been detected in astrocytes (Winsky-Sommerer et al. 2000), glial cells may contain and release the unprocessed SgIII. In agreement, the prohormone convertase substrates SgII and proenkephalin were primarily detected as uncleaved forms in astrocytes (Batter et al. 1991; Fischer-Colbrie et al. 1993). Whether the noncleaved form of SgIII exerts a distinctive functional role or is processed extracellularly in vivo to peptides remains to be elucidated.

SgIII and its interacting protein CPE are essential sorting receptors for peptide hormones (Takeuchi and Hosaka 2008). Through its high cholesterol-binding domain, SgIII sorts

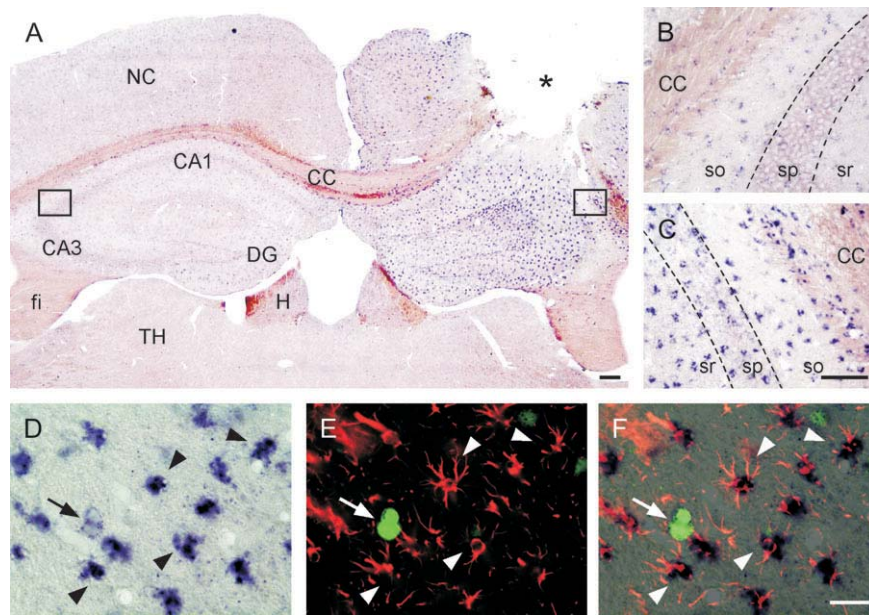


**Figure 9.** Increased SgIII protein in astrocytes after brain injury. (A–E) SgIII immunostaining in the cerebral cortex 5 days after a stab wound injury. Low-magnification image of a SgIII-immunolabeled brain section in the ipsilateral hemispheres to the lesion. Asterisk marks the wound (A). Representative glial cells displaying SgIII immunoreactivity in the contralateral (B, D) and ipsilateral (C, E) neocortex (B, C), and CA1 region of the hippocampus (D, E). (F, G) Confocal images illustrating double immunofluorescence of SgIII and vimentin in the stratum oriens of the control (F) and injured (G) hippocampus. Note the lack of vimentin immunolabeling in control SgIII-containing astrocytes. In contrast, reactive SgIII<sup>+</sup> astrocytes in the injured side display a strong immunolabeling for vimentin, a hypertrophied morphology. (H–J) Double immunolabeling of SgIII (H), GFAP (I), and the colocalization in the same cells (J) in the CA1 region of the injured hippocampus. (K–M) Immunofluorescences for SgIII (K), GFAP (L), and the merge (M) in the damaged CA1 hippocampal region. Note the lack of colocalization (M). Arrowheads and arrows point to glial cells and neurons, respectively. Abbreviations: CA1 and CA3, hippocampal regions; CC, corpus callosum; DG, dentate gyrus; NC, neocortex; so, stratum oriens; and sp, stratum pyramidale. Scale bars: (A), 200  $\mu$ m; (B–M), 20  $\mu$ m.

adrenomedullin and proopiomelanocortin to the secretory granules (Hosaka et al. 2004; Han et al. 2008). Because astrocytes are equipped with molecular components of the secretory granules and can release peptide hormones in a  $Ca^{2+}$ -dependent manner (Vilijn et al. 1989; Batter et al. 1991; Takahashi et al. 2000; Krzan et al. 2003; Ramamoorthy and Whim 2008; Paco et al. 2009), a function for SgIII in the regulated secretory pathway of glial cells is expected. However, the low cellular content of SgIII, together with its abundance in cell media, indicates that synthesized SgIII is poorly stored and promptly released from cultured astrocytes. Several mechanisms may explain the  $Ca^{2+}$ -dependent release of peptides, accompanied by low SgIII retention in astrocytes. First, it has

been demonstrated that a small quantity of SgIII is enough to sort a large number of peptides to secretory granules in PC12 cells (Han et al. 2008). CgA is considered a key aggregating factor involved in the biogenesis of secretory granules, which interacts with SgIII (Kim et al. 2001; Hosaka et al. 2002; Prasad et al. 2008). Thus, low expression of CgA in astrocytes could reflect the limited storage/aggregation of SgIII in glial cells (Majdoubi et al. 1996; Woulfe et al. 1999). Moreover, astrocytes display higher basal secretion and lower stimulus-triggered release of granule peptides than “professional” secretory cells (Fischer-Colbrie et al. 1993; Calegari et al. 1999; Paco et al. 2009). Finally, because astrocytes grown in culture do not accurately reflect their attributes in vivo, storage of peptides in





**Figure 10.** SgIII mRNA is overexpressed in activated astrocytes in the damaged brain. (A–C) SgIII hybridization signal in the cerebral cortex after a stab wound injury. Low-magnification image comparing SgIII mRNA expression in the contralateral and ipsilateral hemispheres to the lesion. Asterisk marks the wound (A). Higher magnifications of the square areas indicated in (A) showing astrocyte SgIII overexpression in the damaged hippocampus (B, C). (D–F) Triple labeling of SgIII mRNA (blue precipitate, D), GFAP (red, E), and NeuN (green, F) illustrating the transcriptional overexpression of SgIII in reactive astroglial cells (arrowheads). The composition in (F) merges the 3 labelings in the same image. Note the low SgIII expression in neurons, compared with glial cells. Abbreviations: CA1 and CA3, hippocampal regions; CC, corpus callosum; DG, dentate gyrus; fi, fimbria; H, habenula; NC, neocortex; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; and TH, thalamus. Scale bars: (A–C), 100  $\mu$ m; (D–F), 20  $\mu$ m.

astroglial cells may be higher *in vivo* than in culture. The present results and a recent microarray analysis show that SgIII mRNA expression and protein content in astrocytes are higher *in vivo* than *in vitro* (Cahoy et al. 2008; this study).

In addition to their intracellular functions, intact granins and their proteolytic-derived peptides exert important roles in cell-to-cell signaling, including homeostatic processes, inflammatory reactions, and the innate immunity (Helle 2004). For instance, CgA and the SgII fragment secretoneurin are potent microglia activators and chemotactic and angiogenic factors, respectively (Taupenot et al. 1996; Fischer-Colbrie et al. 2005). Our data clearly show that SgIII gene expression is upregulated in activated astroglia after perforating brain damage. We propose an extracellular role for glia-released SgIII in damage/repair of neuronal circuits after brain injury.

In summary, this study demonstrates that cortical astrocytes synthesize and release the secretory pathway component SgIII. Moreover, the robust expression of SgIII in astrocytes *in vivo* and its regulation in the damaged brain suggest important intracellular and/or extracellular roles for this granin in the glia–neuron communication.

#### Supplementary Material

Supplementary material can be found at: <http://www.cercor.oxfordjournals.org/>

#### Funding

Spanish Ministry of Education and Science Grants (BFU-2004-01154 and BFU2007-67889 to F.A.) and Carlos III Health Institute (PI070917 to E.P.).

#### Notes

We are grateful to Drs M. Hosaka (Gunma University) and R. Fisher-Colbrie (Innsbruck University) for FLAG-SgIII construct and SgII

antibody, respectively; Dr E. Soriano (University of Barcelona) for helpful discussions; and Robin Rycroft for editorial assistance. Antibodies to  $\beta$ -tubulin were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa. *Conflict of Interest:* None declared.

Address correspondence to Dr Fernando Aguado, Department of Cell Biology, University of Barcelona, Avinguda Diagonal 645, Barcelona E-08028, Spain. Email: [faguado@ub.edu](mailto:faguado@ub.edu).

#### References

- Acarin L, González B, Castellano B. 2000. Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur J Neurosci.* 12:3505–3520.
- Aguado F, Carmona MA, Pozas E, Aguiló A, Martínez-Guijarro FJ, Alcantara S, Borrell V, Yuste R, Ibañez CF, Soriano E. 2003. BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2. *Development.* 130:1267–1280.
- Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E. 2002. Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes *in situ*. *J Neurosci.* 22: 9430–9444.
- Aguado F, Pozas E, Blasi J. 1999. Colchicine administration in the rat central nervous system induces SNAP-25 expression. *Neuroscience.* 93:275–283.
- Allan SM, Rothwell NJ. 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2:734–744.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol.* 63:795–813.
- Batter DK, Vilijn MH, Kessler J. 1991. Cultured astrocytes release proenkephalin. *Brain Res.* 563:28–32.
- Bezzi P, Gunderson V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E, Volterra A. 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci.* 7:613–620.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, et al. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes:

