

Universitat de Lleida

## Implicación de nucleoporinas y su relación con alteraciones de proteóstasis de TDP-43 secundarias a estrés celular en la fisiopatología de la ELA

Omar Ramírez Núñez

<http://hdl.handle.net/10803/671193>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

## **TESI DOCTORAL**

# **Implicación de nucleoporinas y su relación con alteraciones de proteóstasis de TDP-43 secundarias a estrés celular en la fisiopatología de la ELA**

Omar Ramírez Núñez

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida

Programa de Doctorat en Salut

Directors

Manel Portero Otín

Reinald Pamplona Gras

2017



# **TESI DOCTORAL**

## **Implicación de nucleoporinas y su relación con alteraciones de proteóstasis de TDP-43 secundarias a estrés celular en la fisiopatología de la ELA**

Omar Ramírez Núñez

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida

Programa de Doctorat en Salut

Directors

Manel Portero Otín

Reinald Pamplona Gras

2017



**RESUM-RESUMEN-ABSTRACT**



## RESUM

L'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) és una malaltia neurodegenerativa caracteritzada per canvis citopatològics en les motoneurons inferiors del tronc cerebral i de la medulla espinal, així com en les motoneurons superiors de l'escorça motora. Els pacients que pateixen aquesta patologia experimenten signes i símptomes d'atròfia muscular progressiva secundària amb debilitat, augment de la fatiga, disfàgia que s'acompanya d'insuficiència respiratòria i la mort. L'ELA es classifica en dos amplies categories clínicament molt similars, l'ELA familiar (ELAf) que s'associa a mutacions en un conjunt de gens i que compren al voltant del 10 % de tots els casos d'ELA, i l'ELA esporàdica (ELAE). Una de les característiques patognòmiques de l'ELA és la formació d'agregats de naturalesa proteica, generalment citoplasmàtics, que es localitzen en les motoneurons. Un dels components majoritaris en aquestes estructures proteiques és la ribonucleoproteïna TDP-43, la qual es troba deslocalitzada en el citoplasma cel·lular, fragmentada i anormalment fosforilada. L'etiopatogènia de la malaltia i els processos pels quals passa la desregulació de TDP-43, són desconeguts a l'actualitat. No obstant, diversos mecanismes moleculars s'han associat amb l'agregació de TDP-43 entre els quals destaquen l'estrès oxidatiu, l'estrès de reticle, la disfunció del flux autofàgic i de l'activitat proteosomal, així com el deteriorament del transport nucleocitosòlic, entre altres. Aquest, al seu torn, pot dependre de la integritat estructural i funcional de l'embolcall nuclear, amb els seus components de membrana i els porus nuclears.

En aquesta tesi s'aborda l'estudi de les subunitats proteiques que conformen el porus nuclear, les nucleoporines (NUPs) i la seva alteració com un mecanisme subjacent en l'etiopatogènia de la ELA, contribuint a la deslocalització de proteïnes i la seva potencial agregació, utilitzant TDP-43 com a paradigma. Per això van analitzar els nivells de varis NUPs mitjançant tècniques de immunodetecció en teixits i nuclis aïllats extrets *post mortem* de pacients d'ELA, així com en un model murí transgènic d'ELAf en varis estadis de la malaltia y en ambdós sexes. A més, es van realitzar estudis de cultiu cel·lular per elucidar els possibles mecanismes que influeixen en la desregulació de TDP-43 mediat per NUPs. En aquest context es va abordar la

relació entre estrès cel·lular, TDP-43 i NUPs, per establir la possible influència dels mecanismes d'estrès sobre la distribució de NUPs específiques i la seva relació amb les característiques patològiques de TDP-43.

Els resultats demostren canvis en els nivells de NUPs que participen en el reconeixement de proteïnes transportadores, tant en teixits extrets *post mortem* de pacients d'ELA com en ratolins models de la malaltia. Per altra banda, el silenciament d'una de les NUPs, la NUP107, va provocar un augment dels nivells de TDP-43 i de la seva fosforilació, així com un augment de la formació dels seus agregats citoplasmàtics. A més, això s'associa a una alteració de la resposta autofàgica, evidenciat pel increment de LC3II, p62 i els nivells de ubiquitinització proteica general. De la mateixa manera, l'estrès oxidatiu i l'estrès osmòtic *in vitro* van provocar un increment de les característiques patològiques de TDP-43 citades anteriorment, augment associat a canvis en l'expressió de NUPs. Aquestes troballes demostren que el deteriorament de les NUPs en el marc de la ELA pot ser un mecanisme contribuent a l'alteració del tràfic intracel·lular, resultant en l'agregació de proteïnes implicades en la neurodegeneració motoneuronal, com TDP-43.

## RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por cambios citopatológicos en las motoneuronas inferiores del tronco cerebral y de la médula espinal, así como en las motoneuronas superiores de la corteza motora. Los pacientes que sufren esta patología experimentan signos y síntomas de atrofia muscular progresiva secundaria con debilidad, aumento de la fatiga, disfagia que se acompañan de insuficiencia respiratoria y la muerte. La ELA se clasifica en dos amplias categorías clínicamente muy similares; la ELA familiar (ELAf) que se asocia a mutaciones en un conjunto de genes, la cual comprende alrededor del 10 % de todos los casos de ELA, y la ELA esporádica (ELAe). Una de las características patognomónicas de la ELA es la formación de agregados de naturaleza proteica, generalmente citoplasmáticos, que se localizan en las motoneuronas. Uno de los componentes mayoritarios en estas estructuras proteicas es la ribonucleoproteína TDP-43, la cual se encuentra deslocalizada en el citoplasma celular, fragmentada y anormalmente fosforilada. La etiopatogenia de la enfermedad y los procesos por los cuales ocurre la desregulación de TDP-43, son desconocidos en la actualidad. No obstante, diversos mecanismos moleculares han sido asociados con la agregación de TDP-43 entre los cuales destacan el estrés oxidativo, el estrés de retículo, la disfunción del flujo autofágico y de la actividad proteosomal, así como el deterioro del transporte nucleocitosólico, entre otros. Éste, a su vez, puede depender de la integridad estructural y funcional de la envoltura nuclear, con sus componentes membranales y los poros nucleares.

En esta tesis se aborda el estudio de las subunidades proteicas que conforman el poro nuclear, las nucleoporinas (NUPs) y su alteración como un mecanismo subyacente en la etiopatogenia de la ELA, contribuyendo a la deslocalización de proteínas y su potencial agregación, utilizando TDP-43 como paradigma. Para ello analizamos los niveles de varias NUPs mediante técnicas de inmunodetección en tejidos y núcleos aislados extraído post mortem de pacientes de ELA, así como en un modelo murino transgénico de ELAf en varios estadios de la enfermedad y en ambos sexos. Además, realizamos estudios en cultivo celular para elucidar los posibles mecanismos

que influyen en la desregulación de TDP-43 mediado por NUPs. En este contexto se abordó la relación entre estrés celular, TDP-43 y NUPs, para establecer la posible influencia de los mecanismos de estrés sobre la distribución de NUPs específicas y su relación con las características patológicas de TDP-43.

Los resultados demuestran cambios en los niveles de NUPs que participan en el reconocimiento de proteínas transportadoras, tanto en tejidos extraídos *post mortem* de pacientes de ELA como en ratones modelos de la enfermedad. Por otro lado, el silenciamiento de una de las NUPs, la NUP107, provocó aumento de los niveles de TDP-43 y de su fosforilación, así como un aumento de la formación de sus agregados citoplasmáticos. Además, ello se asocia a una alteración de la respuesta autofágica, evidenciado por el incremento de LC3II, p62 y los niveles de ubiquitinización proteica general. De igual manera, el estrés oxidativo y el estrés osmótico *in vitro* provocaron un incremento de las características patológicas de TDP-43 citadas anteriormente, aumento asociado a cambios en la expresión de NUPs. Estos hallazgos demuestran que el deterioro de las NUPs en el marco de la ELA, puede ser un mecanismo contribuyente a la alteración del tráfico intracelular, resultante en la agregación de proteínas implicadas en la neurodegeneración motoneuronal, como TDP-43.

**ABSTRACT**

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease, characterized by cytopathologic changes in the lower motor neurons of the brainstem and spinal cord, as well as in the upper motor neurons of the motor cortex. Patients suffering this pathology, experience signs and symptoms of secondary progressive muscular atrophy with weakness, increased fatigue, dysphagia accompanied by respiratory failure and death. ALS is classified into two broad categories that are clinically very similar; the familial ALS (fALS) that is associated with mutations in a set of genes, which comprises about 10% of all cases of ALS, and sporadic ALS (sALS). One of the pathognomonic characteristics of ALS is the usually cytoplasmic protein nature aggregates formation that is located in motor neurons. One of the major components in these protein structures is the TDP-43 ribonucleoprotein, which is delocalized, fragmented and abnormally phosphorylated in the cellular cytoplasm. The etiopathogenesis of the disease and the processes by which TDP-43 deregulation occurs are currently unknown. However, several molecular mechanisms have been associated with the TDP-43 aggregation, among which oxidative stress, reticular stress, autophagic flow dysfunction and proteasomal activity, as well as nucleocytoplasmic transport deterioration, among others. This, in turn, may depend on the structural and functional integrity of the nuclear envelope, with its membrane components and nuclear pores.

This thesis addresses the study of the protein subunits that build the nuclear pore, nucleoporins (NUPs) and their alteration as an underlying mechanism in the etiopathogenesis of ALS, contributing to protein offshoring and its potential aggregation using TDP-43 as a paradigm. To do this, we analysed the levels of several NUPs by immunodetection techniques in isolated tissues and nuclei extracted post mortem from ALS patients, as well as in a transgenic murine model of ALS in several stages of the disease and in both sexes. In addition, we performed cell culture studies to elucidate the possible mechanisms that influence NUPs-mediated TDP-43 dysregulation. In this context, the relationship between cell stress, TDP-43 and NUPs was discussed to establish the possible influence of stress mechanisms on the distribution of specific NUPs and their relation to the TDP-43 pathological characteristics.

The results demonstrate changes in the levels of NUPs involved in the recognition of transporter proteins in both post-mortem tissues from ALS patients and in model mice from the disease. On the other hand, the silencing of one of the NUPs, NUP107, caused an increase in the levels of TDP-43 and its phosphorylation, as well as an increase in the formation of its cytoplasmic aggregates. In addition, this is associated with autophagic response alterations, evidenced by the increase of LC3II, p62 and the levels of general protein ubiquitination. Similarly, oxidative stress and osmotic stress in vitro, caused an increase in the pathological characteristics of TDP-43 mentioned above, an increase associated with changes in the expression of NUPs. These findings demonstrate that the deterioration of NUPs in the ALS framework may be a contributing mechanism to the alteration of intracellular traffic resulting in the proteins aggregation involved in motoneuronal neurodegeneration, such as TDP-43.





# **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres.

... Gracias a la vida que me ha dado tanto  
Me ha dado el sonido y el abecedario  
Con él las palabras que pienso y declaro  
Madre amigo hermano y luz alumbrando,  
La ruta del alma del que estoy amando.

Gracias a la vida que me ha dado tanto  
Me ha dado la risa y me ha dado el llanto...

A los que me enseñan y educan,  
A los que me cuidan,  
A los que están y no,  
A los que siempre estarán,  
A los que me quieren,  
A los que quiero,  
A la que quiero,  
A todos ustedes,  
Gracias.



# ÍNDICE



**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
1.1. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.....	7
1.1.1. <i>Generalidades</i> .....	7
1.1.2. <i>Características clínicas</i> .....	8
1.1.3. <i>Factores de riesgo</i> .....	9
1.1.3.1. Factores ambientales .....	10
1.1.3.1. Genética .....	11
1.1.3.2. SOD1.....	14
1.1.3.3. C9ORF72.....	15
1.1.3.4. TARDBP .....	16
1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ELA. <i>TARDBP</i> .....	19
1.2.1. <i>TDP-43. Estructura y Función</i> .....	20
1.2.2. <i>Mecanismos de Toxicidad</i> .....	26
1.2.2.1. Estrés oxidativo .....	26
1.2.2.2. Autofagia .....	30
1.2.2.3. Estrés de retículo.....	35
1.2.2.4. Transporte núcleo citoplasmático.....	37
1.3. COMPLEJO DE NUCLEOPORINAS .....	40
1.3.1. <i>Transporte a través del NPC</i> .....	42
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>45</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
2.1. MUESTRAS HUMANAS.....	55
2.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	55
2.2.1. <i>Genotipado</i> .....	56
2.3. CULTIVOS CELULARES.....	57
2.3.1. <i>Líneas celulares</i> .....	57
2.3.1.1. Neuro-2A.....	58
2.3.1.2. SH-SY5Y .....	58
2.3.1.3. HeLa .....	59
2.3.1.4. HEK-293.....	59
2.3.2. <i>Tratamientos de cultivos celulares</i> .....	60
2.4. BIOLOGÍA MOLECULAR .....	60
2.4.1. <i>Transfección de CRIPSR-NUP107</i> .....	60
2.5. BIOLOGÍA CELULAR .....	62
2.5.1. <i>Fraccionamiento celular</i> .....	62
2.5.2. <i>Aislamiento de núcleos</i> .....	62
2.6. MICROSCOPIA .....	63
2.6.1. <i>Microscopía de inmunofluorescencia celular</i> .....	63
2.6.2. <i>Microscopía de núcleos aislados</i> .....	64
2.7. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	65
2.7.1. <i>Extracción proteica de cultivos celulares</i> .....	65

2.7.2.	<i>Extracción proteica de tejidos animales</i> .....	65
2.7.3.	<i>Cuantificación de proteínas</i> .....	66
2.7.4.	<i>Electroforesis</i> .....	66
2.7.5.	<i>Bloqueo</i> .....	68
2.7.6.	<i>Inmunodetección y análisis</i> .....	68
2.8.	CITOMETRÍA DE FLUJO.....	68
2.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	69
2.10.	LIPIDÓMICA DE NÚCLEOS AISLADOS.....	71
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>73</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
3.1.	NUCLEOPORINAS EN MÉDULA ESPINAL DE PACIENTES DE ELA.....	75
3.1.1.	<i>Inmunoblot de NUPs en médula espinal</i> .....	75
3.1.2.	<i>Inmunofluorescencia de núcleos aislados</i> .....	76
3.1.3.	<i>Citometría de núcleos aislados</i> .....	79
3.2.	LIPIDÓMICA DE NÚCLEOS AISLADOS DE MÉDULA ESPINAL DE PACIENTES DE ELA .....	80
3.3.	ESTRÉS OXIDATIVO EN NÚCLEOS DE MÉDULA ESPINAL DE PACIENTES DE ELA.....	83
3.4.	NUCLEOPORINAS EN MODELO DE RATÓN DE ELA FAMILIAR. ....	83
3.4.1.	<i>Estadio presintomático</i> .....	85
3.4.2.	<i>Estadio sintomático</i> .....	87
3.4.1.	<i>Estadio final</i> .....	91
3.5.	SILENCIAMIENTO DE NUCLEOPORINAS EN CULTIVOS CELULARES .....	93
3.5.1.	<i>NUP107 y TDP-43</i> .....	95
3.5.1.	<i>NUP107 y agregados de p-TDP-43</i> .....	97
3.5.2.	<i>NUP107 y autofagia</i> .....	99
3.6.	ESTRÉS, NUCLEOPORINAS Y TDP-43 EN CULTIVOS CELULARES .....	102
3.6.1.	<i>Estrés osmótico y FG-NUP</i> .....	102
3.6.2.	<i>Estrés oxidativo y FG-NUP</i> .....	106
<b>DISCUSIÓN.....</b>		<b>111</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>113</b>
4.1.	NUCLEOPORINAS EN TEJIDO <i>POST MORTEM</i> DE ELA .....	113
4.1.1.	<i>FG-NUP en tejido de pacientes de ELA</i> .....	113
4.2.	LÍPIDOS NUCLEARES Y NUCLEOPORINAS.....	116
4.3.	SILENCIAMIENTO DE NUCLEOPORINAS .....	118
4.3.1.	<i>NUP107 y Autofagia</i> .....	120
4.4.	NUCLEOPORINAS Y ESTRÉS OXIDATIVO .....	122
4.5.	NUPS EN SODG93A .....	125
<b>CONCLUSIONES.....</b>		<b>129</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>		<b>133</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>135</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>184</b>



ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Expresión de TDP-43 en condiciones fisiológicas y patológicas.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 2. Esquema de la estructura de TDP-43.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 3. Representación esquemática de los dominios de TDP-43 y las mutaciones genéticas asociadas con la ELA. ....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 4. Funciones biológicas de la proteína TDP-43. ....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 5. TDP-43 y gránulos de estrés. ....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 6. Representación esquemática del flujo autofágico. ....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 7. Selectividad de la autofagia. ....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 8. Representación esquemática del estrés de retículo. ....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 9. Representación esquemática de la estructura y composición molecular del poro nuclear de vertebrados. ....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 10. Mecanismo de importe nuclear de TDP-43. ....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 11. La ELA se asocia a una reducción en los niveles de nucleoporinas en muestras de médula espinal. ....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 12. La ELA se asocia a una reducción en los niveles de nucleoporinas en núcleos aislados de médula espinal. ....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 13. La ELA se asocia a una reducción en los niveles de nucleoporinas en núcleos aislados de corteza frontal. ....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 14. La ELA se asocia a una reducción específica de NUP107 en núcleos aislados de médula espinal. ....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 15. Perfil lipídico de núcleos aislados extraídos de médula espinal post mortem de pacientes de ELA.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 16. La ELA se asocia a un aumento del estrés oxidativo en los núcleos aislados de neuronas de médula espinal.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 17. La presencia del transgén hSODG93A no induce una desregulación en MAb414 en médula espinal murina en estadios presintomáticos. ....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 18. La presencia del transgén hSODG93A induce una desregulación dependiente de género en NUP93 en médula espinal murina a estadios presintomáticos. ....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 19. La presencia del transgén hSODG93A induce una depleción dependiente de género en MAb414 en médula espinal murina.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 20. La presencia del transgén hSODG93A induce una depleción en NUP93 en médula espinal murina. ....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 21. La presencia del transgén hSODG93A induce una depleción en NUP107 en médula espinal murina.....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 22. La presencia del transgén hSODG93A no induce una depleción de nucleoporinas en médula espinal murina a estadios finales. ....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 23. Silenciamiento de nucleoporinas NUP107 y NUP93. ....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 24. El silenciamiento de NUP107 provoca aumento en los niveles de NUPs. ....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 25. El silenciamiento de NUP107 provoca acumulación de TDP-43 citoplasmático in vitro.....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 26. El silenciamiento de NUP107 provoca aumento de los niveles de p-TDP-43 in vitro.....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 27. El silenciamiento de NUP107 provoca agregación de p-TDP-43 in vitro. ....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 28. El silenciamiento de NUP107 provoca agregación de p-TDP-43 in vitro.....</i>	<i>99</i>
<i>Figura 29. El silenciamiento de NUP107 provoca desregulación de la autofagia y de TDP-43 in vitro. ...</i>	<i>100</i>
<i>Figura 30. La inhibición de la autofagia provoca deslocalización de TDP-43 endógeno. ....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 31. El estrés osmótico provoca deslocalización y agregación de TDP-43 endógeno. ....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 32. El estrés osmótico provoca deslocalización de la fosforilación TDP-43 endógeno. ....</i>	<i>104</i>
<i>Figura 33. El estrés osmótico aumenta los niveles de FG-NUP.....</i>	<i>105</i>