- a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci.* 28:264-278.
- Calegari F, Coco S, Taverna E, Bassetti M, Verderio C, Corradi N, Matteoli M, Rosa P. 1999. A regulated secretory pathway in cultured hippocampal astrocytes. *J Biol Chem.* 274:22539-22547.
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Moshier DF, Bornstein P, Barres BA. 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell.* 120:421-433.
- Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB. 2004. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood.* 103:2096-2104.
- Cortés R, Ceccatelli S, Schalling M, Hökfelt T. 1990. Differential effects of intracerebroventricular colchicine administration on the expression of mRNAs for neuropeptides and neurotransmitter enzymes, with special emphasis on galanin: an in situ hybridization study. *Synapse.* 6:369-391.
- Fiacco TA, Agulhon C, McCarthy KD. 2009. Sorting out astrocyte physiology from pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 49:151-174.
- Fischer-Colbrie R, Kirchmair R, Kähler CM, Wiedermann CJ, Saria A. 2005. Secretoneurin: a new player in angiogenesis and chemotaxis linking nerves, blood vessels and the immune system. *Curr Protein Pept Sci.* 6:373-385.
- Fischer-Colbrie R, Kirchmair R, Schobert A, Olenik C, Meyer DK, Winkler H. 1993. Secretogranin II is synthesized and secreted in astrocyte cultures. *J Neurochem.* 60:2312-2314.
- Fischer-Colbrie R, Laslop A, Kirchmair R. 1995. Secretogranin II: molecular properties, regulation of biosynthesis and processing to the neuropeptide secretoneurin. *Prog Neurobiol.* 46:49-70.
- Goss JR, O'Malley ME, Zou L, Styren SD, Kochanek PM, DeKosky ST. 1998. Astrocytes are the major source of nerve growth factor upregulation following traumatic brain injury in the rat. *Exp Neurol.* 149:301-309.
- Han L, Suda M, Tsuzuki K, Wang R, Ohe Y, Hirai H, Watanabe T, Takeuchi T, Hosaka M. 2008. A large form of secretogranin III functions as a sorting receptor for chromogranin A aggregates in PC12 cells. *Mol Endocrinol.* 22:1935-1949.
- Helle KB. 2004. The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 79:769-794.
- Holthuis JC, Jansen EJ, Martens GJ. 1996. Secretogranin III is a sulfated protein undergoing proteolytic processing in the regulated secretory pathway. *J Biol Chem.* 271:17755-17760.
- Holthuis JC, Martens GJ. 1996. The neuroendocrine proteins secretogranin II and III are regionally conserved and coordinately expressed with proopiomelanocortin in *Xenopus* intermediate pituitary. *J Neurochem.* 66:2248-2256.
- Hosaka M, Suda M, Sakai Y, Izumi T, Watanabe T, Takeuchi T. 2004. Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J Biol Chem.* 279:3627-3634.
- Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Kato T, Takeuchi T. 2005. Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. *J Cell Sci.* 118:4785-4795.
- Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Uchiyama Y, Takeuchi T. 2002. Identification of a chromogranin A domain that mediates binding to secretogranin III and targeting to secretory granules in pituitary cells and pancreatic beta-cells. *Mol Biol Cell.* 13:3388-3399.
- Jahnke GD, Brunssen S, Maier WE, Harry GJ. 2001. Neurotoxicant-induced elevation of adrenomedullin expression in hippocampus and glia cultures. *J Neurosci Res.* 66:464-474.
- Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP. 2001. Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell.* 106:499-509.
- Krzan M, Stenovec M, Kreft M, Pangrsic T, Grilc S, Haydon PG, Zorec R. 2003. Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes. *J Neurosci.* 23:1580-1583.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, et al. 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature.* 445:168-176.
- Levey AI, Bolam JP, Rye DB, Hallanger AE, Demuth RM, Mesulam MM, Wainer BH. 1986. A light and electron microscopic procedure for sequential double antigen localization using diaminobenzidine and benzidine dihydrochloride. *J Histochem Cytochem.* 34:1449-1457.
- Majdoubi ME, Metz-Boutigues MH, Garcia-Sablone P, Theodosis DT, Aunis D. 1996. Immunocytochemical localization of chromogranin A in the normal and stimulated hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *J Neurocytol.* 25:405-416.
- Martí E, Ferrer I, Blasi J. 2001. Differential regulation of chromogranin A, chromogranin B and secretoneurin protein expression after transient forebrain ischemia in the gerbil. *Acta Neuropathol.* 101:159-166.
- Mathewson AJ, Berry M. 1985. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res.* 327:61-69.
- Montana V, Malarkey EB, Verderio C, Matteoli M, Parpura V. 2006. Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia.* 54:700-715.
- Montero-Hadjadje M, Vaingankar S, Elias S, Tostivint H, Mahata SK, Anouar Y. 2008. Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf).* 192:309-324.
- Nie XJ, Olsson Y. 1996. Endothelin peptides in brain diseases. *Rev Neurosci.* 7:177-186.
- Ottiger HP, Battenberg EF, Tsou AP, Bloom FE, Sutcliffe JG. 1990. 1B1075: a brain- and pituitary-specific mRNA that encodes a novel chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles. *J Neurosci.* 10:3135-3147.
- Paco S, Margelí MA, Olkkonen VM, Imai A, Blasi J, Fischer-Colbrie R, Aguado F. 2009. Regulation of exocytotic protein expression and Ca<sup>2+</sup>-dependent peptide secretion in astrocytes. *J Neurochem.* 110:143-156.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH. 2006. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell.* 125:775-784.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG. 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science.* 310:113-116.
- Perea G, Araque A. 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science.* 317:1083-1086.
- Pirker S, Czech T, Baumgartner C, Maier H, Novak K, Fürtinger S, Fischer-Colbrie R, Sperk G. 2001. Chromogranins as markers of altered hippocampal circuitry in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* 50:216-226.
- Prasad P, Yanagihara AA, Small-Howard AL, Turner H, Stokes AJ. 2008. Secretogranin III directs secretory vesicle biogenesis in mast cells in a manner dependent upon interaction with chromogranin A. *J Immunol.* 181:5024-5034.
- Ramamoorthy P, Whim MD. 2008. Trafficking and fusion of neuropeptide Y-containing dense-core granules in astrocytes. *J Neurosci.* 28:13815-13827.
- Ridet JL, Privat A, Malhotra SK, Gage FH. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20:570-577.
- Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Chen DC, Su CY, Wang HJ, Liu RS, Tsai CH, Li H. 2008. Secretoneurin promotes neuroprotection and neuronal plasticity via the Jak2/Stat3 pathway in murine models of stroke. *J Clin Invest.* 118:133-148.
- Simon JP, Bader MF, Aunis D. 1988. Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:1712-1716.
- Sofroniew MV. 2005. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 11:400-407.
- Takahashi K, Nakayama M, Totsune K, Murakami O, Sone M, Kitamuro T, Yoshinoya A, Shibahara S. 2000. Increased secretion of adrenomedullin from cultured human astrocytes by cytokines. *J Neurochem.* 74:99-103.
- Takeuchi T, Hosaka M. 2008. Sorting mechanism of peptide hormones and biogenesis mechanism of secretory granules by secretogranin III, a cholesterol-binding protein, in endocrine cells. *Curr Diabetes Rev.* 4:31-38.
- Taupenot L, Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Chasserot-Golaz S, Aunis D, Bader MF. 1996. Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience.* 72:377-389.

- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. 2003. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med.* 348:1134-1149.
- Vilijn MH, Das B, Kessler JA, Fricker LD. 1989. Cultured astrocytes and neurons synthesize and secrete carboxypeptidase E, a neuropeptide-processing enzyme. *J Neurochem.* 53:1487-1493.
- Volterra A, Meldolesi J. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* 6:626-640.
- Winkler H, Fischer-Colbrie R. 1992. The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience.* 49:497-528.
- Winsky-Sommerer R, Benjannet S, Rovère C, Barbero P, Seidah NG, Epelbaum J, Dournaud P. 2000. Regional and cellular localization of the neuroendocrine prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 424:439-460.
- Woulfe J, Deng D, Munoz D. 1999. Chromogranin A in the central nervous system of the rat: pan-neuronal expression of its mRNA and selective expression of the protein. *Neuropeptides.* 33:285-300.
- Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S. 2007. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol.* 8:945-953.

**DISCUSSIÓ**

---



En aquest apartat es discuteixen de forma integrada tots els resultats inclosos en els tres treballs presentats, juntament altres dades obtingudes durant el transcurs de la tesi doctoral que encara no estan publicades i són preliminars.

## 1. Composició diferencial de la maquinària exocítica en cèl·lules de glia

En els terminals sinàptics el complex SNARE està format per una reacció estequiomètrica 1:1:1 entre VAMP-2, SNAP25 i Stx1 (Jahn i Scheller, 2006). Però existeixen diverses isoformes de les SNARE amb propietats estructurals similars i capaces de substituir les altres en la formació del complex de fusió (Fasshauer, 1999), donant la possibilitat de la formació de combinacions alternatives de proteïnes en altres tipus de cèl·lules secretores especialitzades. En aquest treball s'identifiquen les proteïnes que formen part de la maquinària exocítica en dos tipus cel·lulars glicals en cultiu: els astròcits i la micròglia.

### 1.1. Astròcits

Característicament, les principals isoformes de les famílies R- i Q-SNARE i de Munc18 detectades en astròcits són diferents de les expressades en neurones. Mentre que les neurones expressen sintaxina1, Munc18a, SNAP25 i VAMP-2 en astròcits les formes majoritàries són sintaxina4, Munc18c, SNAP23 i VAMP-3, igual que en les línies tumorals C6 i U373 que deriven de cèl·lules astroglicals.

La prevalença de la Q-SNARE SNAP23 en astròcits està d'acord amb estudis previs (Hepp *et al.*, 1999) i dóna suport a la idea que substitueix funcionalment SNAP25 en cèl·lules no endocrines. Les isoformes implicades en la neurosecreció depenent de calci sintaxina1, Munc18a i VAMP-2 estan presents tant en neurones com en astròcits. En astròcits, però, només s'expressa la variant 1B de sintaxina1, en concordança amb la distribució heterogènia descrita per les isoformes de sintaxina1 (Ruiz-Montasell *et al.*, 1996). Aquests resultats s'han corroborat recentment *in vivo*, on s'ha detectat l'expressió de sintaxina1 en astròcits de l'hipocamp (Schubbert *et al.*, 2011).

A més de les proteïnes implicades en la exocitosi depenent de calci, els astròcits expressen de forma abundant sintaxina4, sintaxina2, Munc18c i VAMP-3. Malgrat que el significat funcional d'aquestes proteïnes exocítiques ubiqües en el SNC no és gaire conegut, en altres tipus cel·lulars no neuronals se'ls ha assignat un paper en la secreció depenent d'estímul (Flaumenhaf, 2003; Imai *et al.*, 2004). També podria ser que la presència de diverses isoformes d'SNAREs reflecteixi la coexistència de diferents orgànuls responsables de l'exocitosi

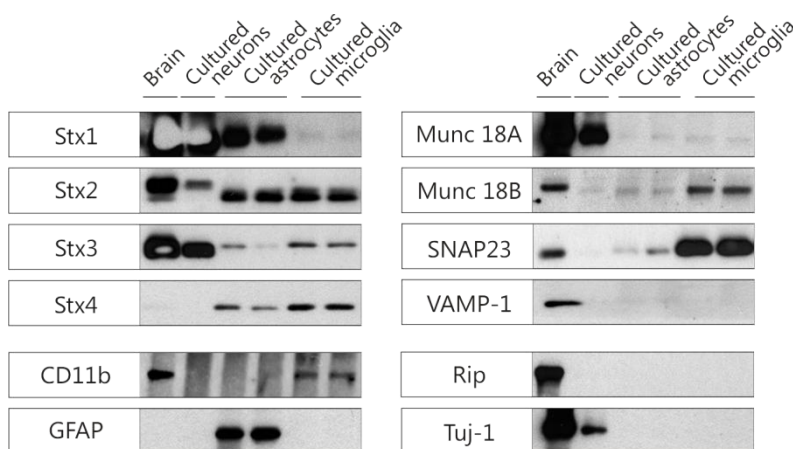
glial. Recentment, s'ha descrit que els astròcits presenten una exocitosi lisosomal depenent de calci i s'ha suggerit que syntaxina4 i SNAP23 podrien contribuir a la fusió dels lisosomes amb la membrana plasmàtica. Finalment, en els astròcits també existeix una exocitosi regulada sense finalitat secretora, com el transport a la membrana plasmàtica de receptors, canals o transportadors (Robinson *et al.*, 2002; Stenovec *et al.*, 2008), que pot ser dirigida per la interacció de diferents isoformes de syntaxines, VAMP i Munc18.

### 1.2. Micròglia

Els astròcits i la micròglia comparteixen algunes funcions, ja que els dos tipus cel·lulars secreten diferents molècules que modulen la resposta inflammatòria com citocines pro i antiinflamatòries, quimiocines i factors de creixement.

Per tal d'analitzar les proteïnes exocítiques que expressa la micròglia, es van realitzar cultius purs de micròglia segons la metodologia descrita prèviament (Saura *et al.*, 2003). Mitjançant *western blot* es va comprovar la puresa del cultiu, ja que en l'extracte proteic de les cèl·lules es troben nivells abundants del marcador específic de micròglia CD11b, mentre que majoritàriament no es detecten marcadors com GFAP, Rip i Tuj-1 que són específics d'astròcits, oligodendròcits i neurones, respectivament.

A diferència dels astròcits i les neurones, la micròglia presenta nivells pràcticament indetectables de syntaxina1. En canvi, expressa principalment syntaxina2 i també syntaxina3 i 4. De forma similar als astròcits, la micròglia expressa SNAP23 i no SNAP25; així com la proteïna SNARE associada a la membrana de la vesícula principalment és VAMP3 i no VAMP2 (resultats no mostrats). Respecte a Munc18, el regulador principal de la formació del complex SNARE, la micròglia en cultiu expressa majoritàriament Munc18b. Aquestes dades són preliminars i es mostren a la figura 18.



**FIGURA18. Expressió de proteïnes exocítiques en cèl·lules en cultiu.** *Western blot* d'extractes de cervell, neurones en cultiu, astròcits en cultiu i micròglia en cultiu (10 µg) on es detecta l'expressió de syntaxina 1-4, Munc18a-b, SNAP23, VAMP-1 i també els marcadors per identificar els tipus cel·lulars CD11b per a micròglia, GFAP per a astròcits, Rip per a oligodendròcits i Tuj-1 per a neurones.

La marcada expressió diferencial d'isoformes de proteïnes exocítiques en els diferents tipus cel·lulars suggereix l'existència de mecanismes i funcionalitat de secreció específics per a cadascun d'ells.

En l'esquema de la figura 19 (modificat de Hamilton i Attwell, 2010) es mostren les proteïnes implicades en l'exocitosi de neurones, astròcits i micròglia. En les neurones, el complex SNARE està format per sintaxina1, VAMP2 i SNAP25 i com a principal regulador Munc18a. L'exocitosi és provocada per l'entrada de calci al citoplasma mitjançant els canals de calci dependents de voltatge (VGCC), que s'uneix als dos llocs d'unió de la sinaptotagmina 1 present a la membrana de la vesícula. En canvi, en els astròcits el complex SNARE estaria format principalment per sintaxina1 i 4, però també per sintaxina2 i 3; VAMP-3 i VAMP-2, SNAP23 i Munc18c. L'activació dels receptors units a proteïna G (GPCR) genera  $IP_3$ , que provoca la sortida del calci de l'interior del RE que s'uneix a l'únic lloc d'unió de sinaptotagmina 4, 7, 11 de la membrana de la vesícula. En la micròglia, el complex SNARE estaria format per les sintaxines 2, 3 i 4, la Q-SNARE SNAP23 i VAMP-3. La unió de diferents lligands amb els seus receptors estimula la secreció de les vesícules ja preparades per ser secretades a la vegada que transdueix el senyal al nucli on s'activa la transcripció de determinats gens que provoquen un augment de la síntesi de les proteïnes alliberades.

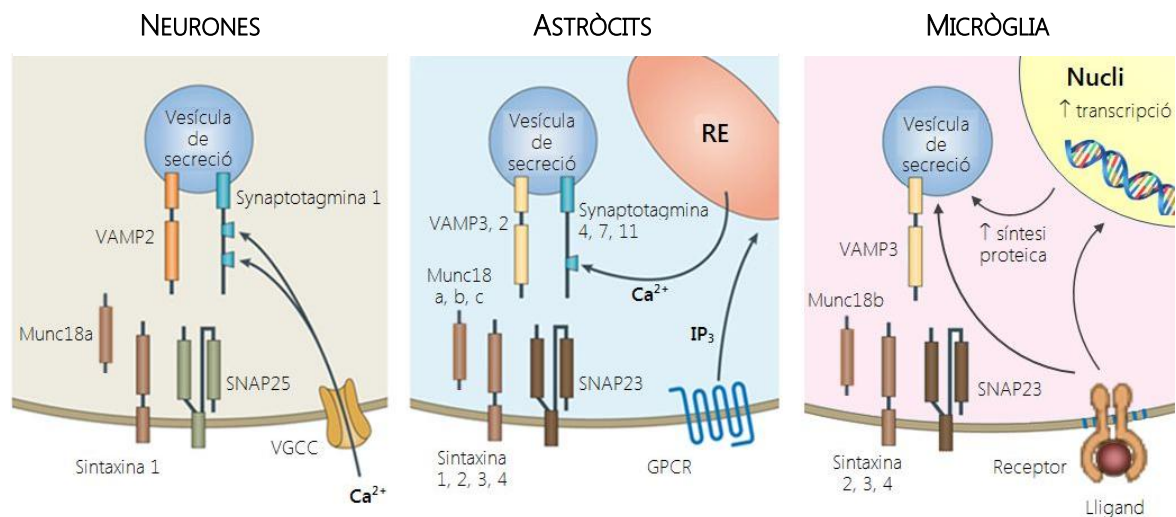


FIGURA 19. Proteïnes implicades en l'exocitosi de neurones, astròcits i micròglia.

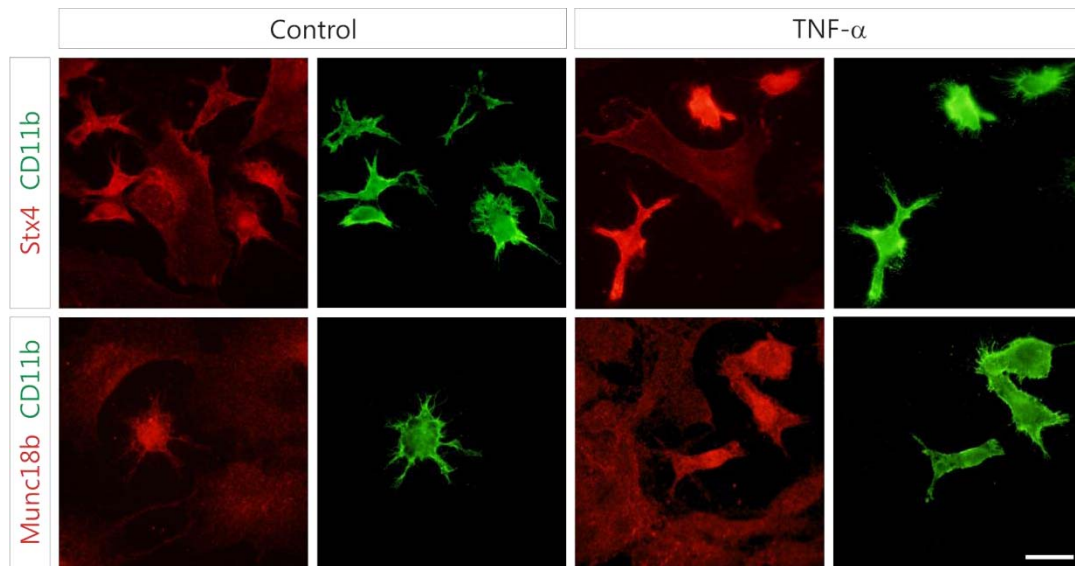
## 2. Regulació de l'expressió de proteïnes exocítiques durant l'activació glial i la seva implicació en l'alliberació de citocines.

L'expressió de proteïnes exocítiques no només és dependent del tipus cel·lular sinó també de l'estat funcional en què es troben les cèl·lules de glia.  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$  i  $IFN-\gamma$  són



citocines proinflammatòries potents que activen els astròcits i la micròglia tant *in vivo* com *in vitro* (John *et al.*, 2003). El tractament amb aquestes citocines varia els nivells d'expressió d'algunes proteïnes que formen part de la maquinària exocítica. Encara que algunes proteïnes, com VAMP-2, estan regulades de forma similar per les 3 citocines, que en disminueixen l'expressió, altres, com Munc18a i Munc18b, estan regulades de forma similar per TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , que n'augmenten l'expressió, però no per IFN- $\gamma$ . Estudis previs per *microarrays*, donen suport a la idea que aquestes proteïnes es regulen durant el procés d'activació glial com Munc18a (Halonen *et al.*, 2006).

El tractament amb citocines varia l'expressió de proteïnes exocítiques, principalment en la micròglia, com per exemple syntaxina2, 3 i 4 i Munc18b, tal i com es mostra a la figura 20.



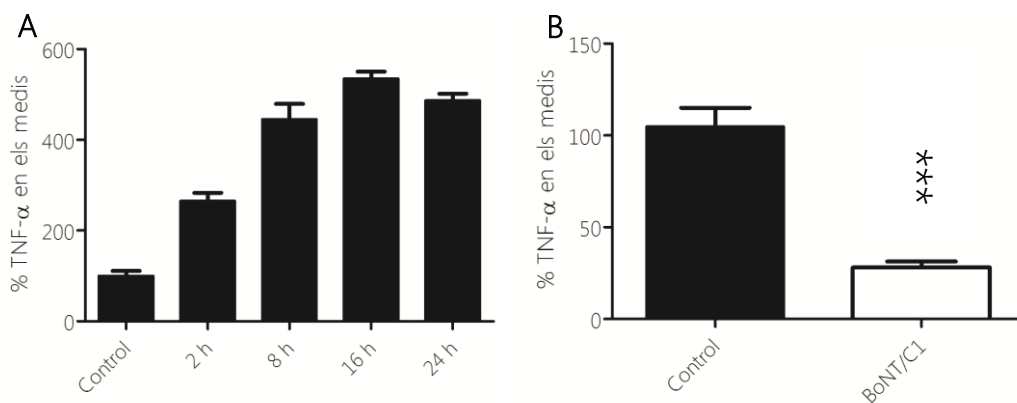
**FIGURA 20.** La micròglia sobreexpressa algunes proteïnes SNARE en el tractament amb citocines pro inflammatòries. Immunocitoquímica on es demostra que les cèl·lules de micròglia marcades amb CD11b (verd) expressen syntaxina4 (vermell) i Munc18b; i que l'expressió d'aquestes proteïnes augmenta quan les cèl·lules són tractades amb TNF- $\alpha$  20 ng/ml. Escala: 20  $\mu$ m.

Aquest perfil d'expressió és semblant al dels macròfags perifèrics (Stow *et al.*, 2006), en els que un cop activats, paral·lelament a l'augment del tràfic de citocines es produeix un augment de l'expressió de proteïnes SNARE i altres components del tràfic de membranes (Murray, 2005).

El TNF- $\alpha$  és una citocina d'acció potent i de síntesi ràpida que, a més de la seva funció pro inflammatòria s'ha descrit que està implicada en altres funcions importants en el SNC com en l'aprenentatge i la memòria (Beattie *et al.*, 2002; Stellwagen i Mallenka, 2006). La majoria de les citocines poden ser alliberades per la via clàssica tant de forma constitutiva com regulada; encara que per a algunes citocines com IL-1 $\beta$  (Eder, 2009) i MIF (factor inhibidor de la migració de macròfags) (Flieger *et al.*, 2003) s'ha descrit una via d'alliberació no clàssica de forma independent de RE/Golgi.

Per estudiar la implicació de les proteïnes SNARE en l'alliberació de citocines, analitzem la secreció de TNF- $\alpha$  tant en cultius control com activats amb LPS i IFN- $\gamma$ . Quan el LPS estimula els macròfags via TLR4, el precursor transmembrana tipus II pro-TNF és ràpidament sintetitzat i s'acumula a Golgi en menys de 20 minuts, des d'on és transportat fins a la superfície cel·lular on és processat per l'enzim convertidor de TNF (TACE, de l'anglès *TNF alpha converting enzyme*) per alliberar el seu ectodomini com una citocina soluble. El TNF soluble secretat es detecta en menys de 40 minuts després de l'estimulació (Shurety *et al.*, 2000).