<i>Figura 34. El estrés osmótico provoca aumento de los niveles de la nucleoporina NUP93.....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 35. El estrés oxidativo induce aumento de los niveles de TDP-43 en células Neuro2A.....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 36. El estrés oxidativo provoca aumento en los niveles de nucleoporinas. ....</i>	<i>108</i>
<i>Figura 37. El estrés oxidativo induce aumento en los niveles de TDP-43 en células SH-SY5Y.....</i>	<i>109</i>
<i>Figura 38. El estrés oxidativo induce aumento en los niveles de FG-NUP en células SH-SY5Y.....</i>	<i>109</i>
<i>Figura 39. El estrés oxidativo induce aumento de los niveles de TDP-43 en células SH-SY5Y.....</i>	<i>110</i>
<i>Figura 40. El estrés oxidativo aumenta los niveles de nucleoporinas en células SH-SY5Y.....</i>	<i>110</i>
<i>Figura 41. El género influye sobre el estado neuroinflamatorio de ratones G93A.....</i>	<i>186</i>
<i>Figura 42. Análisis en red de la interacción de NUPs con genes involucrados en inflamación.....</i>	<i>187</i>

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Factores de riesgo implicados en la ELA. ....</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 2. Estado actual de los genes implicados en la ELA. Revisado en (Taylor et al. 2016).....</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 3. Resumen de las características de los pacientes. ....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 4. Programa del Termociclador para la amplificación del gen SOD1 y el gen IL2.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 5. Tratamientos realizados en líneas celulares. ....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunofluorescencia indirecta. ....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección por western blot.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 8. Especies lipídicas diferenciales de núcleos aislados de médula espinal extraído post mortem de pacientes de ELA y control.....</i>	<i>82</i>







## **ABREVIATURAS**



## Abreviaturas

8oxodG	8-Oxo-2'-desoxiguanosina	NMS	Neurona motora superior
ADN	Ácido desoxirribonucleico	NMI	Neurona Motora inferior
ARN	Ácido ribonucleico	ELAf	Esclerosis lateral amiotrófica familiar
BSA	Bovine	ELAe	Esclerosis lateral amiotrófica esporádica
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol		
DFT	Demencia frontotemporal		
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica		
FBS	Suero fetal bovino		
FG-NUP	Nucleoporinas con repeticiones de fenilalanina-glicina		
GFP	Proteína verde fluorescente		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno		
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid		
IL-2	Gen interleucina 2		
Mab414	Anticuerpo anti proteínas del complejo del poro nuclear		
NeuN	Antígeno nuclear neuronal		
NGS	Suero normal de cabra		
NUPs	Nucleoporinas		
P/S	Penicilina/estreptomicina		
PBS	Tampón fosfato salino		
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		
PFA	Paraformaldehído		
SOD1	Superóxido dismutasa		
TDP-43	TAR-DNA-Binding protein-43		
THG	Tapsigargina		
γ-H2AX	Gamma H2A miembro de la familia de las histonas		



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Esclerosis lateral amiotrófica

#### Generalidades

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), es una de las enfermedades neurodegenerativas más estudiadas, pese a ser una enfermedad rara, junto con la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Es un trastorno progresivo que afecta tanto a las neuronas motoras inferiores en el tronco cerebral y la médula espinal, así como a las neuronas motoras superiores de la corteza motora, aunque existe una elevada heterogeneidad entre casos, desarrollo y características clínicas de la enfermedad. En todo caso, la pérdida neuronal acaba por provocar, a nivel muscular, atrofia, debilidad y espasticidad; con muchos casos con parálisis de las unidades motoras en el enfermo y finalmente la muerte por fallo respiratorio (Robberecht and Philips 2013). Precisamente, el nombre de la enfermedad proviene de la palabra griega "*αμψοτροπία*", que significa "falta de sustento muscular". La palabra "lateral" se refiere al área de la médula espinal que está dañada por la enfermedad y la palabra "esclerosis" deriva de la etimología griega para duro, la cual significa endurecimiento o cicatrización del tejido (Aebischer and Kato 2007; Morris 2015). Desde finales de la década de 1930 y principios de la década de 1940, en el entorno norteamericano, la ELA también fue conocida como enfermedad de Lou Gehrig, cuyo nombre deriva de uno de los jugadores de béisbol más famosos de todos los tiempos que falleció de ELA en junio de 1941 (Morris 2015).

La ELA fue descrita por primera vez en 1824 por el anatomista inglés Sir Charles Bell (Rowland 2001). A finales de la década de 1860, el francés Dr. Jean-Martin Charcot, correlacionó los síntomas de ELA con anomalías neuromusculares y la enfermedad fue conocida entonces como la enfermedad de Charcot. No fue hasta 1874 cuando el propio Dr. Charcot identificó y renombró oficialmente la enfermedad como esclerosis lateral amiotrófica (Rowland 2001).

La incidencia a nivel global de la ELA es de aproximadamente 1 - 2,6 casos por cada 100 000 personas al año y la prevalencia es de aproximadamente 6 casos por cada 100 000 habitantes, según los últimos estudios (Govoni et al. 2012; Talbott et al. 2016a). En los países occidentales, especialmente en personas de raza blanca, la incidencia es bastante estable, de unos 2-3 casos por 100 000 personas al año (Cronin et al., 2007 y Alonso et al., 2009). En el continente asiático, aunque la incidencia de la ELA es generalmente más baja, se han descrito picos de incidencia focalizados (50-100 veces más que el promedio global) específicamente en Guam y algunas islas circundantes del Pacífico (Okamoto et al. 2009b; Wang et al. 2016a), aunque ello podría deberse a alteraciones en la dieta y otras características regionales que conducen a enfermedad de la motoneurona, no directamente relacionada con la etiopatogenia de la enfermedad en otros entornos. Las poblaciones de origen hispano y africano muestran menor incidencia de ELA (Cronin et al. 2007), lo cual sugiere que las poblaciones donde hay mezcla genética, la incidencia es menor; probablemente debido a que tienen menos probabilidades de compartir genes de riesgo, que resultan en una mayor susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad (Shahrizaila et al. 2016; Zaldivar et al. 2009).

La edad media de inicio de la enfermedad es de 58-63 años para los pacientes que tienen ELA esporádica y de 40-60 años para aquellos con ELA familiar, con un pico de incidencia en los 70-79 años (Talbott et al. 2016b). Los hombres tienen un mayor riesgo de ELA que las mujeres en una proporción 1,2-1,5 hombres por mujer (Manjaly et al. 2010). Para una revisión de las características epidemiológicas de la enfermedad, se emplaza al lector a diversas revisiones recientes (Hardiman et al. 2017; Shahrizaila et al. 2016; Talbott et al. 2016b).

### **Características clínicas**

La clínica de la ELA es plenamente compatible con un fallo en las conexiones axonales en las unidades motoras; el axón se retrae y ocurre la denervación de las neuronas motoras inferiores. Inicialmente, la retracción es compensada por la reinervación de los axones de las subpoblaciones

motoneuronas que parecen ser más resistentes a los procesos neurodegenerativos (Robberecht and Philips 2013; Saxena and Caroni 2011). No obstante, con el progreso de la enfermedad este mecanismo compensatorio falla, el soma de las células neuronales se vuelve visiblemente anormal y posteriormente mueren (Fischer et al. 2004).

La forma clásica de esta enfermedad se caracteriza por una mezcla de manifestaciones clínicas de lesión de las neuronas motoras superiores (NMS) y/o inferiores (NMI) y/o signos de alteración bulbar y respiratoria (Riku et al. 2014). Por lo general, los síntomas pueden aparecer de forma lenta y ser poco llamativos. En el caso de afectación bulbar estos incluyen disartria, disfagia (generalmente para líquidos más que para sólidos), dificultad para masticar e hipersalivación. En otros casos, el debut se produce por fasciculaciones en unidades motoras aisladas de extremidades. Cabe destacar que en algunas formas de la enfermedad, muchos pacientes presentan síntomas de déficit cognitivo, conductual y comportamental en el espectro de la demencia frontotemporal (DFT); principalmente disfunción ejecutiva, irritabilidad, cambios de la personalidad con impulsividad y mal reconocimiento de la enfermedad. La apatía, la desinhibición y el mal control social también forman parte de este espectro (Strong et al. 2009; Zapata-Zapata et al. 2016). Aproximadamente el 50% de los pacientes con ELA mueren en los 3-5 años posteriores a la aparición de los síntomas, a menudo por insuficiencia respiratoria (Ingre et al. 2015; Talbot 2009). Es remarcable que la heterogeneidad de inicio puede conllevar un retraso de diagnóstico marcado, asociable a mortalidad precoz, con lo que el desarrollo de biomarcadores de la enfermedad es un campo de plena actualidad.

### **Factores de riesgo**

Como se ha indicado en la sección anterior, a nivel global la ELA se manifiesta entre todos los grupos raciales y étnicos. De hecho, los únicos factores de riesgo establecidos hasta la fecha son la edad avanzada, el sexo masculino y los antecedentes familiares de la enfermedad (Armon 2003; Ingre et al. 2015). Aproximadamente el 10 % de los pacientes con ELA tienen historia familiar de la enfermedad, con al menos dos parientes de primer o segundo

grado, es la denominada ELA familiar (ELAf). El 90 % restante de pacientes son considerado esporádicos y es nombrada ELA esporádica (ELAe) (Renton et al. 2014; Rowland and Shneider 2001). Ello no obstante, existen diversos factores que pueden configurar un incremento en el riesgo de desarrollo y de la velocidad de progresión de la enfermedad, y al mismo tiempo, aportar potenciales mecanismos etiopatogénicos que puedan explicar la diversidad de esta enfermedad.

### **Factores ambientales**

Hasta la fecha, se han asociado varios factores ambientales con el inicio y la progresión de esta enfermedad neurodegenerativa. Algunos se han correlacionado con el riesgo de tener ELA, como la exposición a metales como el plomo (Fang et al. 2010; Kamel et al. 2002), el mercurio (Callaghan et al. 2011) , el hierro (Kwan et al. 2012) y otros (Bocca et al. 2015; Roos et al. 2012); la exposición a pesticidas e insecticidas entre los que destacan los compuestos organofosforados (Bonvicini et al. 2010; Kamel et al. 2012) y generalmente, la exposición a compuestos químicos por parte de trabajadores y militares (Beard et al. 2016; Peters et al. 2016). Ciertos hábitos tóxicos en estilos de vida, como el tabaquismo, también se han relacionado con la enfermedad (Armon 2009). Normalmente el hábito de fumar se considera un riesgo de inicio de la ELA. Estudios independientes han encontrado que esta conducta afecta más a las mujeres que a los hombres, especialmente a las que han pasado la menopausia (Gallo et al. 2009; Weisskopf et al. 2004).

Otras evidencias han expuesto una asociación inversa entre una mayor ingesta de antioxidantes como la vitamina E y un menor riesgo de ELA (Ascherio et al. 2005; Michal Freedman et al. 2013); así como la elevada ingesta de frutas y vegetales (Nieves et al. 2016; Okamoto et al. 2009a). El consumo de café (Beghi et al. 2011; SC and Muralidhara 2016) y de alcohol (de Jong et al. 2012) también se ha evaluado, sin resultados concluyentes; aunque la tendencia de ambos es a la protección.

Los investigadores también han puesto la atención en la práctica de ejercicio físico y su relación con la patología. Los estudios son contradictorios;

mientras algunos han encontrado un incremento del riesgo de ELA entre deportistas de alto rendimiento (Chiò et al. 2005; Lehman et al. 2012), otros estudios respaldan una relación beneficiosa o no han encontrado vínculo alguno (Gallo et al. 2016; Pupillo et al. 2014). Recientemente, en un meta análisis sobre práctica de deporte se ha evidenciado que existiría un riesgo ligeramente aumentado para los practicantes de actividad física de nivel profesional (fútbol americano y fútbol) (Lacorte et al. 2016). En este contexto, merece destacar la denominada hipótesis del *fitness*, según la cual existiría un contexto genético con menor perfil de riesgo cardiovascular asociado a un riesgo mayor de ELA (Visser et al. 2017).

Aunque muchos factores de riesgo se han asociado con la ELA, principalmente en la forma esporádica, no se ha vinculado de forma concluyente, ningún factor de riesgo ambiental con esta patología. Los factores ambientales abordados en la literatura se asocian solo, con una pequeña proporción de casos totales de ELA (Wang et al. 2016b). En la tabla 1. se exponen los principales factores de riesgos asociados con la ELA.

#### **1.1.1.1. Genética**

La ELA presenta un contexto genético altamente complejo. Como se ha expuesto anteriormente, solo el 10 % de los pacientes tienen antecedentes familiares de la enfermedad los cuales son clínicamente indistinguibles de los que tienen una ELAe (Renton et al. 2014; Rowland and Shneider 2001).

No se ha identificado ningún factor de riesgo genético simple que explique una proporción significativa de los casos de la ELA, ni siquiera de los familiares. Las mutaciones en los genes de la enzima superóxido dismutasa de zinc y cobre (*SOD1*) y en el gen *C9ORF72*, podrían explicar aproximadamente el 25% y el 35% respectivamente de los casos de ELAf, siendo los dos factores de riesgo más comunes a nivel genético (Kirby et al. 2016). Cabe indicar que, incluso para la superóxido dismutasa de zinc y cobre, el número de mutaciones asociadas a formas de ELAf excede el centenar, como se aborda en el apartado siguiente. Todas las mutaciones monogénicas, en más de 30 genes asociados a ELA (tabla 2) podrían explicar, solamente, alrededor del 10% de

todos los casos de ELA (Chio et al. 2012). No obstante, con el estudio de la etiología genética de la enfermedad en estos casos, se han podido obtener conocimientos fundamentales sobre los mecanismos celulares que conllevan a la degeneración neuronal, así como facilitar el modelado de la enfermedad y el diseño y la prueba de terapias dirigidas (Renton et al. 2014). Además, los conocimientos sobre la genética involucrada en la ELA, permite el planteamiento de nuevas hipótesis etiopatogénicas extrapolables a los casos de ELAe (Ferraiuolo et al. 2011; Riancho et al. 2016).

Tabla 1. Factores de riesgo implicados en la ELA.

<b>Factor de riesgo</b>	<b>Riesgo</b>	<b>Referencia</b>
Exposición a metales	Aumenta	Revisado en (Talbot et al. 2016a).
Servicio Militar.	Aumenta	(Horner et al. 2005).
Factores genéticos.	Aumenta	Ver sección Genética
Pesticidas e insecticidas.	Aumenta	(Kamel et al. 2012; Malek et al. 2012).
.Actividad física.	Aumenta	(Lacorte et al. 2016; Visser et al. 2017).
Consumo café y Consumo de alcohol.	Disminuye	(de Jong et al. 2012; Lee et al. 2011).
Tabaquismo.	Aumenta	(de Jong et al. 2012; Wang et al. 2011).
Toxicidad al glutamato.	Aumenta	(Ferrarese et al. 2001)
Exposición a solventes.	Inconsistente	(Chancellor et al. 1993)
Factores de la Dieta	Disminuye	(Cacabelos et al. 2014)

Tabla 2. Estado actual de los genes implicados en la ELA. Revisado en (Taylor et al. 2016).

Gen	Proteína	Función Proteína	Proporción de ELA		Fecha
			Familiar	Esporádica	
<i>SOD1</i>	Cu, Zn superóxido	Superóxido dismutasa	20%	2%	1993
<i>DCTN1</i>	Subunidad de la dinactina 1	Componente del motor de la dineína complejo	1%	< 1%	2003
<i>ANG</i>	Angiogenina	Ribonucleasa	< 1%	< 1%	2006
<i>TARDBP</i>	TDP-43	Proteína de unión a RNA	5%	< 1%	2008
<i>FUS</i>	FUS	Proteína de unión a RNA	5%	< 1%	2009
<i>VCP</i>	Retículo endoplásmico	Segregase de ubiquitina	1 – 2%	< 1%	2010
<i>OPTN</i>	Optineurin	Adaptador de autofagia	4%	< 1%	2010
<i>C9ORF72</i>	<i>C9ORF72</i>	Factor de intercambio de nucleótido de	25%	10%	2011
<i>UBQLN2</i>	Ubiquilin 2	Adaptador de autofagia	< 1%	< 1%	2011
<i>SQSTM1</i>	Sequestosome 1	Adaptador de autofagia	< 1%	?	2011
<i>PFN1</i>	Profilin-1	Proteína de unión a RNA	< 1%	< 1%	2012
<i>HNRNPA1</i>	hnRNP A1	Proteína de unión a RNA	< 1%	< 1%	2013
<i>MATR3</i>	3 Matrin	Proteína de unión a RNA	< 1%	< 1%	2014
<i>TUBA4A</i>	Cadena de tubulina $\alpha$ -4A	Subunidad de microtúbulos	< 1%	< 1%	2014
<i>CHCHD10</i>	Dominio de proteína que contiene 10	Proteína mitocondrial de función desconocida	< 1%	< 1%	2014
<i>TBK1</i>	Serina/treonina- quinasa TBK1	Regula la autofagia y la inflamación	?	?	2015

## SOD1

Las mutaciones en la enzima superóxido dismutasa de zinc y cobre (SOD1), fueron la primera causa genética de la ELAf que se identificó en 1993 (Rosen et al. 1993). El gen SOD1 codifica una proteína inicialmente citosólica involucrada en la eliminación de los radicales libres. Los estudios poblacionales estiman que dichas mutaciones están presentes en alrededor del 20% de los pacientes con ELAf y el 1% de los que presentan ELAe (Chiò et al. 2008; Morgan and Orrell 2016). Aunque se han descrito más de un centenar de mutaciones en SOD1 en la literatura (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>), solo una parte de ellas tienen evidencia genética fiable de la patogenicidad (Andersen 2006). No obstante, dado que SOD1 codifica una proteína de 153 aminoácidos, este número de mutaciones, la mayoría puntuales y distribuidas por todo el gen, es notable y afectan a una variedad de dominios dentro de la proteína (Kirby et al. 2016; Marangi and Traynor 2015).