En cultius mixtes on s'afavoreix la proliferació de micròglia mitjançant la restricció nutricional fent un canvi de medi un cop per setmana (Saura, 2007), s'aconsegueix un percentatge de micròglia superior al 20%. Per analitzar la presència de TNF- $\alpha$  en els medis es va realitzar un ELISA (Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Ready-Set-Go!, eBioscience™, San Diego, CA) tant en cultius control com activats amb LPS 100ng/ml i IFN- $\gamma$  0,5 $\mu$ g/ml. La secreció de TNF- $\alpha$  és dependent del temps d'activació; així, en els controls de cultius purs de micròglia s'observa una alliberació basal de TNF- $\alpha$  que gairebé es triplica a les 2 hores d'estimulació amb LPS + IFN- $\gamma$  i que arriba al màxim a les 16 hores (Figura 21, A). En tractar els cultius mixtes amb la toxina botulínica C1 (BoNT/C1, 50 nM), que proteolitza específicament les proteïnes SNARE sintaxina 1, 2 i 3, no s'observa l'augment de la secreció de TNF- $\alpha$  a les 2 hores quan s'estimulen els cultius amb LPS + IFN- $\gamma$  (Figura 21, B).



**FIGURA 21.** L'alliberació de TNF- $\alpha$  es produeix de forma ràpida i dependent de transport vesicular i proteïnes SNARE.

**A)** Gràfica on es mostra la cinètica d'alliberació de TNF- $\alpha$  als medis en cultius purs de micròglia: en el control ja existeix una alliberació basal però que gairebé es triplica a les 2 hores d'estimulació amb LPS + IFN- $\gamma$ , i arriba al màxim a les 16 hores. **B)** Com veiem en la gràfica, l'alliberació de TNF- $\alpha$  als medis en cultius mixtes estimulats amb LPS i IFN- $\gamma$  disminueix si els cultius han estat tractats prèviament amb la neurotoxina botulínica C1 (BoNT/C1). p value < 0,0001.

En les cèl·lules immunitàries sintaxina 4 i SNAP23 formen els complexos trans-SNARE implicats en l'alliberació de citocines aparellant-se amb les R-SNARE VAMP8, VAMP7, VAMP3

i VAMP2 dels grànuls de secreció (Stanley i Lacy, 2010). La toxina BoNT/C1 no proteolitza sintaxina4, sinó principalment sintaxina1 i també sintaxina2 i 3, però bloqueja de forma molt efectiva l'alliberació de TNF- $\alpha$  en les cèl·lules de glia. Tenint en compte que les possibles dianes de la toxina en les astròcits són sintaxina1, 2 i 3, i en la micròglia només sintaxina2 i 3, i que les primeres cèl·lules en activar-se i les que produeixen principalment TNF- $\alpha$  són les cèl·lules de la micròglia, aquests resultats suggereixen que l'alliberació de TNF- $\alpha$  es realitza mitjançant les proteïnes SNARE sintaxina2 i 3 en les cèl·lules glials. Malgrat això, són necessaris més experiments amb tècniques més específiques, com siRNA o dominants negatius, per determinar exactament quines isoformes de les proteïnes SNARE estan implicades en l'alliberació de la secreció regulada de TNF- $\alpha$  en les cèl·lules glials.

### **3. Regulació de l'expressió de proteïnes exocítiques i la via de secreció regulada per calci en astròcits diferenciats.**

Per estudiar la secreció regulada per calci en astròcits *in vitro*, s'han buscat les condicions en les que els astròcits presenten un fenotip diferenciat semblant al que presenten *in vivo*. El tractament amb anàlegs del cAMP produeix canvis dramàtics en la morfologia i fisiologia dels astròcits, proporcionant un fenotip diferenciat en cultiu apte per realitzar estudis de secreció regulada de pèptids. Tanmateix, encara existeix certa controvèrsia a la literatura si aquests canvis són deguts a l'adquisició d'un fenotip reactiu (Fedoroff *et al.*, 1984; Bochelen *et al.*, 2000) o un fenotip més madur, diferenciat (McManus *et al.*, 1999).

Mitjançant l'estudi amb *microarrays* s'ha determinat que els anàlegs de cAMP disminueixen la transcripció de RNA implicats en la proliferació i el desenvolupament. Contràriament, els gens típicament relacionats amb els astròcits madurs com els del suport metabòlic i estructural de les neurones i el control de l'homeòstasi iònica estan sobreexpressats en el tractament amb cAMP. Aquests resultats juntament amb l'observació que el transcriptoma global dels astròcits en cultiu tractats amb cAMP s'assembla més al perfil del transcriptoma dels astròcits madurs i no dels astròcits en desenvolupament aïllats en fresc, suggereix que el tractament amb cAMP indueix diferenciació (Cahoy *et al.*, 2008). També el tractament amb cAMP indueix la *down*-regulació de gens relacionats distintivament amb l'activació astrogliàl com, la hiperplàsia, la reorganització del citoesquelet, el desencadenament de les reaccions immunològiques i la formació de la cicatriu glial (Sofroniev, 2009). Aquests resultats estan en concordança amb estudis previs de *microarrays* on els astròcits tractats amb citocines incrementen l'expressió dels gens implicats en l'astrogliosi (Halonen *et al.*, 2006; Falsig *et al.*, 2006; John *et al.*, 2003). Els resultats obtinguts mostren que

el transcriptoma dels astròcits en cultiu tractats amb 8Br-cAMP és més semblant al de les cèl·lules *in vivo*, la qual cosa indica que la senyalització del cAMP confereix un fenotip *in vivo* reprimint l'activació i promovent la diferenciació.

Un nombre creixent de treballs ha demostrat que els astròcits presenten una via d'alliberació de gliotransmissors dependent de calci (Volterra i Meldonesi, 2005). Els últims anys, s'han identificat diversos pèptids sintetitzats i alliberats pels astròcits que regulen diferents funcions neuronals.

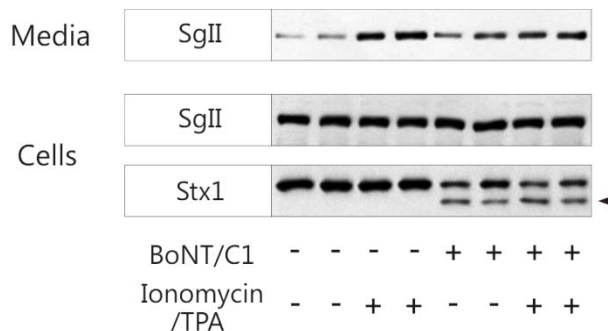
Els astròcits alliberen de forma dependent de calci el pèptid ANP expressat de forma exògena (Krzan *et al.*, 2003) i nosaltres hem determinat que la seva secreció augmenta en el tractament amb anàlegs del cAMP. Aquesta secreció regulada per calci de l'ANP en astròcits no només s'ha determinat en astròcits en cultiu sinó també en seccions d'hipocamp (Potokar *et al.*, 2009).

El pèptid endogensecretogranina II presenta una secreció en astròcits en cultiu extremadament baixa (Fischer-Colbrie, 1993; Calegari *et al.*, 1999), encara que és suficientment alta per ser detectada mitjançant *western blot*. El seu contingut augmenta en astròcits en cultiu tractats amb 8Br-cAMP, consistentment amb la presència del element funcional de resposta a cAMP (CRE) en el seu promotor (Taupenot *et al.*, 2003). En els astròcits tractats amb 8Br-cAMP es pot detectar l'alliberació de la SgII induïda per un increment de calci en el medi de cultiu als 5 min. La dependència dels nivells de calci s'ha demostrat posteriorment abolint l'efecte de la ionomicina/TPA amb el quelant de calci intracel·lular BAPTA-AM.

En el tractament amb 8Br-cAMP es realitzen efectes oposats al tractament amb citocines sobre la regulació de les proteïnes exocítiques en astròcits en cultiu augmentant l'expressió de les proteïnes clàssicament implicades en la secreció regulada com sintaxina1, Munc 18a i VAMP-2. Aquests canvis podrien explicar l'augment de l'alliberació de pèptids, encara que la proteïna més regulada per aquest tractament, VAMP-2, no es troba majoritàriament en els grànuls que contenen els pèptids, on podria estar substituïda per una altra VAMP. L'augment d'altres proteïnes exocítiques com sintaxina1, Munc18a o sinaptotagmina IV, podrien estar relacionades amb l'augment de l'alliberació dels pèptids induïda per calci en les cèl·lules tractades.

També el tractament dels cultius d'astròcits amb la toxina botulínica BoNT/C1 afecta l'alliberació de SgII. La toxina BoNT/C1 és una metal·loproteasa que, mitjançant la proteòlisi específica de sintaxina1, 2, 3 i SNAP25, produeix un bloqueig de la secreció dependent de SNAREs (Humeau *et al.*, 2000). En neurones, la toxina entra a l'interior cel·lular mitjançant la

seva unió a receptors/acceptors d'alta afinitat; en canvi, en cèl·lules no neuronals, la toxina botulínica s'internalitza per un procés d'endocitosi inespecífic i els seus efectes són dependents de temps i dosi. El tractament amb BoNT/C1 no afecta la secreció basal de SgII, però sí que bloqueja l'augment de la secreció induïda per ionomicina/TPA, relacionant la sintaxina1B, 2 i 3 amb la secreció de pèptids depenent de calci (Figura 22). Futurs estudis amb eines més específiques podran dilucidar les isoformes de les proteïnes SNARE implicades en la secreció regulada.



**FIGURA 22. Dependència de les proteïnes SNARE en l'alliberació de SgII regulada per calci en astròcits.**

Astròcits en cultiu tractats amb 8Br-cAMP durant 8 dies la secreció de SgII està augmentada pel tractament amb ionomicina/TPA durant 10 min. En canvi, si els astròcits han estat tractats prèviament 48h amb la toxina botulínica BoNT/C1 50 nM, encara que no afecta a la secreció basal de SgII, no

es produeix l'augment d'alliberació en estimular les cèl·lules amb ionomicina/TPA. Cada carril representa totes les proteïnes presents en el medi o tot el lisat cel·lular de cada pou. L'*immunoblot* amb anticossos contra Stx1 s'usa per comprovar el tractament amb la toxina.

En general, existeix una bona correlació entre l'anàlisi de proteïnes mitjançant *western blot* i l'anàlisi de RNA mitjançant *microarrays*, com l'augment de l'expressió de VAMP2 i la disminució de sintaxina2 en el tractament amb 8Br-cAMP, que es regulen de forma inversa en el tractament amb citocines. També altres proteïnes implicades en el tràfic de vesícules com Rab3a, Rab27b, la cinesina 1a (Kif1a), així com el filament intermedi GFAP, estan sobreexpressades, cosa que podria facilitar el transport dels grànuls i la seva secreció.

En el tractament amb 8Br-cAMP també se sobreexpressen alguns membres de la família de les granines com cromogranina A (CgA), cromogranina B (CgB), secretogranina II (SgII) i secretogranina V (SgV). CgA és un regulador principal en la formació de grànuls de secreció (Taupenot *et al.*, 2005), però també altres proteïnes són importants com secretogranina II i CgB, ja que la seva expressió és suficient per induir la formació de vesícules fins i tot en cèl·lules que no presenten una via de secreció regulada (Beuret *et al.*, 2004). Algunes d'aquestes granines està descrit que s'expressen en astròcits tant en cultiu (Fischer-Colbrie *et al.*, 1993) com *in vivo* (Hur *et al.*, 2010).

Els grànuls de secreció en astròcits contenen les granines CgA, CgB i SgII i les tres isoformes del receptors d'IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) (Hur *et al.*, 2010). Està descrit que CgA i CgB s'uneixen directament als IP<sub>3</sub>R a pH 5,5, que és el que hi ha a l'interior dels grànuls, activant-los amb l'augment del temps mig d'obertura i la probabilitat d'obertura quan s'uneixen al seu lligand. Els grànuls de secreció es consideren els principals reservoris de calci intracel·lular, són més

sensibles perquè requereixen concentracions més baixes d'IP<sub>3</sub> per activar-se i a més, poden provocar augments de calci a nivell local, relacionant-los directament amb el control de l'exocitosi. Per tant, els augments d'expressió de CgA i CgB en el tractament amb anàlegs de l'AMPc podria augmentar els nivells d'exocitosi.

En un treball recent es descriu un fenotip astrocític on estan augmentats els grànuls de secreció i l'expressió dels seus marcadors quan els nivells d'expressió del factor de transcripció REST són baixos (Prada *et al.*, 2011). Degut a que en el nostre anàlisi de *microarrays* no s'observen variacions en els nivells d'expressió de REST en el tractament amb 8Br-cAMP, els efectes del cAMP en la maduració dels astròcits podrien ser independents de REST.

#### **4. Receptors de direccionament a grànuls de secreció neuroendocrins en astròcits.**

Originàriament, la secretogranina III va ser identificada en neurones i les cèl·lules endocrines de la hipòfisi (Ottiger *et al.*, 1990). Més recentment s'ha descrit l'expressió de SgIII en altres tipus cel·lulars que presenten una via de secreció regulada com els mastòcits (Prasad *et al.*, 2008) i les cèl·lules PC12 (Han, 2008). En aquest treball s'ha determinat que els astròcits expressen nivells alts tant de mRNA com de la proteïna de SgIII. Aquests resultats coincideixen amb la hibridació *in situ* que es troba a l'*Allen Brain Atlas*, on el marcatge del mRNA de SgIII es troba tant en neurones com en cèl·lules gials (Lein *et al.*, 2007). Mitjançant un marcatge doble, es mostra que l'expressió de SgIII en cèl·lules no neuronals correspon gairebé de forma exclusiva a diferents poblacions d'astròcits, en els quals varia la intensitat de l'expressió. Mentre que l'expressió de SgIII és alta en els astròcits corticals i la glia de Bergmann, és molt baixa en els astròcits situats en la substància blanca.

En astròcits en cultiu, ja s'havien descrit alguns dels components típics de la via de secreció de neurotransmissors, com els transportadors vesiculars i les proteïnes exocítiques. Però en astròcits *in vivo*, no s'han pogut identificar totes aquestes proteïnes. En canvi, els nostres resultats impliquen la SgIII en la via de secreció en astròcits *in vivo*.

La SgIII que es detecta en els astròcits presenta un pes molecular superior a la SgIII que es troba en els neurones, similar a la SgIII recentment detectada a les cèl·lules PC12 i a les glàndules adrenals (Han *et al.*, 2008). Això és a causa que els astròcits no expressen les convertases PC1/3 i PC2 que són les encarregades de processar les prohormones (Winsky-Sommerer *et al.*, 2000). De manera similar, altres substrats de les convertases com la secretogranina II i la proencefalina tampoc són processades en els astròcits (Batter *et al.*, 1991;

Fischer-Colbrie *et al.*, 1993). Malgrat això, falta determinar si la forma no processada de SgIII té un paper diferencial o si és processada extracel·lularment per donar lloc a pèptids bioactius.

La interacció de la SgIII amb la carboxipeptidasa E té un paper fonamental en la classificació dels pèptids cap als grànuls de secreció (Hosaka, 2005). Com ja hem descrit anteriorment, els astròcits presenten els components moleculars necessaris per a l'alliberació de grànuls de secreció i poden alliberar pèptids d'una manera depenent de calci (Vilijn *et al.*, 1989; Batter *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 2000; Krzan *et al.*, 2003; Ramamoorthy i Whim, 2008), per tant, suposem que SgIII realitza una funció en la via de secreció de pèptids en els astròcits. Tanmateix, el baix contingut de SgIII a l'interior de les cèl·lules i la seva abundància en el medi extracel·lular indica que és ràpidament alliberada a l'exterior cel·lular, però s'ha demostrat que petites quantitats de SgIII són suficients per direccionar gran quantitat de pèptids als grànuls de secreció a les cèl·lules PC12 (Han *et al.*, 2008). Els astròcits expressen petites quantitats de CgA, un factor d'agregació clau per a la biogènesi dels grànuls que interacciona amb SgIII, fet que podria explicar la baixa retenció de SgIII en els astròcits (Majdoubi *et al.*, 1996; Woulfe *et al.*, 1999); i a més a més, els astròcits presenten una alliberació basal bastant elevada i una baixa alliberació estimulada comparada amb altres cèl·lules secretores.

## **5. Regulació de l'expressió de SgIII en astròcits *in vivo* en gliosi reactiva**

A més de les funcions intracel·lulars, les granines i els seus pèptids tenen funcions fonamentals en la comunicació cèl·lula-cèl·lula, incloent processos homeostàtics, reaccions inflamatòries i la immunitat innata (Helle, 2004). Per exemple, la CgA i la secretoneurina, un pèptid derivat de la SgII, són potents activadors de la micròglia i factors quimiotàctics i angiogènics, respectivament (Taupenot *et al.*, 1996; Fischer-Colbrie *et al.*, 2005).

La regulació de les granines clàssiques en el cervell s'ha estudiat en diferents condicions (Winklerand Fischer-Colbrie, 1992; Fischer-Colbrie *et al.*, 1995). CgA, CgB i SgII/secretoneurina es regulen de forma diferencial en diferents poblacions neuronals després de diverses alteracions cerebrals, com en l'isquèmia o en l'epilèpsia (Martí *et al.*, 2001; Pirker *et al.*, 2001), però no en cèl·lules no-neuronals. El que hem descrit és la regulació de la SgIII, tant a nivell de mRNA com de proteïna, en astròcits reactius *in vivo* després d'una lesió traumàtica al cervell. El que s'observa és l'acumulació de la proteïna SgIII en el citoplasma dels astròcits, encara que caldrien més experiments per comprovar quina és la causa d'aquest efecte.

També veiem que la regulació transcripcional de les diferents granines en astròcits és diferencial. Així com veiem que SgII augmenta la seva transcripció quan augmenten els nivells intracel·lulars de cAMP, la SgIII augmenta quan es produeix una lesió traumàtica, on els astròcits es tornen reactius i sobreexpressen una gran varietat de pèptids, com per exemple, hormones peptídiques, factors de creixement i citocines (Nie i Olsson, 1996; Goss *et al.* 1998; Acarin *et al.*, 2000; Jahnke *et al.*, 2001). Aquesta regulació coordinada de la SgIII i la secreció de pèptids està reforçada per estudis previs on es descriu una regulació paral·lela de SgIII i el precursor de la propiomelanocortina en la hipòfisi intermèdia de *Xenopus* en l'adaptació al color, (Holthuis i Martens, 1996). De manera que hipotetitzem un paper important en el tràfic de pèptids en astròcits reactius *in vivo*.

### 5.1. En humans

A causa d'aquesta funcionalitat potencial de SgIII tant en la secreció de pèptids en astròcits com en la regulació de la seva expressió durant l'activació glial, es va iniciar un estudi d'expressió en malalties neurodegeneratives en humans on es produeix gliosi.

En malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer i el Parkinson (Delacourt, 1990; Pike *et al.*, 1995; Knott *et al.*, 2002) i després de l'exposició a substàncies tòxiques com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) i l'àcid kaínic es produeix l'astrocitosi reactiva en el SNC.

S'estima que en l'actualitat 24 milions de persones en el món pateixen demència, sent la més comú la malaltia d'Alzheimer (Ballard *et al.*, 2011). Aquesta malaltia és un desordre neurodegeneratiu progressiu que es caracteritza per l'acumulació anormal de proteïnes en el sistema nerviós. Quan augmenta la concentració, ja sigui per sobreproducció o falta d'eliminació, el  $\beta$ -amiloide s'agrega formant oligòmers, protofibril·les, fibril·les i finalment plaques amiloides a l'espai extracel·lular. Les proteïnes Tau i  $\alpha$ -sinucleïna també es poden auto-agregar formant oligòmers i grans incusions a l'interior de les neurones, conegudes com cabdells neurofibril·lars i cossos de Lewis respectivament. Totes aquestes lesions promouen l'activació de les cèl·lules de la micròglia i els astròcits (Mucke, 2009).

A causa de l'elevada prevalença i l'astrocitosi present, usem la malaltia d'Alzheimer com a model d'astrocitosi per estudiar la regulació de l'expressió de SgIII en humans.

Mitjançant immunocitoquímica en el cervell humà adult, la SgIII es detecta principalment en les capes superiors de l'escorça, en l'hilus del gir dentat i a la capa piramidal de la regió CA3 de l'hipocamp. A més, també es detecta en axons varicosos i en els somes d'algunes neurones, piramidals i no piramidals, de la regió CA1 de l'hipocamp. També



cèl·lules de morfologia astrocitària a la substància blanca i a la superfície del cervell expressen SgIII, però no de forma tan abundant com en ratolins.

En pacients d'Alzheimer, mitjançant immunocitoquímica s'observa un canvi en la distribució de SgIII respecte dels individus control. SgIII es troba a les plaques senils identificades pel marcatge amb  $\beta$ -amiloide, mentre que desapareix del soma d'algunes poblacions neuronals, encara que no s'observen canvis en el contingut total d'aquesta proteïna a l'escorça. Mitjançant doble marcatge, tal i com s'observa a la figura 23, SgIII a les plaques senils es troba associada a les neurites distròfiques i als astròcits. Aquest són resultats preliminars que coincideixen amb els resultats previs obtinguts en ratolins on SgIII s'acumula en el citoplasma dels astròcits, suggerint que SgIII podria participar en els mecanismes inflamatoris i degeneratius de la malaltia d'Alzheimer.