El descubrimiento de las mutaciones en la enzima SOD1 condujo al desarrollo de modelos de roedores transgénicos, principalmente los sobreexpresores del gen humano mutado relacionado con la ELA (utilizado en esta tesis). Estos roedores transgénicos desarrollan un fenotipo similar a la ELA que incluye la degeneración de las neuronas motoras, la neuroinflamación, la parálisis severa y la muerte prematura (Dal Canto and Gurney 1995; Gurney et al. 1994).

La mayoría de las mutaciones no provocan pérdida de función de la enzima, por lo que se ha propuesto que la patogenicidad actúe a través de una ganancia tóxica de la función de la misma. El estrés oxidativo fue uno de los primeros mecanismos propuesto para la SOD1 mutada; no obstante, en los últimos años se han implicado a los procesos involucrados en la maquinaria de degradación proteica celular: el sistema ubiquitina proteosoma y la autofagia (Bendotti et al. 2012; Chen et al. 2012), implicando la denominada proteostasis. Otros mecanismos propuestos incluyen: la excitotoxicidad, la agregación de proteínas, la neuroinflamación, disfunción mitocondrial, desregulación del transporte axonal y estrés del retículo endoplásmico (ER) (Kaur et al. 2016).

## C9ORF72

La causa más común de ELAf conocida hasta la fecha es la expansión repetitiva no codificante del hexanucleótido GGGGCC en el gen *C9ORF72*. Esta mutación se ha identificado en el 37,6 % de las ELAf y en el 6,3 % de la ELAe aunque no es patognomónica de ELA, ya que también se ha detectado en el 25,1% de los casos de DFT (Majounie et al. 2012). La presencia de más 30 repeticiones generalmente se considera patogénica y en pacientes con ELA las repeticiones están en el rango de 200 y 5000 (Cooper-Knock et al. 2014).

La función del gen *C9ORF72* no está bien establecida; sin embargo, recientes análisis sugieren que este gen codifica para una proteína, que podría funcionar como un factor de intercambiador de nucleótidos GDP-GTP, que regulan las proteínas Rab-GTPasas involucradas en el tráfico vesicular (Kirby et al. 2016; Levine et al. 2013). Además, experimentos en modelos de ratón transgénico y pez cebra han demostrado que *C9ORF72* se expresa de manera abundante en neuronas. (Ciura et al. 2013; Suzuki et al. 2013).

Los mecanismos por los cuales la repetición del hexanucleótido intrónico en cuestión causa neurodegeneración es fuente de debate en tiempos recientes. Varias hipótesis apuntan a que la enfermedad puede ocurrir, tanto por una pérdida de función de *C9ORF72*, como por mecanismos de ganancia de función del gen (Mizielinska and Isaacs 2014). La pérdida de función es respaldada por la disminución de los niveles de ARN mensajero (ARNm) de *C9ORF72* en células y tejidos derivados de pacientes con ELA (Mizielinska and Isaacs 2014). Asimismo, se ha demostrado que la proteína *C9ORF72* regula el flujo autofágico, tanto en ratones *knock down*, como en neuronas derivadas de pacientes con ELA asociada a *C9ORF72* (Sullivan et al. 2016; Webster et al. 2016), de nuevo sugiriendo que la *proteostasis* puede estar comprometida en estas formas de la enfermedad.

En pez cebra y en *C. elegans* se ha demostrado que el *knock down* del homólogo del gen *C9ORF72*, provoca disfunción motora (Ciura et al. 2013; Therrien et al. 2013). Sin embargo, otros estudios realizados en ratones transgénicos, en los cuales el gen *C9orf72* fue específicamente silenciado en

las neuronas y células gliales no mostraron evidencia de un fenotipo neurodegenerativo (Koppers et al. 2015).

Por otro lado, la toxicidad mediada por una ganancia de función está fundamentada en la formación de agregados de ARN repetidos, denominados focos de ARN, en núcleos neuronales, que secuestran proteínas de unión al ARN importantes. Diversos estudios han visualizado focos de ARN de *C9ORF72* en varias regiones del sistema nervioso de pacientes con ELA, (comentada en (Mizielinska and Isaacs 2014)). Además, la presencia de focos en motoneuronas de pacientes se ha correlacionado con la deslocalización de TDP-43, lo cual es una de las principales características patológicas de la ELA (Cooper-Knock et al. 2015).

Una de las hipótesis más recientes que vincula la expansión repetitiva de *C9ORF72* con la ELA se basa en el fenómeno de la traducción no-ATG que experimenta este gen. Este es un tipo de traducción no convencional que se produce en ausencia de un codón AUG de inicio (Zu et al. 2011) y produce proteínas de repetición de dipéptidos (DPR por sus siglas en inglés) (Gendron et al. 2013; Mori et al. 2013a). Diversos estudios han demostrado que las proteínas DPR, productos de la traducción *C9ORF72*, son tóxicas en modelos celulares y causan neurodegeneración en modelos de mosca *Drosophila* (Kwon et al. 2014; Mizielinska et al. 2014). Además, estas proteínas son propensas a la agregación (Mori et al. 2013a) y se acumulan en inclusiones insolubles en varias zonas del tejido nervioso de pacientes con ELA y DFT (Mori et al. 2013b; Zu et al. 2013). Los agregados citoplasmáticos de algunas de estas proteínas pueden ejercer su toxicidad mediante la inhibición de la importación nuclear de la proteína TDP-43, como se demuestra en un estudio reciente (Khosravi et al. 2016). Con todo, la agregación y la distribución anómala de proteínas podría ser un factor común en el desarrollo de la ELA, con independencia de la causa génica primaria.

## **TARDBP**

Uno de las características neuropatológicas de la ELA es la acumulación de agregados proteicos en forma de cuerpos de inclusión citoplasmáticos,

positivas a ubiquitina, en las motoneuronas y la glía de pacientes que padecen la enfermedad (Leigh et al. 1988; Lowe et al. 1988). En el año 2006 se identificó a TDP-43 como uno de los principal componentes de los cuerpos de inclusión, depositadas no solo en las motoneuronas de pacientes con ELA, sino también en neuronas corticales en pacientes con DFT, (Arai et al. 2006; Neumann et al. 2006a). A día de hoy, es aceptado que la mayoría de los casos (97 %), tanto de ELAe como de ELAf, contienen inclusiones citoplasmática positivas a TDP-43 (Guo and Shorter 2016), y por tanto, su presencia en una muestra necrópsica sugiere la existencia de la enfermedad.

TDP-43 es una proteína de unión al ARN constituida por 414 aminoácidos y codificada por el gen *TARDBP*, cuya estructura y función se desarrollaran en apartados posteriores. Al igual que muchas otras proteínas de unión al ARN, TDP-43 pertenece al grupo de las proteínas ribonucleoproteínas heterogéneas (hnRNP de sus siglas del inglés), las cuales desempeñan un papel importante en la estabilidad, el transporte y la regulación del *splicing* del ARN así como en el procesamiento de microARN (Buratti 2015; Buratti and Baralle 2012). De localización predominantemente nuclear, TDP-43 se halla deslocalizada y agregada en el citoplasma de los pacientes con ELA, formando parte de los cuerpos de inclusión; donde la proteína se rompe para generar fragmentos C-terminales de 25 y 35 kDa que presumiblemente contribuyen a la agregación y a la toxicidad (Igaz et al. 2009). Además, TDP-43 se encuentra hiperfosforilada y anormalmente ubiquitinizada lo cual constituye unas de las características distintivas de la ELA.

El descubrimiento de TDP-43 como principal componente de las inclusiones citoplasmáticas, condujo al descubrimiento de mutaciones en *TARDBP* en familias autosómicas dominantes con ELAf y DFT (Chiò et al. 2010; Sreedharan et al. 2008).

Hasta la fecha se han identificados 53 mutaciones en *TARDBP* ([http://alsod.iop.kcl.ac.uk/Overview/gene.aspx?gene\\_id=TARDBP#gene-report](http://alsod.iop.kcl.ac.uk/Overview/gene.aspx?gene_id=TARDBP#gene-report)), la mayoría de ellas son *missense mutations* y se encuentra en el dominio C-terminal, que está implicado directamente en la unión y la función de las ribonucleoproteínas (Kuo et al. 2009).

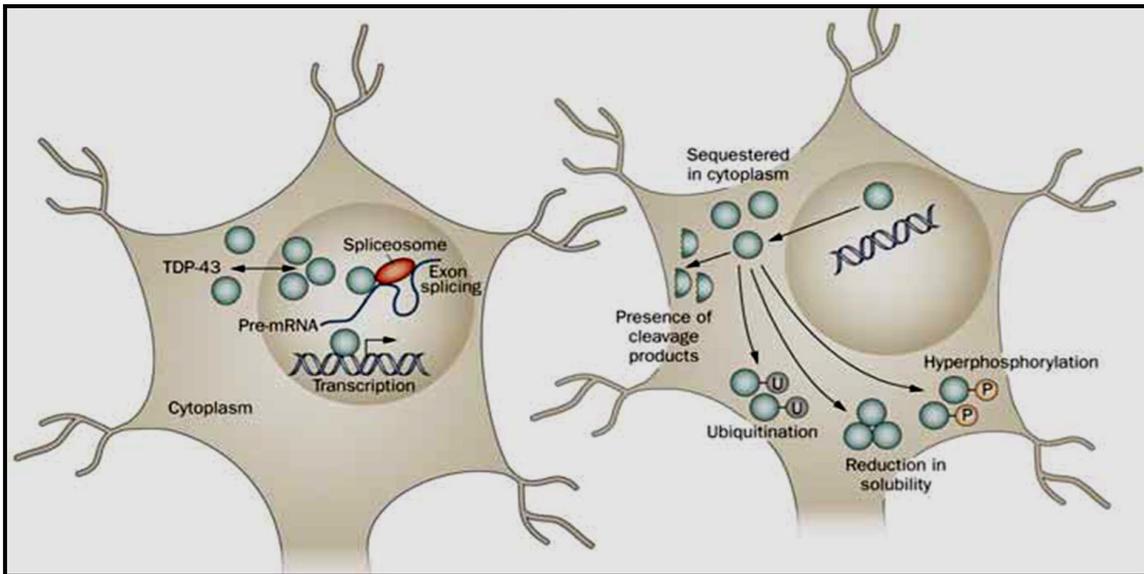


Figura 1. Expresión de TDP-43 en condiciones fisiológicas y patológicas. En contextos fisiológicos TDP-43 reside en el núcleo donde participa en la expresión de genes a nivel transcripcional, regulando el splicing de ARN. TDP-43 puede realizar un intercambio de posición entre el núcleo y el citoplasma, donde se asocia al ARNm brindándole estabilidad. Bajo condiciones patológicas, TDP-43 abandona el núcleo y se acumula en el citoplasma en el cual se encuentra fragmentado, hiperfosforilado y ubiquitinado (Chen-plotkin et al. 2010).

Las mutaciones dominantes en TDP-43 aunque son raras, son suficientes para provocar formas familiares de la enfermedad asociadas a los agregados de TDP-43 (Al-Chalabi et al. 2012). Estas representan aproximadamente el 3 % en casos de ELAf y el 1,5 % en los casos esporádicos. Esta cifra se ha mantenido relativamente constante en el tiempo, aunque puede variar de un estudio a otro (Lattante et al. 2013). A pesar que las mutaciones familiares en este gen se encuentran repartidas geográficamente a nivel global, se ha encontrado cierta variabilidad regional. Por ejemplo, la mutación A382T de la proteína es particularmente frecuente en Cerdeña, Italia; reflejando la naturaleza conservada de la población de la isla, combinada con un efecto *founder* (Chiò et al. 2011). El descubrimiento de nuevas mutaciones asociadas a la enfermedad, que desencadenan la agregación de proteínas, representan nuevas oportunidades para dilucidar el efecto y el mecanismo de acción de la agregación de proteínas en la ELA.

## 1.2. Fisiopatología de la ELA. *TARDBP*

La fisiopatología de la ELA es compleja y a día de hoy, parcialmente comprendida. Los mecanismos de neurodegeneración incluyen tanto a las motoneuronas como a células no neuronales del sistema nervioso. Como ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas, la agregación de proteínas en la ELA, es una de las principales características histopatológicas que se observan en neuronas de tejido post mortem de pacientes, tanto de ELAf como de ELAe (Leigh et al. 1988; Neumann et al. 2006a). Los agregados proteicos, comúnmente denominados inclusiones o cuerpos de inclusión, son estructuras densas, redondeadas y positivas a ubiquitina que se encuentran predominantemente en neuronas de varias zonas del sistema nervioso como la corteza frontal y temporal, el hipocampo, tronco cerebral y medula espinal; (revisado en Saberi et al. 2015). Además, estas inclusiones se han localizado, no solo en neuronas, sino también en células gliales de la medula espinal de pacientes (Arai et al. 2006). En modelos animales se ha demostrado que los agregados proteicos aparecen al inicio de la enfermedad y se acumulan progresivamente hasta la fase final de la misma (McGoldrick et al. 2013).

Como se ha citado anteriormente, en 2006 dos grupos independientes identificaron a la proteína TDP-43 como el principal componente de los cuerpos de inclusión tanto en motoneuronas de pacientes de ELA como en las neuronas corticales de DFT (Arai et al. 2006; Neumann et al. 2006b), lo cual marcó un hito en la investigación y la comprensión de estas enfermedades. Es conocido que las inclusiones positivas a TDP-43 se encuentran en el 97 % de los casos de ELA, tanto de la forma familiar como la esporádica. (Mackenzie et al. 2007; Maekawa et al. 2009). Las principales excepciones son los casos causados por mutaciones en *SOD1* o *FUS*; revisado en Scotter et al. 2015). El hecho que esta enfermedad muestre agregados proteicos es una característica común con otras patologías neurodegenerativas, en la que los agregados, sea de proteínas concretas como beta-amiloide, o tau, constituyen una de las herramientas de diagnóstico más útiles. Por otro lado, la asociación entre neurodegeneración y alteración de la proteostasis en forma de agregado, sugiere la importancia de la relación entre mantenimiento de los niveles fisiológicos de una proteína en citosol y la capacidad de supervivencia de la

neurona, potencialmente alterada en procesos como el envejecimiento y/o la neuroinflamación.

### TDP-43. Estructura y Función

TDP-43 es una proteína nuclear de unión al ARN y al ADN que es ubicuamente expresada y codificada por el gen *TARDBP*, localizado en el cromosoma 1 (Ou et al. 1995). A nivel evolutivo, esta proteína está altamente conservada con una evidente secuencia de homólogos en ratones, pez cebra, mosca de la fruta y gusano. Estructuralmente, es una proteína de 43 kDa que consta de 414 aminoácidos y pertenece a la familia de las ribonucleoproteínas (Vanden Broeck et al. 2014).

La función de TDP-43 está relacionada con su estructura; la proteína presenta dos dominios de reconocimiento de ARN, una secuencia de localización nuclear (SLN), una señal de exporte nuclear y unos dominios C-terminales ricos en glicina así como el dominio N-terminal, que median la interacción entre proteínas y juega un papel importante en las propiedades de agregación de estas. (Figura 2). (Romano et al. 2015).

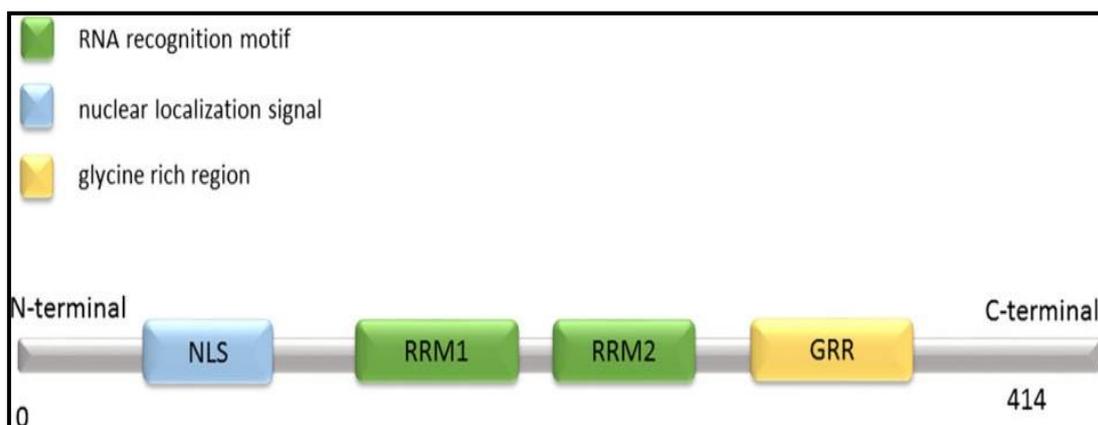


Figura 2. Esquema de la estructura de TDP-43. La proteína TDP-43 presenta dos dominios de reconocimiento de ARN (RRM) involucrados en el splicing de ARN, la autoregulación y la agregación. Una secuencia de localización nuclear (NLS) que controla el transporte entre el núcleo y el citoplasma. Un dominio C-terminal rico en glicina propenso a las mutaciones y a la fosforilación. Un dominio N-terminal, que median la interacción entre proteínas y juega un papel importante en el plegamiento y las propiedades de agregación de esta proteína (Mackenzie et al. 2010).

El dominio C-terminal rico en glicina contiene la mayoría de las mutaciones conocidas. Estas mutaciones funcionan como inhibidores de la unión por interacción, con las proteínas de la familia hnRNP en la formación de un complejo rico en hnARN (Buratti et al. 2005) (Figura 3).