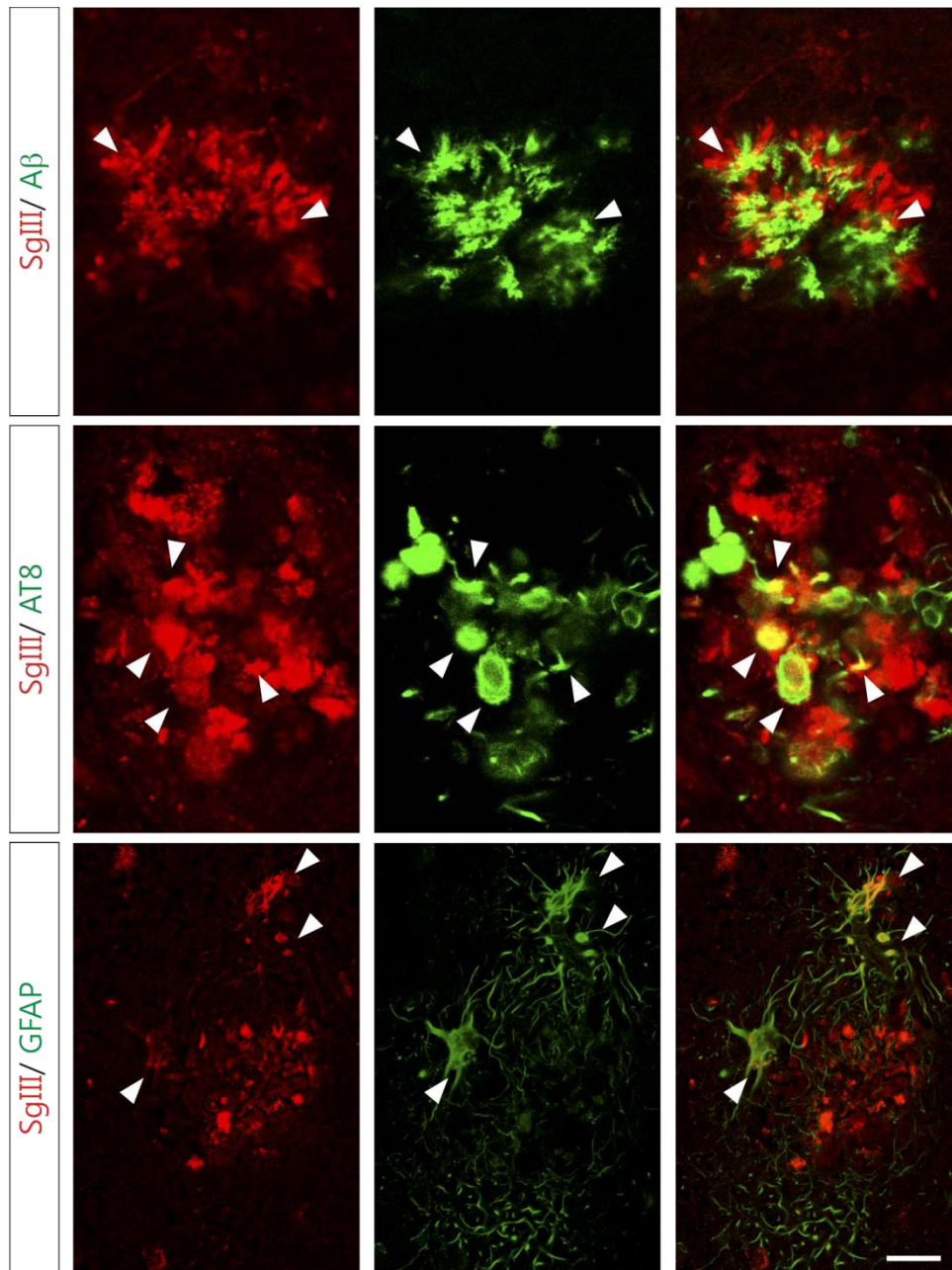


FIGURA 23. El marcatge de SgIII en plaques senils en humans està associat amb neurites distròfiques i amb astròcits activats. Les imatges de microscòpia confocal amb marcatge doble mostren que la majoria de la SgIII no col·localitza amb els dipòsits extracel·lulars de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). En canvi, en les neurites distròfiques, identificades pels agregats de fosfo-Tau (AT8), i en els astròcits activats que envolten les plaques, identificats per l'expressió de GFAP, si que contenen SgIII. Les puntes de fletxa indiquen col·localització. Escala: 50  $\mu$ m.



**CONCLUSIONS**

---



1. Neurones, astròcits i micròglia expressen patrons diferencials de proteïnes que mitjancen els processos d'exocitosi.
2. Isoformes de syntaxines i els seus reguladors Munc18 són diferencialment sobreexpressats durant l'activació glial mitjançada per agents proinflamatoris amb un possible paper en l'alliberació de citocines.
3. La senyalització mitjançada per la via del cAMP restringeix les característiques d'immaduresa i activació dels astròcits en cultiu i promou la seva maduració.
4. La diferenciació dels astròcits per cAMP augmenta els nivells d'expressió de proteïnes de la via de secreció regulada per calci promovent l'alliberació evocada de pèptids.
5. Els astròcits *in vivo* e *in vitro* presenten una forma no processada de secretogranina III, un receptor de direccionament a grànuls de secreció.
6. L'activació astrogliàl *in vivo* en lesions traumàtiques indueix la sobreexpressió de secretogranina III, el que suggereix un paper repressor o potenciador del dany cerebral.



## **BIBLIOGRAFIA**

---





# A

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* **7**(1): 41-53 (2006)
- Acarin L, González B, Catellano B. Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur J Neurosci.* **12**(10):3 505-20 (2000)
- Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E. Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci.* **22**(21): 9430-44 (2002)
- Allen NJ i Barres BA. Neuroscience: Glia- more than just brain glue. *Nature.* **457**(7230): 675-677 (2009)
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol.* **63**:795-813 (2001)
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* **22**(5): 208-215 (1999)
- Attwell D, Buchan AM, Charkpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* **468**(7321): 232-243 (2010)
- Auld DS, Robitaille R. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron.* **40**(2):389-400 (2003)

# B

- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* **377**(9770): 1019-1031 (2011)
- Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* **60**(3): 430-440 (2008)
- Batter DK, Vilijn MH, Kessler J. Cultured astrocytes release proenkephalin. 1991. *Brain Res.* **563**(1-2): 28-32 (1991)
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Mallenka RC. Control of synaptic strength by glial TNF alpha. *Science.* **295**: 2282-2285 (2002)
- Benado A, Nasagi-Ativa Y, Dagi-Eisenberg R. Protein trafficking in immune cells. *Immunology.* **214**(7): 507-525 (2009)

- Bergami M, Santi S, Formaggio E, Cagnoli C, Verderio C, Blum R, Berninger B, Matteoli M, Canossa M. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *J Cell Biol.* **183**: 213-221 (2008)
- Bergersen LH i Gundersen V. Morphological evidence for vesicular glutamate release from astrocytes. *Neuroscience.* **158**: 260-265 (2009)
- Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia.* **55**(3): 233-238 (2007)
- Beuret N, Stettler H, Renold A, Rutishauser J, Spiess M. Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells. *J Biol Chem.* **279**: 20242-20249 (2004)
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci.* **7**: 613-620 (2004)
- Blazquez M and Shennan KI. Basic mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway. *Biochem Cell Biol.* **78**: 181-191 (2000)
- Blott EJ i Griffiths GM. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**(2): 122-131 (2002)
- Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M, Griffiths GM. Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci.* **114**: 2045-2416 (2001)
- Bochelen D, Langley K, Adamczyk M, Kupferberg A, Hor F, Vincendon G, Mersel M. 7beta-hydroxysterol is cytotoxic to neonatal rat astrocytes in primary culture when cAMP levels are increased. *J Neurosci Res.* **62**: 99-111 (2000)
- Bonanomi D, Benfenati F, Valtorta F. Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle. *Prog Neurobiol.* **80**(4): 177-217 (2006)
- Bonifacio JS i Glick BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* **116**: 153-166 (2004)
- Borges R, Díaz-Vera J, Domínguez N, Arnau MR, Machado JD. Chromogranins as regulators of exocytosis. *J Neurochem.* **114**: 335-343 (2010)
- Bradl M i Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**(1): 37- 53 (2010)
- Braulke T i Bonifacio JS. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1793**(4): 605-614 (2009)

- Buffo A, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol.* **79**(2): 77-89 (2010)
- Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci.***22**(2): 73-86 (2004)
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci.* **28**(1):264-78. (2008)
- Calegari F, Coco S, Taverna E, Bassetti M, Verderio C, Corradi N, Matteoli M, Rosa P. A regulated secretory pathway in cultured hippocampal astrocytes. *J Biol Chem.* **274**(32):22539-47 (1999)
- Carmona MA, Murai KK, Wang L, Roberts AJ, Pasquale EB. Glial ephrin-A3 regulates hippocampal dendritic spine morphology and glutamate transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**(3): 12524-9 (2009)
- Charles P, Hernandez MP, Stankoff B, Aigrot MS, Colin C, Rougon C, Zalc B, Lubetzki C. Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci.* **97**(13): 7585-7590 (2000)
- Chen XK, Xiong YF, Zhou Z. "Kiss-and-run" exocytosis in astrocytes. *Neuroscientist.* **12**(5): 375-378 (2006)
- Chiergatti E, Chicka MC, Chapman ER, Baldini G. SNAP-23 functions in docking/fusion of granules at low Ca<sup>2+</sup>. *Mol Biol Cell.* **15**(4):1918-30 (2004)
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P and Barres, BA. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell.* **120**(3): 421-433 (2005)
- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem.* **278**: 1354-1362 (2003)

**D** Dagainakatte GC, Gadzinski A, Emmett RJ, Stark JL, Gonzales ER, Yan P, Lee JM, Cross AH, Gutmann DH. Expression profiling identifies a molecular signature of reactive astrocytes stimulated by cyclic AMP or proinflammatory cytokines. *Exp Neurol.* **210**: 261-267 (2008)

Dancourt J i Barlowe C. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem.* **79**: 777-802 (2010)

De Matteis MA and Luini A. Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**(4): 273-284 (2008)

Delacourt A. General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology.* **40**(1):33-7 (1990)

Dideakos JD i Reudelhuber TL. Sending proteins to the dense core secretory granules: still a lot to sort out. *J Cell Biol.* **99**: 97-104 (2007)

Dowell JA, Johnson JA, Li J. Identification of astrocyte secreted proteins with a combination of shotgun proteomics and bioinformatics. *J Proteome Res.* **8**: 4135-4143 (2009)

Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Swanson RA. P2X<sub>7</sub> receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci.* **23**: 1320-1328 (2003)

Dugan LL, Kim JS, Zhang Y, Bart RD, Sun Y, Holtzman DM, Gutmann DH. (1999). Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *J Biol Chem.* **274**: 25842-25848.

**E** Eder C. Mechanisms of interleukin-1 beta release. *Immunobiology.* **214**: 543-553 (2009)

**F** Faden, AI. Experimental neurobiology of central nervous system trauma. *Crit Rev Neurobiol.* **7**(3-4):175-86 (1993)

Falsig, J., Pörzgen, P., Lund, S., Schratzenholz, A., and Leist, M. The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function. *J Neurochem.* **96**: 893-907 (2006)

Fasshauer D, Antonin W, Margittai M, Pabst S, Jahn R. Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J Biol Chem.* **274**(22):15440-6 (1999)

- Fasshauser D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA*.**95**: 15781-15786 (1998)
- Fedoroff S, McAuley WA, Houle JD, Devon RM. Astrocyte cell lineage. V. Similarity of astrocytes that form in the presence of dBcAMP in cultures to reactive astrocytes in vivo. *J Neurosci Res*.**12**: 14-27 (1984)
- Fellin T. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J Neurochem*. **108**(3): 533-544 (2009)
- Fischer-Colbrie R, Kirchmair R, Kähler CM, Wiedermann CJ, Saria A. Secretoneurin: a new player in angiogenesis and chemotaxis linking nerves, blood vessels and the immune system. *Curr Protein Pept Sci*. **6**(4):373-85 (2005)
- Fischer-Colbrie R, Kirchmair R, Schobert A, Olenik C, Meyer DK, Winkler H. Secretogranin II is synthesized and secreted in astrocyte cultures. *J Neurochem*. **60**(6):2312-4 (1993)
- Fischer-Colbrie R, Laslop A, Kirchmair R. Secretogranin II: molecular properties, regulation of biosynthesis and processing to the neuropeptide secretoneurin. *Prog Neurobiol*. **46**(1):49-70 (1995)
- Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **23**(7):1152-60 (2003)
- Flieger O, Engling A, Bucala R, Lue H, Nickel W, Bernhagen J. Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett*. **551**: 78-86 (2003)
- Freeman MR. Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science*. **330**(6005): 774-778 (2010)