Estas estructuras permiten la unión de la proteína al ARN y al ADN, y por ende su función, la cual está implicada en el metabolismo del ARN; tanto en el *splicing* del ARN, la represión transcripcional, la síntesis de micros ARN y el intercambio de ARNm entre el citoplasma y el núcleo. Una de las primeras funciones reconocidas de TDP-43 fue como modulador, tanto *in vitro* como *in vivo*, del gen del virus de la inmunodeficiencia humana-1 (Ou et al. 1995). Posteriormente se demostró que TDP-43 reprime la transcripción del gen de ratón *Sp10* de ratón, involucrado en la espermatogénesis (Abhyankar et al. 2007) y de la ciclina humana dependiente de quinasa 6 (*CDK6*), enzima implicada en el ciclo celular (Ayala et al. 2008a).

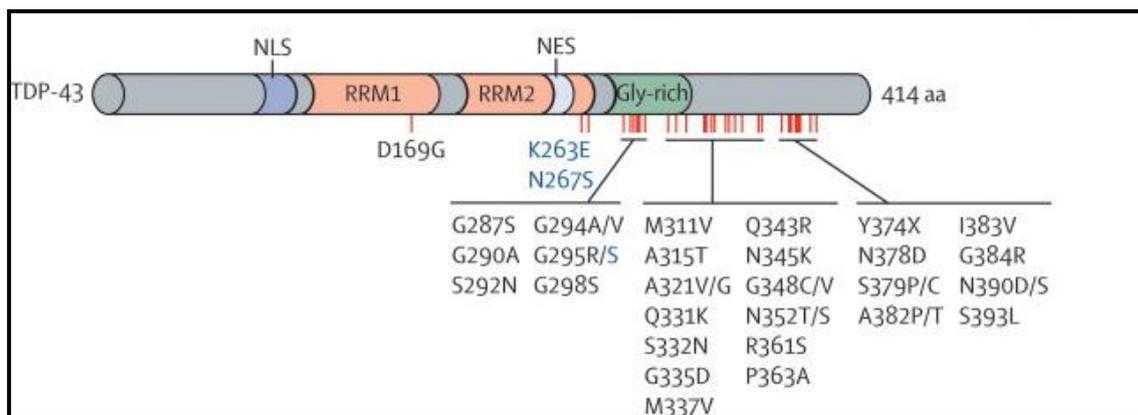


Figura 3. Representación esquemática de los dominios de TDP-43 y las mutaciones genéticas asociadas con la ELA. Las mutaciones se resumen por los cambios que provoca en la proteína y se muestran en su posición relativa (Mackenzie et al. 2010).

A nivel transcripcional, TDP-43 controla los niveles de expresión y las variantes de *splicing* de muchos genes que, a su vez, codifican para proteínas de unión al ARN, autorregulando por ejemplo, sus propios niveles de proteína (Ayala et al. 2011b). Además, regula los niveles de expresión serine-arginine-rich splicing factor 1) SRSF1, polipirimidina de unión al tracto (PTB), y hnRNP L. (revisado en (Guerrero et al. 2016)). Recientemente se ha demostrado, mediante un modelo de pérdida de función *in vitro*, que TDP-43

altera sustancialmente los niveles de expresión de isoformas en cuatro genes, involucrados en la apoptosis y en la mitosis celular (De Conti et al. 2015). Asimismo, TDP-43 también promueve el procesamiento de precursores de micro ARN (miARN), mediante la interacción con los complejo nucleares Drosha y Dicer y por unión directa a los miARN primarios, lo cual le confiere a esta proteína un papel esencial para el crecimiento neuronal (Kawahara and Mieda-Sato 2012) (Figura 4).

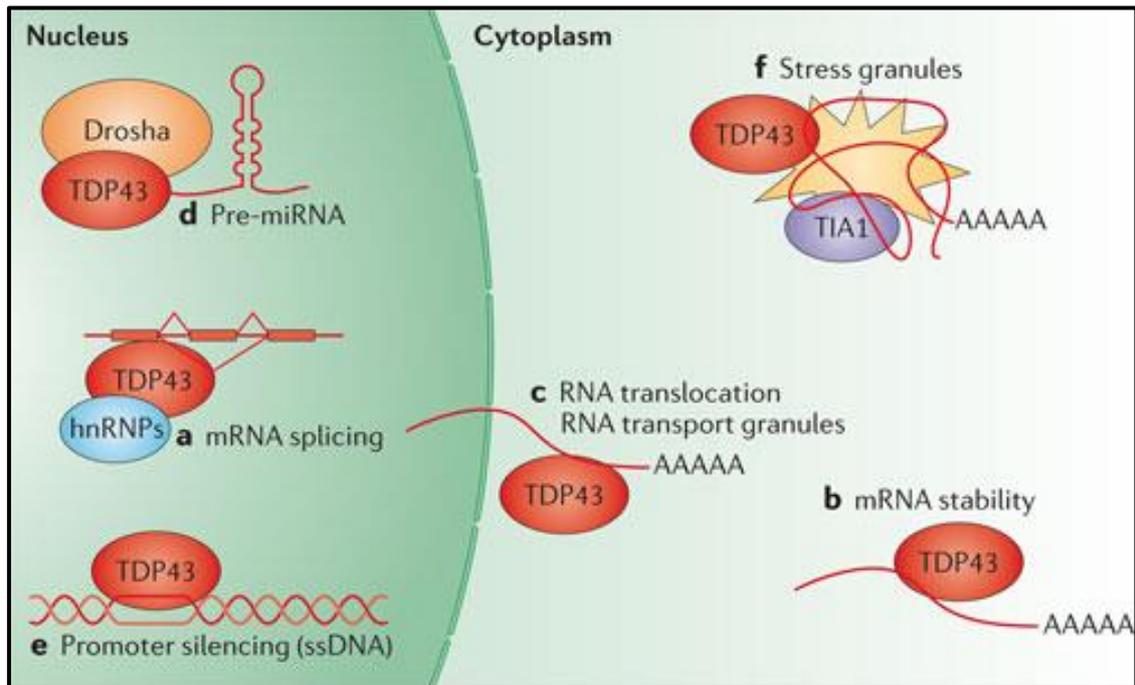


Figura 4. Funciones biológicas de la proteína TDP-43. Funciones biológicas de la proteína TDP-43. A: TDP-43 pertenece a la familia de hnRNP, las cuales regulan el splicing de ARN en el núcleo celular. B: TDP-43 se une a secuencias de ARNm en el citoplasma jugando un papel en la estabilidad de este, bajo condiciones de estrés. C: Se piensa que TDP-43 participa en el tráfico de ARNm, debido a su rápido desplazamiento entre el núcleo y el citoplasma. D: TDP-43 es también un componente del complejo Drosha, que funciona para procesar micro ARNs primarios. E: TDP-43 puede actuar como un represor transcripcional mediante la unión a secuencias de promotor de ADN de cadena sencilla (ssDNA). F: Además, TDP-43 colocaliza con gránulos de estrés en el citoplasma, los cuales secuestran y protegen al ARNm bajo condiciones de estrés.

Recientemente se identificó que TDP-43 actúa como un supresor del *splicing* de exones crípticos no conservados, manteniendo así la integridad del exón (Ling et al. 2015). Los exones crípticos son secuencias no conservadas, cuya expresión puede dar lugar a transcripciones de ARNm defectuosas que se deterioran y por lo tanto se eliminan mediante la maquinaria de degradación del ARNm mediada por mutaciones terminadoras. La represión de exones crípticos

está comprometida en casos de ELA, sugiriendo que el *splicing* de estos ARNm pudiera subyacer como posible mecanismo de la patología de TDP-43 (Ling et al. 2015).

La importancia de TDP-43 durante el desarrollo embrionario es fundamental, dado que los ratones *knock-out* homocigóticos de este gen, son letales a nivel embrionario entre los días 3,5 y 6,5 (Wu et al. 2009). Además, la supresión postnatal de *TARDBP* en ratones provoca una dramática pérdida de masa corporal, seguida de mortalidad acelerada. De manera similar, células madres embrionarias *TARDBP*<sup>-/-</sup> son incapaces de proliferar (Chiang et al. 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, TDP-43 se localiza principalmente en el núcleo, donde está involucrada en el metabolismo del ARN. Sin embargo, es conocido su movimiento desde el núcleo hacia el citoplasma y viceversa (Lagier-Tourenne et al. 2010). La función de TDP-43 en el citoplasma no está del todo elucidada; sin embargo, un estudio en el año 2010 demostró, mediante un enfoque proteómico global, que es capaz de interactuar con varias proteínas implicadas en la traducción a nivel citoplasmático (Freibaum et al. 2010). Además, investigaciones en esta línea han informado que el TDP-43 en el citoplasma, puede detener la traducción de proteínas específicas a través de la unión de TDP-43 al ARNm, en secuencias específicas UG/GU y mediante el reclutamiento del complejo CYFIP1-FMRP, el cual está involucrado en la activación y represión de la traducción de proteínas (Coyne et al. 2014; Majumder et al. 2016). Asimismo, un estudio reciente ha demostrado que un aumento de TDP-43 citoplasmático, reprime la síntesis global de proteínas en neuronas primarias y células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, mediada por una interacción con la proteína ribosomal RACK1 en los ribosomas (Arianna et al. 2017).

Atendiendo a muchos de los estudios relacionados con ELA, la proteína TDP-43, ha sido asociada con unas estructuras citoplasmáticas denominadas gránulos de estrés (GE) (figura 5), en médula espinal de pacientes de esta enfermedad (Bentmann et al. 2012; Liu-Yesucevitz et al. 2010). Los GE son unas estructuras citoplasmáticas y dinámicas temporalmente, que contienen

ARN y proteínas de unión al ARN (Bentmann et al. 2013). Dichas estructuras están presentes en todas las células eucariotas y no se encuentran encapsuladas por una doble membrana. Los GE son formados en respuesta al estrés ambiental celular facilitando así, la sobrevivencia celular; al priorizar la síntesis de proteínas protectoras del estrés, tales como, proteínas de choque térmico y chaperonas. Del mismo modo, almacenan de manera temporal el ARNm que codifica para proteínas *house-keeping* previniendo de este modo la acumulación de proteínas mal plegadas que puede llevar a la formación de agregados (Ayala et al. 2008b; Chen and Liu 2017; Kedersha and Anderson 2002).

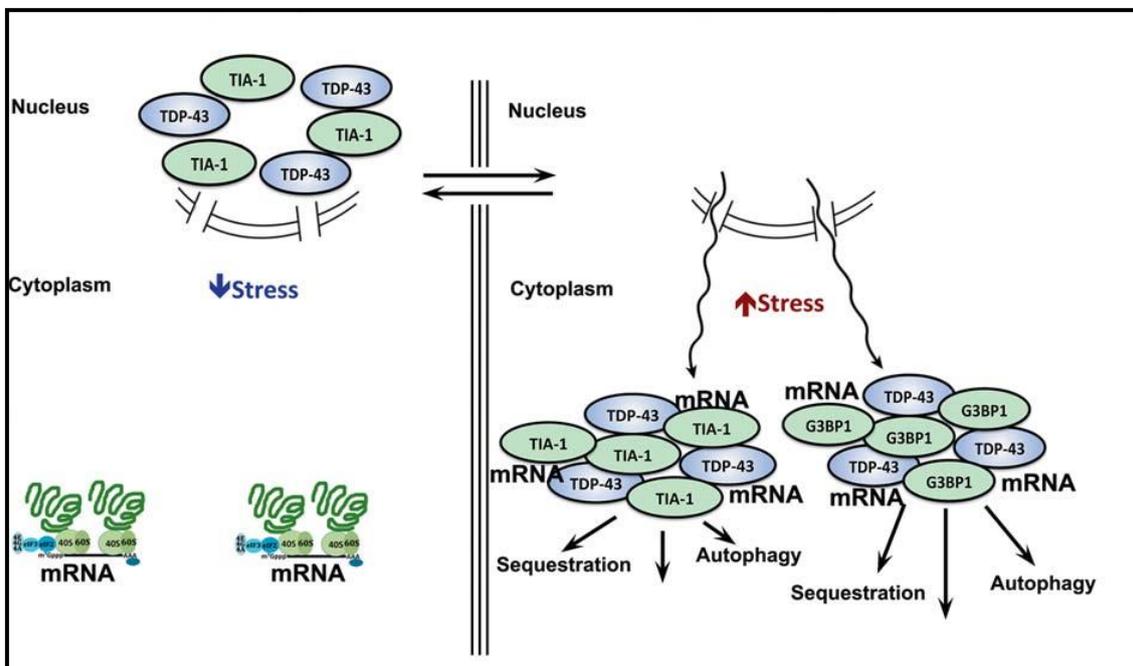


Figura 5. TDP-43 y gránulos de estrés. TDP-43 y otras hnRNP (TIA-1 y G3BP1) residen en el núcleo bajo condiciones basales. Bajo condiciones de estrés, TDP-43 abandona el núcleo. En el citoplasma se une al ARNm libre para formar los GE, a través de los dominios ricos en glicina. El proceso de formación de GE es reversible, pero el estrés prolongado conduce a la maduración e incorporación de otras proteínas y modificaciones post-traduccionales y la formación de agregados. Los GE maduros interactúan con los sistemas autofágicos y apoptóticos (Vanderweyde et al. 2013).

Se ha demostrado que TDP-43 se localiza y participa en la formación de los GE bajo diferentes estímulos estresores, como por ejemplo el estrés oxidativo (Budini et al. 2014; Colombrita et al. 2009), el estrés osmótico (Dewey et al. 2011; Goulet et al. 2008), el estrés mitocondrial (Chalupnikova et al. 2008), el estrés de retículo (ER) (Goodier et al. 2007), inhibición del

proteosoma (Colombrita et al. 2009; Fournier et al. 2010) , entre otros; revisado en (Aulas and Vande Velde 2015). Por ello, la formación de los GE podría ser de gran importancia para la ELA, como una probable hipótesis del origen de las inclusiones citoplasmáticas, típicas de la enfermedad. Una situación de formación de GE sostenida dentro de las células, podría culminar en irreversible agregación de TDP-43 (Bentmann et al. 2013; Li et al. 2013). (Figura 5). Globalmente, se sugiere que la participación de diversos estreses celulares, desarrollados posteriormente en esta introducción, podría conllevar uno de los motores de la pérdida de proteóstasis, asociable a la presencia de agregados en ELA.

Como se ha planteado anteriormente, la fragmentación y la agregación citoplasmática de TDP-43 y los cambios post transduccionales característicos (hiperfosforilación y ubiquitinización), son la signo citopatológico patognomónico de la ELA y de la DFT (Neumann et al. 2006b). Sin embargo, el papel de TDP-43 en los mecanismos fisiopatológicos de neurodegeneración, es causa de debate en la actualidad y varios escenarios han sido puestos en discusión. El proceso puede ser desencadenado por una ganancia de función de TDP-43, referido a la eventual toxicidad de los agregados; también puede ser debido a una pérdida de función, pertinente a la deslocalización, o por una combinación de estos dos contextos; ya que necesariamente no son mutuamente exclusivos y pueden coincidir en el mismo tiempo, resultando en la muerte de las neuronas motoras (Buratti 2015; Buratti and Baralle 2009).

Aunque los agregados proteicos constituyen unas de las principales características clínicas de la ELA, estos pueden no ser necesariamente tóxicos a las motoneuronas, según varios autores (Guo et al., 2010; Kaus y Sareen, 2015). Por el contrario, su formación podría ser un fenómeno neuroprotector, y los culpables reales pueden ser formas oligoméricas más pequeñas de proteínas mal plegadas (Ciechanover y Kwon, 2015; Guo et al., 2010). En este sentido cabe recordar que algunos de estos agregados se encuentran en las neuronas que han sobrevivido en la enfermedad, con lo que no es destacable su papel protector.

## **Mecanismos de Toxicidad**

A pesar de los avances en la comprensión de las enfermedades neurodegenerativas y específicamente de la ELA, los mecanismos por los cuales se forman los agregados y se desencadena la neurodegeneración, siguen siendo del todo incomprendidos a día de hoy. Algunos mecanismos que provocan o contribuyen al mal plegado de proteínas y a la agregación de estas, han sido propuestos por diversos investigadores. Entre estos mecanismos se encuentran las mutaciones génicas, la deslocalización celular, el estrés celular, la oxidación de proteínas y la desregulación proteosomal y de la autofagia (Lilienbaum 2013; Soto 2003; Valastyan and Lindquist 2014).

A continuación se describirán la base de algunos de los estreses celulares implicados en la etiopatogenia de la ELA. Pese a que dicha enumeración no pretende ser exhaustiva, al no presentarse todos los tipos de estrés implicados previamente en la pérdida motoneuronal, sí que comprende un conjunto común de factores implicados por varios autores.

### **Estrés oxidativo**

Las mitocondrias son la fuente principal de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular y se cree que contribuyen al 90% de las ROS generadas dentro de la célula (Kandola et al. 2015). Son orgánulos dinámicos, recubiertos por una doble membrana, que se encuentran dentro del citoplasma de las células eucariotas. La función primaria de las mitocondrias es la producción de energía celular, en forma de adenosina trifosfato (ATP), a través de la fosforilación oxidativa (Birch-Machin and Swalwell 2010). El metabolismo del oxígeno en las mitocondrias conduce a la generación de las ROS de manera natural; las cuales participan en funciones fisiológicas de señalización celular y de la homeostasis del oxígeno (Kammeyer and Luiten 2015).

El estrés oxidativo generado por el exceso de ROS es contrarrestado por moléculas antioxidantes intracelulares. Sin embargo, elevados niveles de ROS pueden sobrepasar los mecanismos antioxidantes, conduciendo a un desequilibrio en la homeostasis del oxígeno y a un ambiente oxidativo dentro de la célula (Kammeyer and Luiten 2015). Los radicales libres, entre ellos los

ROS, pueden causar daño oxidativo a través de una variedad de mecanismos. La oxidación de los lípidos, por ejemplo, puede dañar las estructuras celulares y dar lugar a la muerte celular prematura. Además, la interacción con los ácidos nucleicos nucleares y mitocondriales, pueden resultar en mutaciones o ruptura de doble cadena (Birch-Machin and Bowman 2016).

El sistema nervioso central es particularmente susceptible al estrés oxidativo debido a que las membranas neuronales contienen una gran abundancia de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácidos araquidónico y docosahexaenoico. Además, consume oxígeno a un ritmo elevado y contiene altas concentraciones de metales de transición redox activo, lo que contrasta con una concentración relativamente baja de antioxidantes (Contestabile 2001; Cosgrove et al. 1987).