**G**

- Goss JR, O'Malley ME, Zou L, Styren SD, Kochanek PM, DeKosky ST. Astrocytes are the major source of nerve growth factor upregulation following traumatic brain injury in the rat. *Exp Neurol*. **149**(2):301-9 (1998)
- Greco TM, Seeholzer SH, Mak A, Spruce L, Ischiropoulos H. Quantitative mass spectrometry-based proteomics reveals the dynamic range of primary mouse astrocyte protein secretion. *J Proteome Res*. **7**: 2764-2774 (2010)
- Guillemot F. Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Prog Neurobiol*. **83**(1): 37-52 (2007)

- H** Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J. Neurosci.* **27**: 6473-6477 (2007)
- Halonen SK, Woods T, McInnerney K, Weiss LM. Microarray analysis of IFN-gamma response genes in astrocytes. *J Neuroimmunol.* **175**: 19-30 (2006)
- Hamilton NB i Attwell D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci.***11**(4): 227-238 (2010)
- Hampton DW, Rhodes KE, Zhao C, Franklin RJM, Fawcett JW. The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience.* **127** (4): 813-820 (2004)
- Han L, Suda M, Tsuzuki K, Wang R, Ohe Y, Hirai H, Watanabe T, Takeuchi T, Hosaka M. A large form of secretogranin III functions as a sorting receptor for chromogranin A aggregates in PC12 cells. *Mol Endocrinol.* **22**(8):1935-49 (2008)
- Hepp R, Perraut M, Chasserot-Golaz S, Galli T, Aunis D, Langley K, Grant NJ. Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23. *Glia.* **27**(2):181-7 (1999)
- Herx LM i Yong VW. Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. *J Neuropathol Exp Neurol.* **60**: 961-971 (2001)
- Hewett JA. Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J Neurochem.* **110**(6): 1717-1736 (2009)
- Hirabayashi Y, Suzki N, Tsuboi M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Koseki H, Vidal M, Gotoh Y. Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron.* **63**: 600-613 (2009)
- Hochstim C, Deneen B, Lukaszewicz A, Zhou Q, Anderson DJ. Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell.* **133**: 510-522 (2008)
- Holthuis JC, Martens GJ. The neuroendocrine proteins secretogranin II and III are regionally conserved and coordinately expressed with proopiomelanocortin in *Xenopus* intermediate pituitary. *J Neurochem.* **66**(6): 2248-56 (1996)
- Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Kato T, Takeuchi T. Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. *J Cell Sci.* **118**: 4785-4795 (2005)

Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci.* **28**(20): 5207–5217 (2008)

Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie.* **82**(5): 427-46 (2000)

Huneycutt BS, Benveniste EN. Regulation of astrocyte cell biology by the cAMP/protein kinase A signaling pathway. *Adv Neuroimmunol.* **5**(3): 261-9 (1995)

Hur YS, Kim KD, Paek SH, Yoo SH. Evidence for the existence of secretory granules (dense-core vesicle)-based inositol 1,4,5-triphosphate-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling system in astrocytes. *PLoS One.* **5**(8), e11973 (2010)

I Imai A, Nashida T, Shimomura H. Roles of Munc18-3 in amylase release from rat parotid acinar cells. *Arch Biochem Biophys.* **422**(2): 175-82 (2004)

J Jahn R i Scheller RH. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**(9): 631-43 (2006)

Jahn R i Sudhof TC. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem.* **68**: 863-911 (1999)

Jahnke GD, Brunssen S, Maier WE, Harry GJ. Neurotoxicant-induced elevation of adrenomedullin expression in hippocampus and glia cultures. *J Neurosci Res.* **66**(3): 464-74 (2001)

Jaiswal JK, Fix M, Takano T, Nedergaard M, Simon SM. Resolving vesicle fusion from lysis to monitor calcium-triggered lysosomal exocytosis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**(35): 14151-14156 (2007)

Jean Y, Lercher L, Dreyfus C. Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain of astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway. *Neuron Glia Biol.* **4**, 35-42 (2008)

John GR, Lee SC, Brosnan CF. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist.* **9**: 10-22 (2003)

John GR, Lee SC, Song X, Riviaccio M, Brosnan CF. IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia.* **49**: 161-176. (2005)

Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature Neurosci.* **10**: 331-339 (2007)



- K**andel ER, Schwartz JH, Jesell TM. Principles of Neuroscience 4<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill. New York (2000)
- Keene SD, Greco TM, Parastatidis I, Lee SH, Hughes EG, Balice-Gordon RJ, Speicher DW, ischiropoulos H. Mass spectrometric and computational analysis of cytokine-induced alterations in the astrocyte secretome. *Proteomics*. **9**: 768-782 (2009)
- Kettenmann H i Ransom BR. Neuroglia, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, 2004
- Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA. Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocytes cultures. *J Neurosci*. **10**: 1583-1591 (1990)
- Knott C, Stern G, Kingsbury A, Welcher AA, Wilkin GP. Elevated glial brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's diseased nigra. *Parkinsonism Relat Disord*. **8**(5):329-41 (2002)
- Koch C i Laurent G. Complexity and the nervous system. *Science*. **284**(5411): 96-98 (1999)
- Kofuji P i Newman EA. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*. **129**(4): 1045-1056 (2004)
- Koshimizu H, Kim T, Cawley NX, Loh YP. Chromogranin A: A new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis. *Regul Pept*. **165**(1): 95-101 (2010)
- Kriegstein A i Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. **32**: 149-84 (2009)
- Krzan M, Stenovec M, Kreft M, Pangrsic T, Grilc S, Haydon PG, Zorec R. Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes. *J Neurosci*. **23**(5): 1580-3 (2003)
- L**astres-Becker I, Fernández-Pérez A, Cebolla B, Vallejo M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates glial fibrillary acidic protein gene expression in cortical precursor cells by activating Ras and Rap1. *Mol Cell Neurosci*. **39**: 291-301 (2008)
- Lee S, Park JY, Lee WH, Kim H, Park HC, Mori K, Suk K. Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. *J Neurosci*. **29**(1): 234-239 (2009)
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A,

Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramie AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan J, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. **445**: 168-176.(2007)

Li D, Ropert N, Koulakoff A, Giaume C, Oheim M. Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing  $Ca^{2+}$ -regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J Neurosci*. **28**(30): 7648-7658 (2008)

Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem*. **89**, 1092-1100 (2004)

Liu Y, Rao MS. Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. *Biol Cell*. **96**(4): 279-90 (2004)

# M

Majdoubi ME, Metz-Boutigue MH, Garcia-Sablone P, Theodosis DT, Aunis D. Immunocytochemical localization of chromogranin A in the normal and stimulated hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *J Neurocytol*. **25**(7):405-16 (1996)

Malarkey EB i Parpura V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int*. **52**: 142-154 (2008)

Malsam J, Kreye S, Söllner TH. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci*. **65**: 2814-2832 (2008)

Martineau M, Galli T, Baux G, Mothet JP. Confocal imaging and tracking of the exocytotic routes for D-serine mediated transmission. *Glia*. **56**: 1271-1284 (2008)

Matyash V i Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev*. **63**(1-2): 2-10 (2010)

- McManus MF, Chen LC, Vallejo I, Vallejo M. Astroglial differentiation of cortical precursor cells triggered by activation of the cAMP-dependent signaling pathway. *J Neurosci.* **19**: 9004-9015 (1999)
- Meeuwsen S, Persoon-Deen C, Bsibsi M, Ravid R, van Noort JM. Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to proinflammatory stimuli. *Glia.* **43**: 243-253 (2003)
- Miller FD i Gauthier AS. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron.* **54**: 357-369 (2007)
- Mingorance A, Solé M, Munetón V, Martínez A, Nieto-Sampedro M, Soriano E, del Río JA. Regeneration of lesioned entorhino-hippocampal axons in vitro by combined degradation of inhibitory proteoglycans and blockade of Nogo-66/NgR signaling. *FASEB J.* **20**(3): 491-3 (2006)
- Montana V, Malarkey EB, Verderio C, Matteoli M, Parpura V. Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia.* **54**(7):700-15 (2006)
- Moore NH, Costa LG, Schaffer SA, Goodlett DR, Guizzetti M. Shotgun proteomics implicates extracellular matrix proteins and protease systems in neuronal development induced by astrocyte cholinergic stimulation. *J Neurochem.* **108**(4): 891-908 (2008)
- Mothet JP, Pollegoni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**: 50606-50611 (2005)
- Mucke L. Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature.* **461**(7266):895-7 (2009)
- Muotri AR i Gage FH. Generation of neuronal variability and complexity. *Nature.* **441**(7097): 1087- 1093 (2006)
- Murray RZ, Wylie FG, Khromykh T, Hume DA, Stow JL. Syntaxin 6 and Vti1b form a novel SNARE complex, which is up-regulated in activated macrophages to facilitate exocytosis of tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* **280**: 10478-10483 (2005)
- N** Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, Miyazono K, Kishimoto T, Kageyama R, Taga T. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**(10): 5868-5873 (2001)

- Nash B, Ioannidou K, Barnett SC. Astrocyte phenotypes and their relationship to myelination. *J Anat.* **219**(1): 44-52 (2010)
- Nave KA. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature.* **468**(7321): 244-252 (2010)
- Nickel W. Pathways of unconventional protein secretion. *Curr Opin Biotechnol.* **21**(5): 621-626 (2010)
- Nie XJ i Olsson Y. Endothelin peptides in brain diseases. *Rev Neurosci.* **7**(3):177-86 (1996)
- Nieweg K, Schaller H, Pfrieder FW. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem.* **109**(1): 125-134 (2009)
- Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci.* **10**(1): 9- 22 (2009)
- Nishiyama A, Yang Z, Butt A. Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat.* **207**(6): 687-693 (2005)

## O

- Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedegaard M. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* **29**: 547-553 (2006)
- Olson JK and Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* **173**(6): 3916-3924 (2004)
- Osborne KD, Lee W, Malarkey EB, Irving AJ, Parpura V. Dynamic imaging of cannabinoid receptor 1 vesicular trafficking in cultured astrocytes. *ASN Neuro.* **1**(5):283-296 (2009)
- Ottiger HP, Battenberg EF, Tsou AP, Bloom FE, Sutcliffe JG. 1B1075: a brain- and pituitary-specific mRNA that encodes a novel chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles. *J Neurosci.* **10**(9):3135-47 (1990)

## P

- Palop JJ, Chin J, Mucke L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature.* **443**(7113): 768- 773 (2006)
- Pangrsic T, Potokar M, Stenovec M, Kreft M, Fabbretti E, Nistri A, Pryazhnikov E, Khiroug L, Giniatullin R, Zorec R. Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J Biol Chem.* **282**: 28749-28758 (2007)
- Park JJ i Loh YP. How peptide hormone vesicles are transported to the secretion site for exocytosis. *Mol Endocrinol.* **22**(12): 2583-2595 (2008)