El estrés oxidativo parece estar íntimamente ligado a una serie de eventos celulares en las motoneuronas que contribuyen a la degeneración neuronal (Barber and Shaw 2010). De hecho, varios análisis de tejido *post mortem* neuronal de pacientes con ELAe, han mostrado daño oxidativo a nivel de lípidos y proteínas (Ilieva et al. 2007; Shaw 2005). De la misma manera, según un estudio, se ha demostrado que el daño al ADN, evaluado por los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), en plasma, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR), de pacientes con ELA, fue significativamente elevado en comparación con los casos controles, según un estudio del año 2000 (Bogdanov et al. 2000a). Los autores manifestaron que los niveles plasmáticos y urinarios de 8-OHdG, se incrementaron significativamente con la progresión de la enfermedad y se correlacionaron con la gravedad de esta (Bogdanov et al. 2000a).

Por otro lado, un estudio realizado en 11 pacientes de ELA demostró que los niveles de glutatión en la corteza motora, están disminuidos en comparación con voluntarios sanos (Weiduschat et al. 2014). El glutatión es un secuestrador de radicales libres, que participa activamente en la regulación del estado redox intracelular. Además, la disminución de glutatión en cultivos neuronales, induce la formación de inclusiones citoplasmáticas de TDP-43, típico en pacientes de ELAe (Iguchi et al. 2012). Estos hallazgos sugieren que

la modificación oxidativa pueda ser uno de los principales mecanismos celulares implicado en la degeneración de las motoneuronas.

Una consecuencia del estrés oxidativo en las células, es la producción de alteraciones estructurales en proteínas secundarias a la oxidación, conllevando una mayor propensión a agregarse debido a la formación de enlaces cruzados covalentes, que son resistentes a la proteólisis (Grune et al. 2003; Parakh et al. 2013). En relación con TDP-43, se ha demostrado que un ambiente oxidativo celular, provoca la oxidación de residuos de cisteína en esta proteína, con la consecuente formación de puentes disulfuros anómalos, lo que conlleva a la agregación y a la pérdida de funcionalidad de la proteína (Cohen et al. 2012). La oxidación también se asocia a la acetilación de la TDP-43 en dos residuos de lisina específicos, que se localizan dentro de los dominios de unión a ARN; provocando de igual manera, agregación y pérdida de función, debido a una disminución en la solubilidad de la proteína (Cohen et al. 2015).

La susceptibilidad de TDP-43 al estrés oxidativo se ha demostrado en diferentes modelos celulares mediante el empleo de compuestos oxidantes tales como arsenito, paraquat y peróxido de hidrógeno (Meyerowitz et al. 2011). En la mayoría, el estrés oxidativo provoca la deslocalización del TDP-43 desde el núcleo hasta el citoplasma y aumenta su tendencia a agregarse y es probable que en estas condiciones se produzca una alteración de uno o más pasos del procesamiento del ARN (Colombrita et al. 2009).

Sin embargo, la alteración de TDP-43 *per se* puede provocar estrés oxidativo. Por ejemplo, la expresión de mutantes de TDP-43 en cultivo de células similares a la motoneuronas, induce estrés oxidativo, daño mitocondrial y acumulación nuclear del factor nuclear relacionado con E2 (Nrf2) que es un inductor y modulador del estrés oxidativo (Duan et al. 2010). En un modelo de levadura se demostró que la expresión de TDP-43 dio lugar a la formación de agregados perinucleares y perimitocondriales e inducción de estrés oxidativo y citotoxicidad, que culminó en vías de apoptosis y necrosis (Braun et al. 2011). La expresión de TDP-43 en motoneuronas de moscas *Drosophila*, condujo a un incremento de marcadores de estrés oxidativo como la carbonilación de proteínas y de la enzima *Glutathione S transferase D1* (Zhan et al. 2015).

Estos datos indican la importancia del estrés oxidativo en la toxicidad celular mediada por TDP-43 y establecen un nexo bidireccional entre estrés oxidativo y alteración proteostática de TDP-43.

Dado el papel relevante de la mitocondria en la producción de radicales libres, en la patología de la ELA se ha reportado varios grados de disfunción mitocondrial en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, aunque el mecanismo aún no ha sido del todo esclarecido. Por ejemplo, en la médula espinal de pacientes con ELA, se ha reportado disminución de las actividades de los complejos mitocondriales I, II, III y IV y de la enzima citrato sintasa (Borthwick et al. 1999; Wiedemann et al. 2002). De igual manera, se han demostrado defectos en la fosforilación oxidativa a nivel de los complejos mitocondriales en el modelo murino de ELAf, SOD1G93A. En este estudio los autores evidenciaron una reducción en la respiración y la síntesis de ATP (Mattiuzzi et al. 2002). Además, varios estudios han demostrado fragmentación mitocondrial en modelos celulares y animales que expresan la SOD1 mutada asociada a la ELAf; revisado en (Jiang et al. 2015). Asimismo, la sobreexpresión de un mutante de TDP-43 asociada a la ELA, también causó fragmentación mitocondrial en ratones y motoneuronas *in vitro* (Magrane et al. 2014; Wang et al. 2013; Xu et al. 2010). La fragmentación mitocondrial observada en los modelos experimentales de la ELA, sugiere un desequilibrio entre los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Estos son procesos dinámicos que regulan el crecimiento y la distribución mitocondrial y ayudan a mantener la red mitocondrial (van der Blik et al. 2013).

Un estudio reciente demostró que TDP-43 se acumula en las mitocondrias neuronales de pacientes con ELA y DFT. Los autores demostraron que tanto el TDP-43 *wild type* como el mutado, se unen a los ARNm que codifican para las subunidades del complejo respiratorio ND3 y ND6, perjudicando su expresión y provocando el desmontaje específico del complejo I. Además, la supresión del TDP-43 en la mitocondria, elimina la disfunción mitocondrial y mejora los fenotipos de ratones TDP-43 mutantes transgénicos. A raíz de estos resultados, los autores proponen un vínculo directo entre la toxicidad TDP-43 y la bioenergética mitocondrial; además, proponen la orientación de la localización mitocondrial de TDP-43 como un

enfoque terapéutico prometedor para la neurodegeneración (Wang et al. 2016b).

### **Autofagia**

La proteostasis en las neuronas y en otras células post mitóticas en general, está determinada por dos vías fundamentales de degradación de proteínas, para la eliminación de agregados proteicos: el sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS por sus siglas en inglés) y la degradación lisosomal asociada a autofagia (autofagia). El UPS por lo general, media la degradación de las proteínas de vida corta conjugadas con ubiquitina, aunque existe una vía proteasomal independiente de ubiquitinización, la basada en el 20S proteosoma, que actúa sobre proteínas modificadas por estrés oxidativo (Ruckenstein et al. 2014).

El sistema basado en la autofagia, se dirige preferencialmente a las proteínas de larga vida y orgánulos dañados (Rubinsztein 2006). La disfunción de estas vías catabólicas ha sido implicada en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas como Enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la ELA, entre otras (Otten et al. 2016; Rubinsztein 2006), ya que en todas ellas se objetivan la presencia de agregados citoplasmáticos, posiblemente relacionados con disfunción autofágica.

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado desde las levaduras y hongos a plantas y mamíferos siendo responsable de la degradación lisosomal de proteínas y orgánulos dañados (Yang and Klionsky 2010). Aunque se considera principalmente como un proceso de protección, que permite a las células sobrevivir ante diversos estresores, o incluso ante una situación de privación de nutrientes, una insuficiente o excesiva degradación autofágica puede llevar a diversos grados de daños a la estabilidad y la integridad de las células. (Yang and Klionsky 2010).

La autofagia se ha clasificado en tres subtipos, en dependencia del mecanismo de liberación del contenido a degradar en los lisosomas: la autofagia mediada por chaperonas, la microautofagia y la macroautofagia. La

autofagia mediada por chaperonas, implica el direccionamiento directo de los sustratos a degradar al lisosoma, a través de chaperonas citosólicas intermediarias, como la proteína de choque térmico 70 (HSC70) (Kaushik and Cuervo 2012). La microautofagia se refiere a la internalización directa de las proteínas al lisosoma, mediante una invaginación de la membrana lisosómica (Li et al. 2012). Por su parte, la macroautofagia, es la más estudiada y es denominada comúnmente como autofagia. La macroautofagia está mediada por un reordenamiento de las membranas subcelulares, que da lugar a una estructura de doble membrana denominada autofagosoma (Ravikumar et al. 2009). Los autofagosomas engullen regiones del citoplasma y se fusionan con el lisosoma para convertirse en el autofagolisosoma, donde se degradan los contenidos (Otten et al. 2016). (Figura 6).

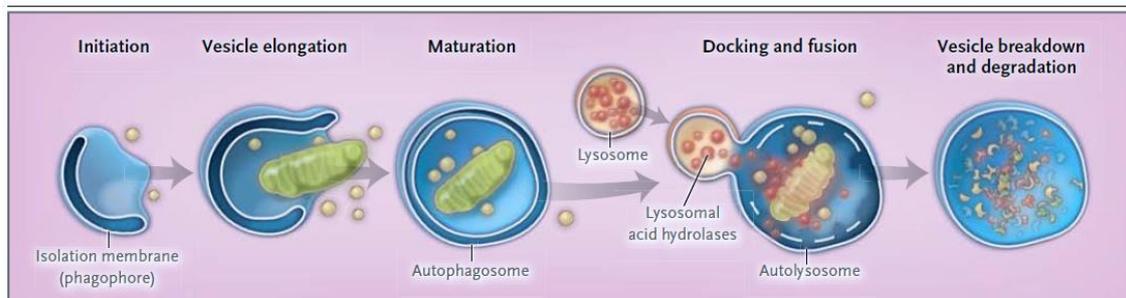


Figura 6. Representación esquemática del flujo autofágico. El flujo autofágico consta de varias fases a través de su desarrollo. Una fase de iniciación donde se aísla una estructura de doble membrana denominada fagóforo. Este proceso puede ser estimulado por causas ambientales como la falta de nutrientes. El fagóforo entonces envuelve componentes citoplasmáticos, que incluyen tanto pequeños desechos celulares como grandes organelos, en una vesícula llamada autofagosoma. Esta fase es coordinada por varias proteínas de conjugación, homólogas a ubiquitina, que incluye a la proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos, LC3, la cual es esencial para el estudio de la autofagia. El autofagosoma que contiene la carga a degradar, se fusiona con el lisosoma formando el autolisosoma donde las proteínas lisosomales degradan los componentes, completando la macrofagia (Choi and Ryter 2013).

Aunque la autofagia fue inicialmente descrita como un mecanismo de degradación inespecífico, hoy en día se han identificado varias formas selectivas de autofagia. Así, la REfagia, ribofagia, mitofagia, y la agrafagia, hace mención a la degradación específica del retículo endoplásmico, los ribosomas, las mitocondrias y los agregados proteicos, respectivamente (Stolz et al. 2014). (Figura 7).

El flujo autofágico está mediado por más de 30 proteínas y consta de cinco fases: (1) la nucleación, que es la formación de una estructura de doble membrana denominada fagóforo; (2) la expansión de la membrana del fagóforo por la incorporación de la proteína LC3-II; (3) la maduración de esta estructura en el autofagosoma y el secuestro de material citoplásmico a degradar; (4) la fusión del autofagosoma con el lisosoma, lo que resulta en la formación de los autofagolisosomas o autolisosomas y, por último; (5) la degradación de los materiales biológicos secuestrados por las enzimas hidrolíticas del lisosoma y el reciclamiento de moléculas (Wong and Cuervo 2010). (Figura 7).

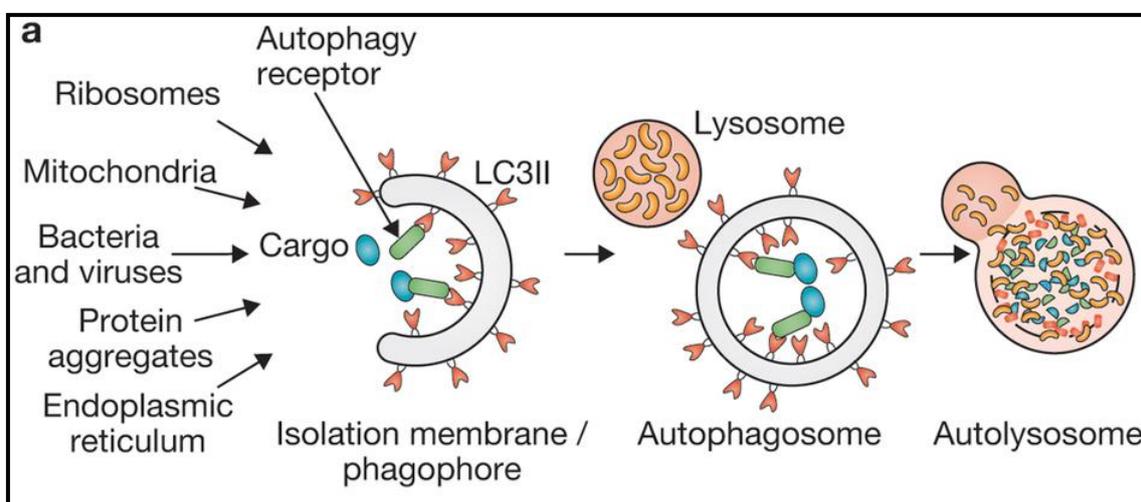


Figura 7. Selectividad de la autofagia. El fagóforo o la estructura de doble membrana positiva a LC3II, se forma alrededor de una carga autofágica específica basada en receptores de autofagia. Estos receptores (como p62) se caracterizan por su capacidad de interactuar simultáneamente con modificadores de autofagia (LC3) y la carga selectiva, uniendo así el creciente fagóforo y la carga a degradar (ribosomas, mitocondrias, bacterias y virus, agregados de proteína, retículo endoplasmático).

Algunos autores han sugerido que la disminución funcional del sistema autofágico dependiente de la edad, podría explicar la acumulación de proteínas anormales durante el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas (Frake et al. 2015). De hecho, la disfunción de la autofagia ha sido vinculada a varios trastornos neurodegenerativos, incluyendo aquellas relacionadas con TDP-43 (Wang et al. 2010). El proteosoma es otro sistema intracelular implicado en el reciclaje de proteínas. Al igual que la autofagia, la disfunción de

proteosoma también se ha relacionado con las anomalías típicas de TDP-43 (Scotter et al. 2014).

Una potencial prueba fehaciente del papel de la autofagia en la patogénesis de la ELA, es el hecho que muchos de los genes relacionados con la ELAf están implicados de alguna manera en la autofagia. (Tabla 2). Por ejemplo, mutaciones en los genes UBQLN2, SQSTM1, OPTN y VPN, codifican a proteínas que están directamente implicados en la degradación de proteínas; además de los genes CHMP2B y FIG4 que son necesarios para la maduración del autofagosomas. Por otra parte, en motoneuronas de la médula espinal de pacientes de ELA, se han detectado marcadores de autofagia, como la proteína LC3-II y p62, en las inclusiones citoplasmáticas; lo cual sugiere tanto una activación como una alteración del flujo autofágico (Sasaki 2011). Igualmente, en el modelo murino de ELAf SODG93A se ha demostrado un aumento de las vacuolas autofágicas en las motoneuronas de la medula espinal, desde estadios presintomáticos de la enfermedad (Li et al. 2008). En este mismo modelo se ha demostrado, que la activación de la autofagia disminuye los niveles de la proteína SOD1 mutada y la toxicidad inducida por la misma (Kabuta et al. 2006). Teniendo en cuenta que la autofagia depende de la disponibilidad de determinados aminoácidos, como la metionina o la cisteína, se ha demostrado que determinadas medidas antienvjecimiento, como la restricción en metionina, requieren de autofagia conservada para su pleno desarrollo (Ruckenstuhl et al. 2014).

Además, la evidencia sugiere que los agregados de TDP-43 son sustratos de la autofagia. Un estudio en cultivo celular demostró, que la inhibición de la autofagia conlleva a aumentos en la agregación y la insolubilidad de los fragmentos C-terminales de TDP-43; además de propiciar la deslocalización desde el núcleo hasta el citoplasma, lo cual sugiere que la autofagia podría regular el equilibrio del transporte nucleocitoplasmático (Brady et al. 2011; Ju et al. 2009). Los autores apuntaron que la vía de degradación dependiente del proteosoma también desempeña un papel en la eliminación de los agregados de TDP-43, aunque en menor magnitud que la autofagia (Brady et al. 2011). Sin embargo, según un estudio realizado por Scotter y colaboradores, el sistema UPS y la autofagia pueden tener papeles diferentes

en la degradación de TDP-43; mientras el UPS se encarga de lidiar con la forma soluble de TDP-43, la autofagia es requerida para la eliminación de los agregados citoplasmáticos (Scotter et al. 2014).

De igual manera, en un modelo de neuronas primarias y de astrocitos, Barmada y colaboradores demostraron que la inducción farmacológica de la autofagia, redujo los niveles de agregación y la deslocalización de TDP-43 y previno la muerte celular asociada a esta proteína (Barmada et al. 2014).

Debido a que la autofagia podría paliar los efectos citotóxicos de los agregados citoplasmáticos, se han postulado un gran número de compuestos que inducen el flujo autofágico, como una futura herramienta terapéutica. Uno de los compuestos más estudiado con este fin es la rapamicina, la cual activa la autofagia a través de la inhibición de mTOR. Este compuesto se ha probado en varios modelos de la ELA y otras enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, el tratamiento con rapamicina, redujo la toxicidad de las expansiones de poliglutamina en modelos de mosca y de ratón de la enfermedad de Huntington (Ravikumar et al. 2004). También el tratamiento con rapamicina suprimió los defectos cognitivos y redujo los niveles de beta amiloide en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer (Spilman et al. 2010). De manera similar, el tratamiento con rapamicina atenuó los síntomas de neurodegeneración dopaminérgica en modelos in vitro e in vivo de la enfermedad de Parkinson (Dehay et al. 2010). En la ELA, los resultados con este fármaco no han sido concluyentes. La administración de rapamicina a ratones SOD1 G93A no generó ningún efecto benéfico obvio (Bhattacharya et al. 2012), e incluso, causó resultados dañinos en términos de progresión de la enfermedad (Zhang et al. 2011). Sin embargo, la rapamicina retrasó la progresión de la enfermedad, aumentó la vida media y redujo la pérdida neuronal y las alteraciones neuromusculares en un modelo murino que sobreexpresa la proteína *wild type* en el TDP43 en prosencéfalo (Wang et al. 2012).