- Park JJ, Cawley NX, Loh YP. Carboxypeptidase E cytoplasmic tail-driven vesicle transport is key for activity-dependent secretion of peptide hormones. *Mol Endocrinol.* **22**: 989-1005 (2008)
- Parpura V i Zorec R. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev.* **63**: 83-92 (2010)
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature.* **369**: 744-747 (1994)
- Perea G i Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science.* **317**: 1083-1086 (2007)
- Perea G i Araque A. GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev.* **63**: 93-102 (2010)
- Peters A. A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system. *J neurocytol.* **33**(3): 345-357 (2004)
- Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW. Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* **132**(2):172-9 (1995)
- Ponnambalam S i Baldwin SA. Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Mol Membr Biol.* **20**: 129-139 (2003)
- Potokar M, Stenovec M, Kreft M, Gabrijel M, Zorec R. Physiopathologic dynamics of vesicle traffic in astrocytes. *Histol Histopathol.* **26**: 277-284 (2011)
- Prada I, Marchaland J, Podini P, Magrassi L, D'Alessandro R, Bezzi P, Meldolesi J. REST/NRSF governs the expression of dense-core vesicle gliosecretion in astrocytes. *J Cell Biol.* **193**(3):537-49 (2011)
- R** Ramamoorthy P i Whim MD. Trafficking and fusion of neuropeptide Y-containing dense-core granules in astrocytes. *J Neurosci.* **28**(51): 13815-13827 (2008)
- Ransohoff RM i Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature.* **468**: 253-262 (2010)
- Reyes RC i Parpura V. The trinity of Ca<sup>2+</sup> sources for the exocytotic glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int.* **55**(1-3): 2-8 (2009)
- Robel S, Berninger B, Götz M. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci.* **12**(2): 88-104 (2011)
- Robinson MS. Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol.* **14**(4): 167-174 (2004)

- Rosenberg SS, Kelland EE, Tokar E, De la Torre AR, Chan JR. The geometric and spatial constraints of the microenvironment induce oligodendrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci*. **105**(38): 14662-14667 (2008)
- Rowitch DH i Kriegstein AR. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*. **468**: 214-222 (2010)
- Ruiz-Montasell B, Aguado F, Majó G, Chapman ER, Canals JM, Marsal J, Blasi J. Differential distribution of syntaxin isoforms 1A and 1B in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci*. **8**(12):2544-52 (1996)
- S** Sakry D, Karram K, Trotter K. Synapses between NG2 glia and neurons. *J Anat*. **219** (1): 2-7 (2011)
- Saura J, Tusell JM, Serratosa J. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia*. **44** (3): 183-189 (2003)
- Saura J. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J Neuroinflammation*. **4**: 26-37 (2007)
- Schubert V, Bouvier D, Volterra A. SNARE protein expression in synaptic terminals and astrocytes in the adult hippocampus: A comparative analysis. *Glia*. doi: 10.1002/glia.21190. [Epub ahead of print] (2011)
- Shiga H, Murakami J, Nagao T, Tanaka M, Kawahara K, Matsuoka I, Ito E. Glutamate release from astrocytes is stimulated via the appearance of exocytosis during cyclic AMP-induced morphologic changes. *J Neurosci Res*. **84**: 338-347 (2006)
- Shurety W, Merino-Trigo A, Brown D, Hume DA, Stow JL. Localization and trans-Golgi trafficking of tumor necrosis factor alpha in macrophages. *J Interferon Cytokine Res*. **20**: 427-438 (2000)
- Silver J i Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nature Rev Neurosci*. **5**(2): 146-156 (2004)
- Slezak M, Pfrieger FW. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci*. **26**(10): 531-5 (2003)
- Smith HS. Activated microglia in nociception. *Pain Physician*. **13**(3):295-304 (2010)
- Sofroniew M i Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. **119**: 7-35 (2010)

- Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* **32**: 638-647 (2009)
- Stanley AC i Lacy P. Pathways for cytokine secretion. *Physiology (Bethesda).* **25**(4): 218-29 (2010)
- Stellwagen D i Mallenka RC. Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$ . *Nature.* **440**: 1054-1059 (2006)
- Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**(8): 513-525 (2009)
- Stenovec M, Kreft M, Grilc S, Pangrisc T, Zorec R. EAAT2 density at the astrocyte plasma membrane and Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis. *Mol Memb Biol.* **25**: 203-215 (2008)
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell.* **131**(6): 1164-1178 (2007)
- Stow JL, Low PC, Offenhäuser C, Sangermani D. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunology.* **214**(7): 601-612 (2009)
- Stow JL, Manderson AP, Murray RZ. SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* **6**(12): 919-29 (2006)
- Szatkowsky M, Barbour B, Attwell D. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature.* **348**: 443-446 (1990)
- T** Takahashi K, Nakayama M, Totsune K, Murakami O, Sone M, Kitamuro T, Yoshinoya A, Shibahara S. Increased secretion of adrenomedullin from cultured human astrocytes by cytokines. *J Neurochem.* **74**(1): 99-103 (2000)
- Takano T, Kang J, Jaiswal JK, Simon SM, Lin JH, Yu Y, Li Y, Yang J, Dienel G, Zielke HR, Nedegaard M. Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**: 16466-16471 (2005)
- Taupenot L, Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Chasserot-Golaz S, Aunis D, Bader MF. Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience.* **72**(2): 377-89 (1996)

Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. Role of H<sup>+</sup>-ATPase-mediated acidification in sorting and release of the regulated secretory protein chromogranin A: evidence for a vesiculogenic function. *J Biol Chem.* **280**: 3885-3897 (2005)

Tsang MC, Lo AC, Cheung PT, Chung SS, Chung SK. Perinatal hypoxia-/ ischemia-induced endothelin-1 mRNA in astrocyte-like and endothelial cells. *NeuroReport.* **12**(10): 2265-2270 (2001)

## V

Verkhatsky A i Parpura V. Recent advances in (patho)physiology of astroglia. *Acta Pharmacol Sin.* **31**(9): 1044-1054 (2010)

Verkhatsky A. Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochem Int.* **57**: 332-343 (2010)

Vilijn MH, Das B, Kessler JA, Fricker LD. Cultured astrocytes and neurons synthesize and secrete carboxypeptidase E, a neuropeptide-processing enzyme. *J Neurochem.* **53**(5): 1487-93 (1989)

Volterra A i Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* **6**(8): 626-640 (2005)

## W

Warr O, Takahashi M, Attwell D. Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. *J Physiol.* **514**: 783-793 (1999)

Wigley R, Hamilton N, Nishiyama A, Kirchhoff F, Butt AM. Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocyte and neurons. *J Anat.* **210**(6): 661- 670 (2007)

Winkler H and Fischer-Colbrie R. The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience.* **49**(3):497-528 (1992)

Winsky-Sommerer R, Benjannet S, Rovère C, Barbero P, Seidah NG, Epelbaum J, Dournaud P. Regional and cellular localization of the neuroendocrine prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* **424**(3): 439-60 (2000)

Woulfe J, Deng D, Munoz D. Chromogranin A in the central nervous system of the rat: pan-neuronal expression of its mRNA and selective expression of the protein. *Neuropeptides.* **33**(4):285-300 (1999)

## Y

Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci.* **17**(1): 6-10 (2010)



Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci.* **23**: 3588-3596 (2003)

Yoo SH. Secretory granules in inositol 1,4,5-triphosphate-dependent  $Ca^{2+}$  signaling in the cytoplasm of neuroendocrine cells. *FASEB J.* **24**: 653-664 (2010)

**Z**

Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol.* **9**(8): 945-953 (2007)

Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**: 4459-4464 (2005)

Zhang Y, Luo Y, Zhai Q, Ma L, Dorf ME. Negative role of cAMP-dependent protein kinase A in RANTES-mediated transcription of proinflammatory mediators through Raf. *FASEB J.* **17**: 734-736 (2003)

**ANNEX**

---



## Informe del director

La tesi de Sonia Paco Mercader es basa en els articles següents:

Article 1:

**Cyclic AMP signaling represses activation and promotes differentiation of astrocyte transcriptome**

Paco S, Hummel M, Pla V, Sumoy L, Aguado F.

En preparació.

Article 2:

**Regulation of exocytotic protein expression and Ca<sup>2+</sup>-dependent peptide secretion in astrocytes.**

Paco S, Margelí MA, Olkkonen VM, Imai A, Blasi J, Fischer-Colbrie R, Aguado F.

J Neurochem. 2009 Jul;110(1):143-56.

Índex d'impacte: 3,999

Article 3:

**Secretogranin III is an astrocyte granin that is overexpressed in reactive glia.**

Paco S, Pozas E, Aguado F.

Cereb Cortex. 2010 Jun;20(6):1386-97.

Índex d'impacte: 6,979

Fernando Aguado Tomás, director de la tesi doctoral de Sonia Paco Mercader, certifica que el doctorand ha contribuït als treballs recollits en els tres articles de la següent manera:

En los tres artículos incluidos en la tesis doctoral de Sonia Paco Mercader (dos ya publicados y uno pendiente de publicación), la doctoranda ha realizado la gran mayoría del trabajo experimental desarrollado. La labor realizada incluye experimentos tanto de cultivos celulares como de animales, la aplicación de técnicas bioquímicas y de biología celular y molecular y el uso de aplicaciones de análisis de microarrays. Es de señalar que muchas de las técnicas realizadas fueron puestas a punto por la doctoranda para su utilización en el transcurso de la tesis doctoral. Por otro lado, Sonia Paco Mercader ha participado activamente en el diseño de los experimentos, la interpretación de los resultados y la escritura de los manuscritos. Por todo ello, certifico la máxima responsabilidad de la doctoranda en cada uno de los tres trabajos presentados, como queda reflejado en su autoría de primer firmante.

## Agraïments

Després d'anys sortint tard, mals de cap, nits dormint malament, presses, mals entesos i algun disgust, em quedo amb tots els bons moments perquè val la pena. Així que ja només em queda agrair a tots els que han participat en l'elaboració d'aquesta tesi, per què, que seria d'aquesta tesi sense tots vosaltres?

A la gent del LBI de Merck, de la que vaig aprendre un munt de coses. Entre elles com m'agrada treballar en el laboratori i que no tot surt a la primera, sinó que cal posar-hi empeny! Moltes gràcies a tots ells per acollir a una noia de pràctiques i gràcies a Ramon Messeguer per posar-me en contacte amb Fernando Aguado per a realitzar la tesi.

A Fernando Aguado, per donar-me l'oportunitat de realitzar la meua tesi i no només això, sinó també formar-me com a professional.

Als companys del laboratori del Parc Científic, pre-docs, post-docs i tècnics, per compartir dos anys de tesi.

A tota la gent del Departament de Biologia Cel·lular, professors i pre-docs i tècnics del Lab2 -Oriol, Trini, Eva, Mònica i Claudia- i Lab 4 -Jordi-.

Als companys del Lab1, la Carme, el Fèlix, l'Abel, l'Elena, la Juani i el Jordi. Gràcies per ser tan bons companys! Aconseguíeu que les llargues hores al laboratori fossin molt més lleugeres... Gràcies pels cafès, els dinars, els berenars, els breaks, els mini-breaks, els moments d'esbarjo, les sessions de teràpia, el "momento neceser", les converses de ciència i les que no ho eren... Diógenes sigue vivo!

A tots els que han passat pel grup de Comunicació cel·lular: a la Mari, , al Víctor i a L'Anna, dels que he après moltes coses; i als nous que tot just comencen ara: Greg, Enrique, Meri, Adriana, Emma... us desitjo molta sort en aquest viatge! A la Virginia, per ser tan genial, per treure temps d'on no n'hi havia, per sempre estar de bon humor, per les paraules d'ànim, en definitiva, per estar sempre disposada a donar un cop de mà!

També a la gent dels serveis de la UB i dels altres departaments, sempre disposades a ajudar o deixar un aparell quan feia falta.

Als nous companys del grup de Neuromusculars de l'Hospital Sant Joan de Déu, especialment a la Cecília per ser tan comprensiva, i a les companyes del lab de la 3a planta, Débora, Silvia i Anna.

Però sobretot als pares, a la iaia, i al Carlos pel seu recolzament incondicional. Crec que aquesta tesi en part és seva, perquè l'han patit tant o més que jo. Us estimo moltíssim!