Otros activadores farmacológicos de la autofagia evaluados en diferentes modelos experimentales y con resultados beneficiosos incluyen: la trehalosa (Zhang et al. 2014) , el valprotato (Wang et al. 2015) y el litio (Fornai

et al. 2008). El estudio de los compuestos, que modifican o regulan el flujo autofágico, provee importantes herramientas para el entendimiento y desarrollo de nuevas terapias en la ELA y las enfermedades neurodegenerativas.

### **Estrés de retículo**

Como se ha reiterado previamente, una característica compartida por todos los pacientes que sufren de ELA, independientemente de su clasificación como esporádica o familiar, es la presencia de inclusiones en las motoneuronas; formadas por proteínas agregadas mal plegadas, asociadas con pérdida sináptica y muerte neuronal (Robberecht and Philips 2013; Sasaki and Maruyama 1994). Las mutaciones en los genes *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* y *C9ORF72* producen inclusiones proteicas de sus respectivos productos de traducción (en el caso de *C9ORF72*, se produce la repetición anormal del hexanucleótido GGGGCC). Como hemos planteado anteriormente, en el caso de TDP-43, este se encuentra agregado tanto en todos los casos de ELA como en la ELAe, con la excepción de aquellos pacientes con mutaciones en el gen *SOD1* (Lee et al. 2011).

El retículo endoplasmático (RE) es el primer compartimento celular donde se sintetizan y se pliegan las proteínas. Para este proceso, un conjunto de proteínas chaperonas, auxiliadoras de plegado y cofactores, se expresan en el RE para promover el plegamiento y prevenir la agregación anormal de proteínas (Hetz et al. 2011). El RE funciona también como un importante depósito de calcio intracelular y juega un papel crucial en la síntesis de lípidos. Una serie de condiciones de estrés puede interferir con la función de este órgano y causar mal plegado en el lumen del RE; lo cual desemboca en una condición celular denominada "estrés de RE" (Hetz et al. 2011). El estrés de RE promueve una vía de transducción de señales denominada "respuesta a proteínas mal plegadas" (UPR de sus siglas en inglés), con el objetivo de restablecer la homeostasis mediante el aumento de la capacidad de plegado de proteínas y los mecanismos de control de calidad del RE (Walter and Ron 2011). La activación crónica de esta respuesta celular resulta en muerte celular por apoptosis a través de diversos mecanismos complementarios (Hetz 2012).

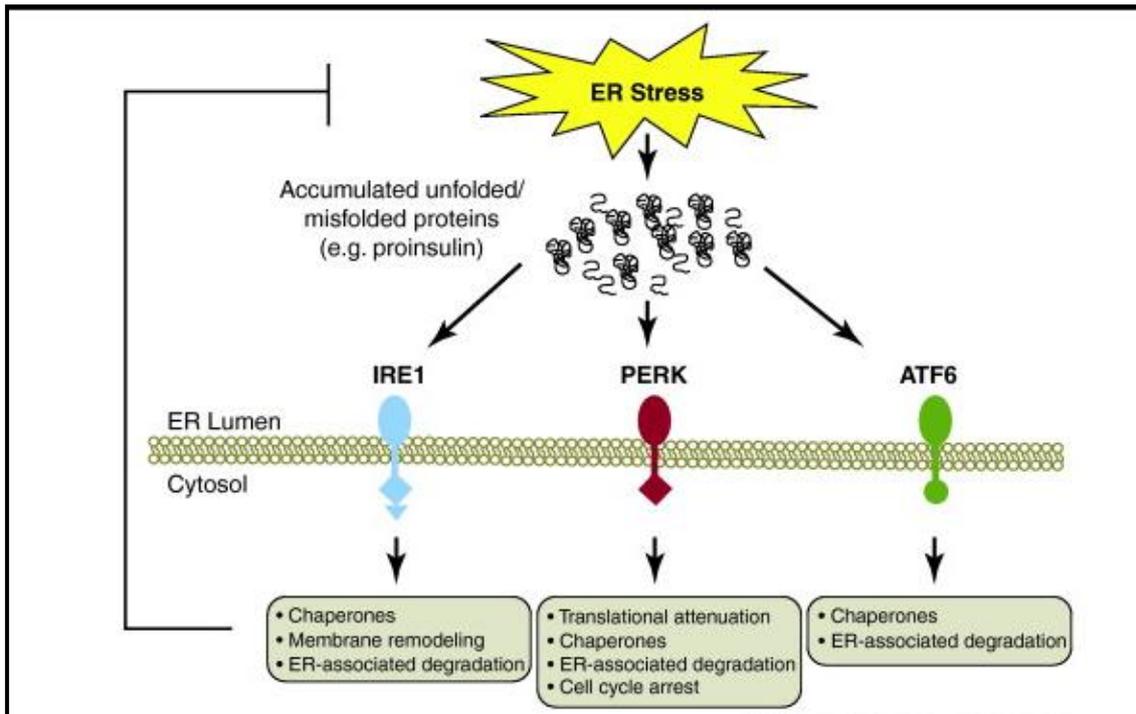


Figura 8. Representación esquemática del estrés de retículo. El estrés de retículo es censado por proteínas transmembranas que incluyen a la proteína quinasa que requiere inositol IRE1, la proteína quinasa tipo quinasa dependiente de ARN, PERK y el factor de transcripción ATF6. La activación de estas proteínas se traduce en una compleja cascada de señalización denominada “respuesta a proteínas mal plegadas” (UPR). La UPR señala varias proteínas que regulan la actividad de plegado de proteínas, a través de la regulación positiva de chaperones y enzimas de procesamiento de proteínas. Esto es continuado por una disminución de la síntesis proteica, mediante la atenuación de la traducción y la degradación del ARNm y mediante un aumento de proteínas de degradación asociadas a retículo y de la autofagia para eliminar proteínas no deseadas.

La UPR es activada por tres principales sensores de estrés que incluyen a la proteína quinasa PERK, la proteína quinasa/endonucleasa transmembrana IRE1 y el factor de transcripción 6 (ATF6). Tras la activación de la UPR, IRE1 inicia el *splicing* del ARNm que codifica para el factor de transcripción XBP1, convirtiéndolo en un potente activador de múltiples genes de respuesta a UPR (denominado XBP1s) (Calfon et al. 2002; Lee et al. 2002). XBP1s controla la expresión de genes implicados en el plegamiento, la secreción y el control de calidad de las proteínas (Acosta-Alvear et al. 2007). La proteína IRE1 $\alpha$  también regula otros eventos de señalización que modulan la apoptosis y los niveles de autofagia, mediante la activación de la vía de las proteínas quinasas c-Jun N-terminal (JNK) (Ron and Walter 2007).

Varios estudios han identificado la sobre regulación y la activación de las tres principales ramas de señalización de la UPR, además de la descripción de niveles elevados de chaperonas de retículo y señales de muerte celular vinculados al estrés de RE (Hetz et al. 2009; Ilieva et al. 2007; Vijayalakshmi et al. 2011). Trabajos previos de nuestro grupo demostraron la participación del estrés de RE en al patogénesis de la ELA, mediante una respuesta exacerbada de la UPR. Lo anterior fue evidenciado en médulas espinales de pacientes aquejados de ELAe; mediante un aumento de la fosforilación de una molécula diana de PERK, el factor de iniciación eucariota 2 alfa (eIF2 $\alpha$ ) y el aumento de los niveles de la proteína auxiliar del plegamiento de retículo PDIA1. Además, estos cambios se acompañaban de elevados niveles de proteínas oxidadas (Ilieva et al. 2007). Otros grupos de investigación también han informado sobrerregulaciones de otras proteínas involucradas en la respuesta a estrés de RE, en ELA esporádica y familiar, como la proteína foldasa ERP57, XBP1s y el factor de transcripción ATF4 (Hetz et al. 2009). Mediante inmunohistoquímica de tejido en médula espinal torácica de pacientes de ELAe, se ha descrito la sobre expresión de CHOP (Ito et al. 2009) el cual es un mediador importante de apoptosis bajo estrés de retículo. En estos estudios también se encontraron aumentados los niveles de PERK, ATF6 e IRE1 (Tabas and Ron 2011).

En un estudio proteómico en busca de biomarcadores en muestras de sangre de pacientes con ELAe, se observó la regulación positiva de algunas chaperonas de respuesta a estrés como PDIA1, ERp57 (Nardo et al. 2011). Cambios similares también se observaron en células mononucleares de sangre de ratones SOD1 G93A. En un estudio longitudinal en pacientes con ELA y sujetos control, se demostró que TDP-43, ciclofilina A y ERp57 están fuertemente asociadas con el curso de la enfermedad (Nardo et al. 2011). Estos estudios abren la posibilidad de monitorear las señales de estrés para diagnosticar y monitorizar la progresión de la ELA (Matus et al. 2013).

### **Transporte núcleo citoplasmático**

Como se ha planteado anteriormente, las principales características patológicas de la mayoría de casos de la ELA y más de la mitad de la DFT son, la agregación citoplasmática y la disminución de la localización nuclear de la

proteína TDP-43; definiendo así a estas enfermedades como proteinopatías de TDP-43. Asimismo, el 57 % de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer, también presentan proteinopatías de TDP-43 (Josephs et al. 2014). Por otro lado, está demostrado que las mutaciones de TDP-43 son capaces de causar la ELA. Sin embargo, las mutaciones asociadas al gen que codifica a TDP-43, *TARDBP*, son raras y representan sólo un 5 % de todos los casos de ELAf y menos del 1 % de los casos de ELAe (Sreedharan et al. 2008), lo cual no explica la agregación y deslocalización de la proteína *wild type*.

Una observación interesante es la presencia de inclusiones intranucleares de TDP-43, principalmente en algunos casos de ELAf, lo cual sugiere que afectaciones en el transporte nuclear podría tener algún papel en el inicio o desarrollo de la patología (Neumann et al. 2006b). En esta línea, en el año 2006 Zhang y colaboradores informaron alteraciones en la localización de proteínas asociadas con el sistema de transporte nucleocitoplasmático, en la médula espinal lumbar del modelo murino de SOD1G93A. Específicamente en las proteínas carioferina beta1 (KPNB1) e importina-alfa (importina-  $\alpha$ ) (Zhang et al. 2006). Posteriormente se confirmó la desregulación de KPNB1 en médula espinal de pacientes de ELA, tanto familiar como esporádica (Kinoshita et al. 2009). Además, es este mismo estudio, el análisis de algunas proteínas que conforman el poro nuclear (nucleoporinas o NUPs) como NUP88, NUP62 y NUP153, arrojó como resultado irregularidades en el contorno de la envoltura nuclear, de las motoneuronas de pacientes. Los autores sugirieron que unos de los mecanismos subyacente a la ELA, podría ser la disfunción en el transporte nucleocitoplasmático (Kinoshita et al. 2009).

Recientemente, varios estudios han puesto el foco de atención en la disfunción del transporte nucleocitoplasmático, como un mecanismo asociado en la ELA, así como en otras enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad. Mutaciones en el gen *GLE1*, que codifica para una proteína de la envoltura nuclear involucrada en el procesamiento de ARN, se ha asociado con la ELA. Al menos dos mutaciones en este gen se han identificado en un estudio que incluyó a 173 pacientes con ELAf y 760 de ELAe. En células HeLa ambas mutaciones causaron una disminución de la proteína GLE1 en el poro nuclear, donde desempeña un papel esencial en el transporte nuclear del ARN (Kaneb et

al. 2015). Cabe recordar que el metabolismo del ARN es una de las funciones clave de TDP-43 y de otros factores relacionados con ELA, como FUS. Adicionalmente, se demostró que algunos componentes del poro nuclear de motoneuronas se encontraban desorganizados, en pacientes y en un modelo de ratón de ELAe (Yamashita et al. 2017). Los autores demostraron que algunas proteínas del poro nuclear podían ser fragmentadas por la calpaina, contribuyendo así a la desorganización del poro nuclear. Además, algunas nucleoporinas como NUP62, NUP88, y NUP153 se encontraban deslocalizadas en el citoplasma, en forma de gránulos irregulares en las motoneuronas de los animales modelos de la enfermedad. De igual manera se demostró disfunciones en el transporte nucleocitoplasmático, mediante desregulaciones de proteínas involucradas en el transporte, como KPNB1 y NUP62 (Yamashita et al. 2017).

Por otro lado, diferentes investigadores han asociado mutaciones en el gen *C9ORF72*, con disfunciones en el transporte de proteínas y ARN desde el núcleo hacia el citoplasma (Jovičić et al. 2016; Prpar Mihevc et al. 2017). En un modelo de *Drosophila* relacionado con la expansión del hexanucleótidos GGGGCC se determinaron alteraciones de la proteína RanGAP (Zhang et al. 2015), la cual es un componente clave en el transporte de moléculas a través de los poros nucleares (Mor et al. 2014).

Además, se demostró que RanGAP interactúa físicamente con el ARN de la expansión del hexanucleótidos y se deslocaliza tanto en el modelo de *Drosophila*, en células pruripotentes derivadas de pacientes (iPSC) de ELA, como en tejido cerebral de dichos pacientes (Zhang et al. 2015). De igual manera, en otro estudio (Freibaum et al. 2015), se constató mediante un modelo de *Drosophila* relacionado con *C9ORF72*, que las moscas transgénicas presentaban anomalías morfológicas en la arquitectura de la membrana nuclear; la cual se evidenció por la tinción de la proteína lamina C. Igualmente, se encontró una acumulación de ARN en el núcleo de las células portadoras de la mutación en *Drosophila*, en células humanas y en líneas de iPSC de pacientes de ELA. Esta acumulación nuclear de ARN evita la traducción de muchas proteínas en las cantidades óptimas (Freibaum et al. 2015).

Los mecanismos por el cual *C9ORF72* causa disfunción en el exporte e importe nuclear en motoneuronas aún no está esclarecido. Una de las hipótesis que se manejan es la toxicidad mediada por las DPR. Estas proteínas se expresan y se acumulan en tejidos humanos (Mori et al. 2013a) y la introducción de ARN o de las propias proteínas en diferentes tipos de modelos experimentales produce un fenotipo neurodegenerativo (Jovičić et al. 2016). Por otro lado, ha sido demostrado que un tipo específico de DPR, la poli glicina-alanina (GA), secuestran proteínas involucradas en el transporte nucleocitoplasmático, como POM121 y RANBP1 en agregados citoplasmático y nucleares (Zhang et al. 2016b).

### 1.3. Complejo de nucleoporinas

Muchos de los procesos celulares que ocurren en eucariotas como la expresión génica, el crecimiento y la división celular, dependen del flujo continuo de moléculas y macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma. Este transporte ocurre a través de unas estructuras macromoleculares, denominados poros nucleares o complejo del poro nuclear (NPC de sus siglas en inglés); que se encuentran embebidos en la doble membrana nuclear, conectando el núcleo con el citoplasma (Cook et al. 2007; Raices and D'Angelo 2017) (Figura 9). Los poros nucleares tienen un tamaño variable a través de los diferentes reinos de la naturaleza. Su masa molecular varía desde los 60 MDa en levadura y hasta 110 MDa en mamíferos (Raices and D'Angelo 2012). Cada NPC está compuesto de múltiples copias de aproximadamente 30 proteínas diferentes, llamadas nucleoporinas (NUPs); dispuestas en simetría rotacional octagonal, alrededor del canal de transporte central (Allen et al. 2000).

Estructuralmente el poro nuclear se divide en varias categorías o subcomplejos de proteínas, definidas por las interacciones bioquímicas que se establecen entre las diferentes NUPs. Estos son los complejos NUP107-NUP160 y NUP93-NUP205 los cuales contienen proteínas con tiempos de residencia muy altos en el NPC y están entre las proteínas intracelulares de más larga vida (Rabut et al. 2004). Estas estructuras se localizan en forma de anillos alrededor del canal central del poro nuclear y constituyen el núcleo

estructural o *scaffold*; el cual tiene un papel crucial en el ensamblaje y mantenimiento del poro nuclear. (Nofrini et al. 2016). El anillo compuesto por NUP107-NUP160 es el complejo proteínico es el mayor en cuanto a tamaño y complejidad y es requerido en los primeros pasos de ensamblaje del NPC (incluye a: NUP160, NUP133, NUP107, NUP96, NUP85, SEH1L, NUP43, NUP37 and SEC13) (Hoelz et al. 2011). Unido al lado interno de estas estructuras, en el canal de transporte central, se encuentran unas proteínas caracterizadas por contener dominios nativos de fenilalanina-glicina, denominadas nucleoporinas FG (FG-NUPs). Estas proteínas establecen una barrera de permeabilidad selectiva que regula el transporte a través del NPC; a través de la interacción de estos dominios con proteínas involucradas en el transporte nucleocitoplasmático. (Alber et al. 2007; Schwartz 2005).

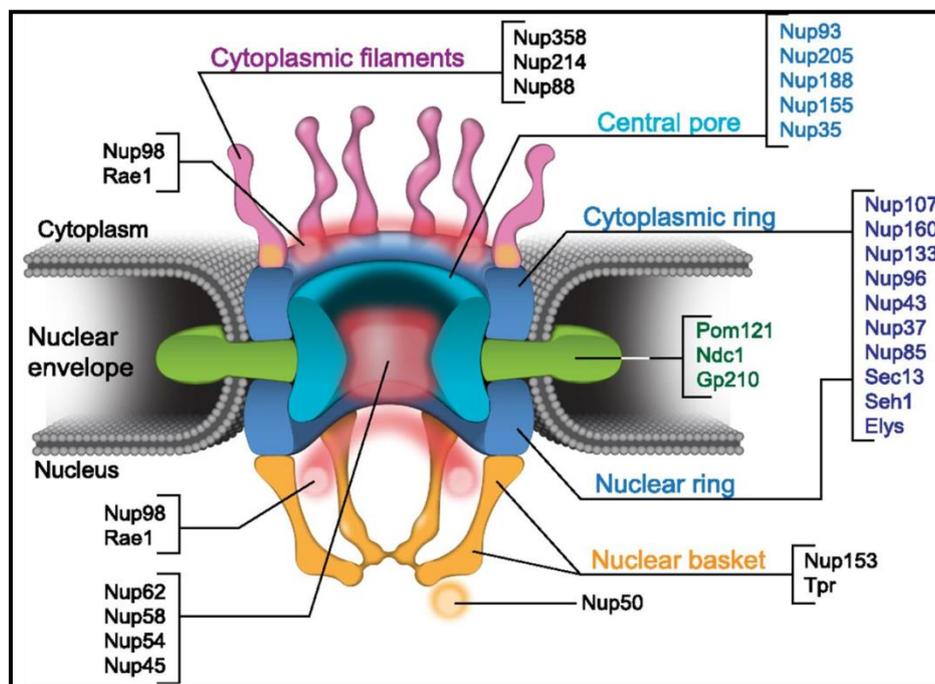


Figura 9. Representación esquemática de la estructura y composición molecular del poro nuclear de vertebrados. El núcleo del NPC y las proteínas que las componen (complejo NUP107-NUP160 y el complejo NUP93-NUP205) se representan en azul claro y azul oscuro. Las proteínas transmembranas POM121 NDC1 y GP210 se representan en verde. También se simbolizan los filamentos citoplásmicos en rosado y las proteínas de la cesta nuclear en naranja. (Ibarra and Hetzer 2015).

El NPC consta además de tres NUPs transmembranas conocidas (Pom121, Ndc1 y Gp210), que unen el poro nuclear con la envoltura nuclear y se cree que participa en el ensamblaje del NPC (Hoelz et al. 2011). El poro

nuclear también presenta unos complejos de proteínas filamentosas periféricas, que se extienden hacia el citoplasma y el nucleoplasma; los cuales están formados principalmente por NUP358-RanBP2, NUP214 y NUP88 y son requeridos para la correcta importación y exportación nuclear de receptores de transporte. Por último se encuentra una estructura denominada cesta nuclear que está constituida por proteínas filamentosas citoplasmáticas, la cual se compone de proteínas como NUP153 y TPR involucradas de igual manera en el transporte a través de los poros nucleares (Hoelz et al. 2011; Nofrini et al. 2016).

### **Transporte a través del NPC**

La principal función de NPC es el control del transporte nucleocitoplasmático. Los iones y la mayoría de las moléculas menores de 40 kDa son capaces de difundirse libremente a través del NPC. Las moléculas más grandes, en cambio, requieren factores de transporte llamados carioferinas y un gradiente de intercambio RanGTP/RanGDP para su tránsito a través del NPC (Stewart 2007). Las carioferinas pueden ser clasificadas en dos grupos: las que ayudan en la importación nuclear del sustrato o carga (importinas) y las que ayudan en la exportación nuclear del sustrato (exportinas). Estas proteínas de transporte están altamente conservadas entre especies y se unen a su carga a través del reconocimiento de interacciones específicas, necesarias para la dirección del transporte: una secuencia de localización nuclear (NLS) y una secuencia de exportación nuclear (NES) (Lange et al. 2007; Mosammaparast and Pemberton 2004).

En la importación nuclear clásica, un miembro de la familia de las carioferinas, la importina- $\alpha$ , reconoce y se une a la señal de NLS de la proteína citoplasmática a transportar (figura 10). La carioferina- $\beta$ 1 o importina- $\beta$ , se une entonces a la carioferina- $\alpha$  y este complejo se transporta activamente a través NPC hacia el núcleo, mediante la interacción con proteínas FG (Lange et al. 2007). Una vez dentro del núcleo, se disocia el complejo importina- $\beta$ /carioferina- $\alpha$ /carga, mediante la unión de la proteína GTPasaRan a la importina- $\beta$ . La importina- $\beta$  libre se recicla directamente de vuelta al citoplasma; mientras que el retorno de la importina- $\alpha$  al citoplasma se produce

a través de otro miembro de las carioferinas: la proteína de susceptibilidad de la apoptosis celular (CAS) (Kutay et al. 1997).

El transporte de TDP-43 hacia el núcleo se realiza mediante la unión de este con la importina- $\alpha$ . Se ha demostrado que la desregulación de la vía clásica de importe nuclear, mediante el *knockdown* de algunos de sus componentes en varias líneas celulares, conduce a la acumulación de TDP-43 en el citoplasma (Nishimura et al. 2010). Además, los niveles de CAS y, en menor medida, de la cariferina- $\alpha 2$  se encuentran reducidos en los cerebros de los pacientes con DFT asociado a TDP-43. La disminución en la concentración de proteínas que transportan TDP-43 hacia el núcleo podría contribuir a su deslocalización y agregación patológica (Nishimura et al. 2010).

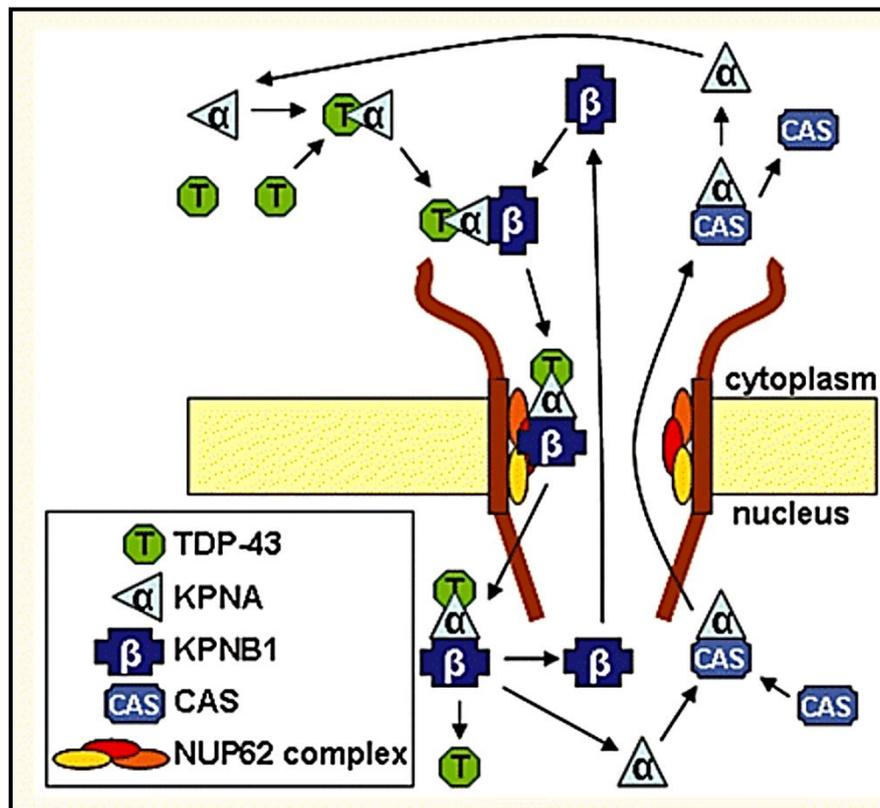


Figura 10. Mecanismo de importación nuclear de TDP-43. En la importación de TDP-43 hacia el núcleo participan varias proteínas de la familia de las carioferinas y del poro nuclear. TDP-43 es reconocida por la carioferina importina- $\alpha$  mediante el motivo NLS de TDP-43. Este complejo se une a la importina- $\beta$  y se transporta activamente al núcleo a través del poro nuclear, mediante la interacción de las FG-NUP. Una vez en el núcleo, el complejo de TDP-43 y carioferinas se disocia y estas vuelven al citoplasma. La importina- $\alpha$  a través de la proteína CAS y la importina- $\beta$  difunde libremente (Nishimura et al. 2010).

Curiosamente, la eficiencia y la selectividad del transporte nucleocitoplasmático se deteriora significativamente durante el envejecimiento (D'Angelo et al. 2009; Pujol et al. 2002). Esto es atribuible al hecho de que varias nucleoporinas, como miembros del complejo NUP107-NUP160, se encuentran entre las proteínas de más larga vida en neuronas post-mitótica (Savas et al. 2012). Las células post-mitóticas son incapaces de reparar los poros nucleares dañados que se acumulan durante la vida celular, provocando daño en la estructura del núcleo y alteración del transporte nucleocitoplasmático. Además, el estrés oxidativo, profundamente relacionado con el envejecimiento e implicado en varios trastornos neurodegenerativos (López-Otín et al. 2013), provoca daños a componentes del poro nuclear (D'Angelo et al. 2009; Yoshimura et al. 2013).

## **HIPÓTESIS**



## Hipótesis

Los mecanismos moleculares y celulares relacionados con el envejecimiento en el sistema nervioso central y en particular en la neurodegeneración específica de las motoneuronas en la ELA, implican a alteraciones de la proteostasis particularmente evidentes en proteínas como TDP-43, y los mecanismos celulares que la regulan. Varios de estos mecanismos comprenden a la función proteosomal, la autofagia, así como las disfunciones que pueden conllevar un incremento de la cantidad de proteínas mal plegadas, como puedan ser el estrés oxidativo y el de retículo. Por otro lado, dado que una de las dianas moleculares del envejecimiento tisular son algunas de las nucleoporinas (NUPs), implicadas en el equilibrio nucleocitosólico de proteínas como la propia TDP-43, en la presente tesis hipotetizamos que las NUPs pueden jugar un papel fisiopatológico relevante en la ELA, a través, entre otros, de la regulación de la localización subcelular de TDP-43 y de sus modificaciones postraduccionales.



## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

Para contrastar dicha hipótesis, se plantean los siguientes objetivos de investigación.

1. Evaluar la posible influencia de la ELA en su forma esporádica en los niveles de determinadas nucleoporinas, incluyendo en este objetivo el desarrollo de métodos para la evaluación en núcleos aislados *post mortem* mediante citometría de flujo.
2. Establecer la potencial relación entre la ELA y el estrés oxidativo en núcleos de tejido neuronal humano, mediante biomarcadores específicos.
3. Evaluar en un modelo transgénico murino de la ELA familiar, los posibles cambios en los niveles de determinadas NUPs, seleccionados de acuerdo con el género y la edad-grado de desarrollo de la enfermedad: estadios presintomáticos vs sintomáticos.
4. Establecer en un modelo *in vitro* de cultivo celular, la potencial relación entre pérdida de NUP107 y determinados rasgos bioquímicos y estructurales en biología celular asociados a la ELA, incluyendo las alteraciones de TDP-43: agregación, y deslocalización compartimental subcelular.
5. Cuantificar en el modelo *in vitro* descrito anteriormente, la influencia del silenciamiento de NUP107 en la respuesta autofágica.
6. Establecer la posible influencia de mecanismos de estrés celular relacionados con ELA, como el estrés oxidativo, de retículo, osmótico y proteasomal sobre la distribución de NUPs específicas y su relación con las características patológicas de TDP-43.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Muestras humanas

Todas las muestras de tejido *post mortem* corresponden a donaciones del banco de tejidos del Instituto de Neuropatología del Hospital de Bellvitge y de la Universidad de Barcelona/Hospital Clínico, de acuerdo con las normas éticas del Comité de Investigación Clínica de la institución, de la Asociación Médica Mundial y de acuerdo con los criterios de calidad de la muestra. Las muestras fueron de pacientes de edades comprendidas entre 50 y 79 años, diagnosticados de ELAe por sus características neurológicas y neuropatológicas. El retraso *post mortem* entre la muerte y el procesamiento de tejidos fue de 3 a 17 horas. Las muestras provenientes de controles, sin evidencias clínicas de enfermedad neurológica y con un estudio neuropatológico normal, se procesaron en paralelo (ver Tabla 3). Todos los pacientes o sus representantes dieron el consentimiento informado apropiado para el almacenamiento y análisis de las muestras. Para el diagnóstico de la ELA, se realizaron diferentes estudios patológicos, descritos anteriormente (Ilieva et al. 2007). El cerebro y la médula espinal fueron removidos rápidamente, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

### 2.2. Animales de experimentación

Para este estudio se utilizaron ratones transgénicos hSOD1G93A (B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J) y B6.Cg-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J) los cuales fueron suministrados por *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA) y cruzados en un fondo genético C57BL/6J y B6SJL respectivamente, para obtener los ratones hSOD1G93A y los animales no-transgénicos control. Este modelo transgénico, expresa grandes cantidades de la proteína superóxido dismutasa (SOD1) mutada y exhibe un fenotipo similar al de la esclerosis lateral amiotrófica en humanos. Los ratones transgénicos con fondo genético mixto (B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J) tienen una vida media de 128,9 +/- 9,1

días. En cambio los ratones B6.Cg-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J tienen una vida media de 157,1 +/- 9,3 días (Gurney et al. 1994; Wooley et al. 2005).

Los animales de experimentación fueron mantenidos en condiciones estándar con agua y comida disponibles *ad libitum*. Las condiciones de cría siguieron la normativa de la Generalidad de Cataluña, DECRETO 214/1997, por el que se regula la utilización de animales para la experimentación con respecto a la temperatura, la humedad, los ciclos de luz/oscuridad controlados, la higiene, la comida y la bebida. Los procedimientos de experimentación han sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Lleida (UDL). Los animales recién se sacrificaron por decapitación de acuerdo con la guía *American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition* (Leary et al.).

### **Genotipado**

La identificación de los ratones transgénicos y WT se realizó mediante la técnica de PCR con el ADN extraído de los animales. Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial XNAT (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA) y una pequeña porción de tejido procedente de la cola. Las colas se dejaron atemperar, cuando estuviesen congeladas, y se siguieron las indicaciones de la casa comercial del kit para la extracción del ADN.

Del ADN extraído se tomaron 0,4 µL del extracto y se sometió a una amplificación simultánea de un fragmento del gen *SOD1* humano mutado y del gen interleucina 2 (IL-2) como control de la reacción. La amplificación por PCR para ambos genes se realizó en un Termociclador v2.082740 (Applied Biosystems Carlsbad, CA, EE.UU.) con el programa mostrado en la tabla 4.

Para detectar los productos de amplificación se utilizó un gel de agarosa al 1 % w/v, teñido con SYBR® Safe (Molecular Probes, Carlsbad, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones de fabricación. Los productos se sometieron a electroforesis durante 30 minutos a una diferencia de potencial constante de 100 voltios. Las imágenes se tomaron bajo luz UV (302 o 365 nm), mediante el sistema de análisis digital Alpha Digidoc RT2 Santa Clara, CA, USA).

Tabla 3. Resumen de las características de los pacientes.

<b>Género</b>	<b>Edad de fallecimiento</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Origen enfermedad</b>	<b>Duración enfermedad</b>	<b>Post mortem</b>
<b>M</b>	64	ELA	Bulbar	2 años	16:30 h
<b>M</b>	57	ELA	Bulbar	2 años	4 h
<b>F</b>	75	ELA	Bulbar	4 años	4:5 h
<b>F</b>	79	ELA	Bulbar	20 meses	2:10 h
<b>F</b>	57	ELA	No Bulbar	5 años	10 h
<b>M</b>	50	ELA	No Bulbar	5 años	10:10 h
<b>M</b>	75	ELA	Bulbar	2 años	3 h
<b>M</b>	71	ELA	Non-Bulbar	8 años s	3:25 h

<b>Género</b>	<b>Edad de fallecimiento</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Origen enfermedad</b>	<b>Duración enfermedad</b>	<b>Post mortem</b>
<b>M</b>	68	Control	-	-	10:55 h
<b>M</b>	64	Control	-	-	08:35 h
<b>M</b>	59	Control	-	-	11:20 h
<b>F</b>	59	Control	-	-	11:20 h
<b>F</b>	79	Control	-	-	
<b>F</b>	66	Control	-	-	4:55h
<b>F</b>	76	Control	-	-	06:30 h
<b>F</b>	75	Control	-	-	06:10 h

Los animales no transgénicos presentaban una única banda de 324 pb (gen control de *IL-2*), mientras que los transgénicos presentaban dos bandas (236 pb y 324 pb) que corresponden a la amplificación del gen *SOD1* mutado e *IL-2*, respectivamente.

### 2.3. Cultivos celulares

#### Líneas celulares

Para este estudio se utilizaron diferentes líneas celulares para realizar los experimentos, así como el cultivo primario de fibroblastos. A continuación se describen brevemente cada una y su mantenimiento.

Tabla 4. Programa del Termociclador para la amplificación del gen *SOD1* y el gen *IL2*.

Paso	Temp °C	Tiempo	Nota
1	95	5 min	
2	94	1 min	
3	50	45 s	X 35 ciclos
4	72	1 min	
5	72	1 min	
6	4	Infinito	

### Neuro-2A

La línea celular Neuro-2A fue derivada de la cresta neural del ratón y ha sido ampliamente utilizada para estudiar la diferenciación neuronal, el crecimiento axonal y las vías de señalización. Las células tienen una morfología neuronal y de célula madre ameboidea (Tremblay et al. 2010).

Medio: ADVANCE MEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco) inactivado a 55 °C y 20 µg/mL de penicilina/estreptomicina (P/S) (Gibco™, 15140122). Mantenimiento: En placas de 10 cm<sup>2</sup> dividiéndolas cada 2-3 días en dilución 1:10. Las células se incuban a 37°C, en atmosfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

### SH-SY5Y

SH-SY5Y es una línea celular de neuroblastoma humano, comúnmente utilizada en estudios relacionados con neurotoxicidad, estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativa. La línea es un sub clon de la línea celular madre SK-N-SH que se estableció originalmente a partir de una biopsia de médula ósea de un paciente con neuroblastoma (Biedler et al. 1973; Krishna et al.).

Medio: DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco) inactivado a 55 °C y 20 µg/mL de penicilina/estreptomicina

(Gibco). Mantenimiento: En placas de p100 dividiéndolas cada 2-3 días en dilución 1:10. Las células se incuban a 37°C, en atmosfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **HeLa**

La línea celular HeLa es la humana más antigua y ampliamente distribuida, en prácticamente, la mayoría de laboratorios que se dedican al cultivo celular. Las células HeLa se derivaron de un adenocarcinoma del cuello uterino en 1952 y fue la primera línea de células de cáncer epitelial humano, establecida a largo plazo en cultivos celulares. Fenotípicamente son epiteliales en apariencia, crece rápidamente y muestra una falta de inhibición de contacto. Es ampliamente empleada en la investigación biomédica (MacLeod et al. 1999; Rahbari et al. 2009).

Medio: DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco) inactivado a 55 °C y 20 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco). Mantenimiento: En placas de p100 dividiéndolas cada 2-3 días en dilución 1:10. Las células se incuban a 37°C, en atmosfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **HEK-293**

La línea celular HEK-293 y sus derivados son ampliamente utilizados en biología celular y biotecnología. Las células se derivaron en 1973 del riñón de un embrión humano abortado, de paternidad desconocida por transformación con ADN de Adenovirus 5. La línea celular se usa ampliamente en experimentos que van desde la transducción de señales y los estudios de interacción de proteínas, hasta la expresión rápida de proteínas a pequeña escala y la producción biofarmacéutica (Lin et al. 2014).

Medio: DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco) inactivado a 55 °C y 20 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco). Mantenimiento: En placas de p100 dividiéndolas cada 2-3 días en dilución 1:10. Las células se incuban a 37°C, en atmosfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

## Tratamientos de cultivos celulares

En este estudio llevamos a cabo varios tratamientos con el objetivo de estudiar la relación de varios estreses celulares con las proteínas de interés. En la tabla 5 se detallan los diferentes tratamientos experimentados en esta tesis.

Tabla 5. Tratamientos realizados en líneas celulares.

Tipo de estrés	Reactivo	Dosis	Tiempo	Células
Estrés oxidativo	Paraquat	1 mM	24 horas	SH-SY5Y
	Arsenito de sodio	0,5 mM	1 hora	SH-SY5Y
	Peróxido de Hidrogeno	10 $\mu$ M	4 horas	Neuro-2a
Estrés osmótico	Sorbitol	400 mM	3 horas	HEK-293
Estrés de retículo	THG	5 $\mu$ M	4 horas	Neuro-2a
Inhibición del proteosoma	MG132	10 $\mu$ M	4 horas	Neuro-2a
Moduladores de la autofagia	3 methyladenine	10 mM	4 horas	Neuro-2a

## 2.4. Biología molecular

### Transfección de CRISPR-NUP107

CRISPR/Cas9 es una novedosa y revolucionaria herramienta de edición genética, con gran potencial en el campo de la biotecnología y la medicina, medio ambiente, alimentación e industria.

CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas, por sus siglas en inglés) junto con la endonucleasa Cas, es un mecanismo de defensa en bacterias y arqueas, análogo al silenciamiento con ARN interferente en eucariontes, que identifica y degrada secuencias de ácidos nucleicos exógenos. Se compone de dos elementos: un ARN proveniente de la secuencia CRISPR, llamado ARNcr, el cual se encarga de dirigir a Cas9, una endonucleasa que corta el ADN, hacia su secuencia complementaria

(Lammoglia et al. 2016). El sistema proporciona un medio eficaz para provocar cambios dirigidos en sitios específicos del genoma como puede ser, por ejemplo, el silenciamiento de genes (Shalem et al. 2014). Además, es un instrumento sencillo y más económico que las herramientas de edición génica ya existentes.

Por estas razones, se decidió emplear este sistema para la silenciamiento del gen *NUP107* y así estudiar su posible relación en la enfermedad de la ELA. El silenciamiento de este gen se realizó mediante el establecimiento de una línea estable de células HEK-293 mediante la transfección plásmido *NUP107* CRISPR/Cas9 KO (h) (Santa Cruz sc-405252); (desde ahora CRISPR-*NUP107*). Para la transfección seguimos el protocolo de Lipofectamina-2000 según las instrucciones de la casa comercial 2000 (Invitrogen, 11668).

De manera general, las células crecieron en placas de 60 mm de diámetro hasta tener una confluencia máxima del 60% y se transfectaron con 2-4 µg de ADN plasmídico mediante el empleo de Lipofectamina, en una relación de 2:1 de µL de Lipofectamina-2000 y µg de ADN respectivamente. Bajo nuestras condiciones experimentales, la eficiencia de transfección fue de 40-50%.

A las 48 horas de la transfección y después de comprobar la eficiencia de la misma, se adicionó el medio de cultivo enriquecido con 700 µg/mL de puromicina. Las células se dejaron en este medio durante aproximadamente dos semanas para la formación de los clones, cambiando el medio de cultivo cada 48 horas. Al término del tiempo, se seleccionaron los clones y se sembraron en placas de cultivos de 96 pocillos. A medida que los clones fueron creciendo se sembraron en placas de cultivos de mayor tamaño hasta que estuvieron aptas para pasar y congelar. El silenciamiento de *NUP107* se comprobó mediante *western blot*.

## 2.5. Biología celular

### Fraccionamiento celular

El fraccionamiento celular de las células Neuro-2A se llevó de acuerdo al protocolo descrito por van Eersel y colaboradores (van Eersel et al. 2011). Después del tratamiento con moduladores de autofagia (ver tabla 5), las células se lavaron con PBS y se lisaron con tampón hipotónico (HEPES 10 mM pH 7,9; KCl 10 mM; EDTA 0,1 mM; EGTA 0,1 mM; DTT 1 mM) e inhibidores de proteasas y fosfatasa comercial (Thermo Scientific 78440), durante 20 minutos en hielo. Posteriormente las células se homogenizaron y se hicieron pasar 3 veces por una jeringa de insulina de 0,3 mL. El homogenizado se centrifugó a 500 g durante 5 minutos para aislar los núcleos. El sobrenadante, que corresponde a la fracción citoplasmática, se volvió a centrifugar a 500 xg durante 5 minutos para eliminar cualquier núcleo contaminante y se guarda a -20 °C. El pellet que contiene los núcleos, se suspendió entonces en un tampón de alta salinidad (HEPES 20 mM; pH 7,9; NaCl 400 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; DTT 1 mM con inhibidores de proteasas y fosfatasa comercial (Thermo Scientific 78440) con el objetivo de romper los núcleos, con al posterior incubación en hielo durante 20 minutos. El homogenizado se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, para obtener el sobrenadante nuclear. El sedimento se resuspendió en un tampón de urea (urea 7 M; tiourea 2 M; CHAPS 4%; Tris 30 mM; pH 8,5), luego se sonicó a una amplitud del 30% durante 15 minutos y se centrifugó a 14000 rpm. El sobrenadante resultante es la fracción insoluble.

### Aislamiento de núcleos

Los núcleos celulares fueron extraídos de porciones de médula espinal y corteza frontal provenientes del hospital de Bellvitge de Barcelona según variaciones del protocolo de Blobber y Potter (Blobel and Potter 1966). Se partió de aproximadamente de 0,260 g de tejido congelado, el cual se dejó descongelar a temperatura ambiente. Una vez descongelado, se cortaron en trozos muy pequeños con un bisturí y se pasaron a un eppendorff de 2 mL, donde el tejido se homogenizó en dos volúmenes de sacarosa 0,25 M en TKM

frío (Tris 0,05 M; KCl 0,025 M; MgCl<sub>2</sub> 0,005 M) e inhibidores de proteasas y fosfatasa comercial (Thermo Scientific 78440). La homogenización se realizó primeramente con un homogenizador mecánico *Polytron* con un embolo de plástico y se dieron aproximadamente 20-40 *strokes*. Posteriormente se pasó el homogenizado a un homogenizador Dounce con embolo de cristal y se realizaron de 20-40 *strokes* con el embolo B o embolo *tight*. Al finalizar este paso, se transfirió el homogenado a un tubo de ultracentrífuga (Beckman Coulter, 344057), se añadieron 1080 µL de sacarosa 2,3 M en TKM y se mezcló el contenido del tubo por inversión 4-5 veces. Luego se introdujo una pipeta hasta el fondo del tubo de centrífuga y se adicionaron, con cuidado, 540 µL de sacarosa 2,3 M en TKM, procurando que se formaran dos fases bien definidas de sacarosa, donde el homogenizado quedaba en la parte superior. Los tubos de ultracentrífuga se ajustaron a pesos iguales para no crear desbalance en la centrífuga y se centrifugaron a 124000 g, durante 30 minutos a 4 °C en ultracentrífuga Optima L-100XP, Beckman Coulter con rotor SW 55 Ti. El pellet resultante, el cual es poco visible, se resuspendió en 50 µL de TKM con inhibidores de proteasas y fosfatasa comercial (Thermo Scientific 78440). La presencia de núcleos se comprobó mediante microscopía de fluorescencia, previa tinción con DAPI a 1 µg/mL.

## 2.6. Microscopía

La microscopía de inmunofluorescencia nos permite detectar la presencia y la localización de proteínas en las células *in situ*. En este caso usamos la inmunofluorescencia indirecta, que consiste en la utilización de un anticuerpo primario no marcado y uno secundario marcado con un fluorocromo.

### Microscopía de inmunofluorescencia celular

Para la microscopía se sembraron alrededor de 50000-80000 células en cubreobjetos previamente tratados con Poly-L-Lysine 1 mg/mL (Sigma, P1274), en agua apta para cultivos celulares. Al tiempo indicado, las células se lavan 3 veces con PBS y se fijan en PFA al 4% disuelto en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de fijado, se realiza una incubación con la solución de permeabilización y bloqueo (0,2 % tritón X-100 (v / v), 2 %

BSA (v / v) y 2 % HS (v / v) en PBS). A continuación, las células son incubadas toda la noche a 4 °C o 2 horas a temperatura ambiente, con los anticuerpos primarios adecuados, disueltos en 1/10 de solución de bloqueo en PBS, en una cámara húmeda. Pasado este periodo de incubación, se realizan tres lavados con PBS 1x y se incuban las muestras con el anticuerpo secundario apropiado y DAPI 1 µg/mL (Sigma D9542) para la tinción nuclear, durante 1 hora a 4 °C. Finalmente se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS y las células se montan en portaobjetos con solución de Fluoromount-G (0100-01 Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) y se deja secar a temperatura ambiente.

Para obtener las imágenes de las tinciones celulares se empleó un microscopio de fluorescencia Olympus equipado con epifluorescencia y una cámara CCD DP70 y un microscopio confocal FV1000 de Olympus usando el objetivo de 60X. Las imágenes se obtuvieron con el objetivo de 20X para la cuantificación de la fluorescencia y las imágenes se analizaron mediante programa informático de código abierto CellProfiler versión 2.1.1 para Windows (Kamentsky et al. 2011).

### **Microscopía de núcleos aislados**

Los núcleos aislados se fijaron en PFA 4% (w/v) en PBS en una relación 1/3 volumen núcleos/volumen de PFA 4% durante 15 minutos. Posteriormente, con una pipeta se puso la mezcla en un cubreobjetos redondo de diámetro de 12 mm, el cual estaba previamente colocado en placas de cultivos de 2 cm<sup>2</sup>. La placa con los núcleos, se centrifugó en una centrifuga apta para la centrifugación de placas de cultivos, a 1000 rpm durante 3 minutos. Al término del tiempo, se tomaron los cubreobjetos con unas pinzas finas y se pusieron en un soporte cubierto de *parafilm*. Los núcleos se incubaron en una solución de permeabilización y bloqueo (Triton X-100 0,1 %; NGS 10 % en PBS (de las siglas en inglés *normal goat serum*)), durante 30 minutos. Luego, se realizaron tres lavados suaves con PBS, cuidando de no despegar los núcleos. Los cubres/núcleos se incubaron toda la noche a 4 °C o 2 horas a temperatura ambiente, con los anticuerpos primarios adecuados, disueltos en 1/10 de solución de bloqueo en PBS, en una cámara húmeda. Pasado este periodo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron las muestras

con el anticuerpo secundario apropiado disuelto en PBS y DAPI 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la tinción nuclear, durante 1 hora a 4 °C. Finalmente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS y los núcleos se montaron en portaobjetos con solución de Fluoromount-G y se deja secar a temperatura ambiente.

Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal, con un microscopio FV1000 de Olympus y se analizaron con el empleo del programa informático de código abierto CellProfiler versión 2.1.1 para Windows (Kamentsky et al. 2011).

## **2.7. Inmunodetección de proteínas**

### **Extracción proteica de cultivos celulares**

Los lisados celulares se obtuvieron tras los distintos tratamientos y en los tiempos de cultivo deseados, para analizar las proteínas por *western blot*, en condiciones desnaturalizantes. Por lo general, los tratamientos se realizaron en placas de cultivos de 6 pocillos, lo cual proporciona la cantidad de proteínas suficiente para ser detectada por esta técnica experimental. Luego del tratamiento, se aspira el medio de cultivo de la placa, se pone la placa en frío para detener las reacciones celulares y se hacen tres lavados con PBS frío para eliminar las proteínas del medio y restos de medio de cultivo. Posteriormente se agregan 100-300  $\mu\text{L}$  del tampón de lisis RIPA, con inhibidores de proteasas y fosfatasa comerciales (Thermo Scientific 78440) y se raspa la placa con una espátula de cultivo, para despegar las células. Al finalizar se coloca el lisado en un eppendorff y se sonicán durante 1 minuto para romper las estructuras celulares. Las muestras se guardan a -20 °C hasta el análisis proteico.

### **Extracción proteica de tejidos animales**

La extracción proteica de tejidos animales se realizó mediante homogenización mecanizada utilizando un el homogenizador Ultra-Turrax (3420000 IKA, Alemania). De forma general, se colocan unos 50 mg de tejido en un eppendorff de fondo cónico y se mantienen en hielo. Se agregan 500  $\mu\text{L}$  de tampón de homogenización (KCl 180 mM; MOPS 5 mM; EDTA 2 mM; BHT

1  $\mu\text{M}$ ; NaF 1 mM;  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM e inhibidores de proteasas y fosfatasas comercial y se homogeniza con el Polytron durante aproximadamente 20 segundos, dependiendo de la dureza del tejido. El homogenado es sonicado durante 30 segundos, para romper las estructuras tisulares. Las muestras se guardan a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta el análisis proteico.

### **Cuantificación de proteínas**

La cuantificación proteica se realizó mediante la utilización del kit comercial Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIO-RAD, 500-0006), el cual se basa en el método colorimétrico desarrollado por Bradford en 1976 (Bradford 1976). Este procedimiento se basa en la unión del colorante Coomassie Azul G250 a las proteínas. La forma catiónica del colorante, que predomina en la solución de reactivo, tiene una absorción máxima de 470 nm. Por el contrario, la forma aniónica del colorante, que se une a la proteína, tiene una absorción máxima de 595 nm. Por tanto, la cantidad de colorante unido a la proteína puede cuantificarse midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm (Kruger 1994).

Los datos se analizaron por la interpolación de los datos obtenidos a partir de una recta patrón de BSA (rango de 0 a 0,025 mg/mL). Una vez cuantificadas las proteínas, las muestras se normalizaron con agua MilliQ todas a la misma concentración y se les añade el tampón de carga (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2% (w/v); Glicerol 10% (v/v); 2- $\beta$ -mercaptoetanol 20% (v/v) y azul de bromofenol 0,02% (w/v). Las muestras pueden ser guardadas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  o  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta el posterior análisis.

### **Electroforesis**

La electroforesis se utiliza para separar moléculas mediante un campo eléctrico. En este caso utilizamos una matriz porosa (electroforesis en gel) para separar las proteínas en condiciones desnaturalizantes. Para ello se utiliza detergente iónico dodecilsulfato sódico (SDS), que les confiere carga negativa a las proteínas, permitiéndoles migrar según su peso molecular por un gel de acrilamida. El gel utilizado para la electroforesis consta de dos partes: el gel concentrador (Tris-HCl 125 mM pH 6,8; acrilamida/bisacrilamida (30: 0,8) (v/v);

5% (v / v); SDS 0,1% (w/v); persulfato amónico y TEMED 0,025% (v/v)) que permite que las proteínas empiecen a migar juntas al mismo tiempo; y el gel separador, que es donde se produce la separación de las proteínas (Tris-HCl 375 mM pH 8,9; acrilamida/ bisacrilamida (30:0,8) (w/w); 7-15% (v/v); SDS 0,1% (w/v), persulfato amónico 0,005% (w/v) y TEMED 0,025% (v/v)). Una vez preparados los geles, se cargaron las muestras en el gel concentrador (10-30 mg de proteínas por carril) y se llenó la cubeta con el tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1% (w/v)). La electroforesis se realizó a intensidad constante (15 mA/gel) hasta que el frente de proteína llegue al gel separador, donde se incrementó el amperaje a 20-25 mA/gel hasta que el frente de carga llegó al final del gel.

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunofluorescencia indirecta.

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial	Referencia
TDP-43	1:250	Proteintech,.	10782-2-AP
Mab414	1:200	Abcam	ab24609
Tubulina $\beta$ III	1:200	Millipore	MAB1637
8oxodG	1:200	Abcam	ab62623
NeuN	1:200	Abcam	ab177487
NUP-93	1:200	Abcam	ab92776
NUP-107	1:200	Abcam	ab73290
$\gamma$ -H2AX	1:200	Abcam	ab2893
p-ERK1/2	1:100	Upstate	05-481
Secondary anti-rabbit, Alexa-Fluor® 546 conjugate	1:500	Thermo Fisher Scientific.	A11010
Alexa fluor 488 phalloidin	1:500	Invitrogen	A12379

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de PVDF (Immobilion-P #IPVH00010 Millipore, Millford, MA, USA) previamente activadas con metanol 100 %. La transferencia se llevó a cabo en cubetas de transferencia (Mini Trans-Blot transferencia celular de BioRad Laboratories, Barcelona, Cataluña, España) a voltaje

constante de 100 V durante 1-1,5 horas y en tampón de transferencia (TRIS 25mM; glicerol 192 mM; metanol 20% (v/v)).

### **Bloqueo**

Finalizada la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, esta última se incubó en una solución de bloqueo (I-Block™ reactivo 0,2%; PBS 0,1 %; Tween-20®) durante una hora en agitación suave.

### **Inmunodetección y análisis**

Concluida el tiempo de bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario en TBS-T 0,05 % (TRIS 2 M; NaCl 2,5 M; Tween-20® 0,05%) 1 hora a temperatura ambiente o a 4°C durante 16 horas. y secundario. Los anticuerpos utilizados se enumeran en la tabla 7. Luego de la incubación se hicieron 3 lavados de 5 minutos con TBS-T 0,05 % y las membranas se incuban con el anticuerpo secundario diluido en TBS-T 0,05 %. Al finalizar se hicieron 3 lavados de 5 minutos con TBS-T 0,05 % y las membranas se dejan en esta solución hasta el revelado de las membranas.

Para revelar las membranas, estas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con un sustrato de la peroxidasa, que da lugar a un producto quimioluminescente (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate). El revelado se realizó con el equipo Molecular Imager ChemiDoc XRS (BioRad, Munich, Alemania) mediante el programa informático Quantity-One 4.6 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). La cantidad de luminiscencia obtenida es proporcional a la cantidad de anticuerpo primario unido a la proteína de interés. Para visualizar la carga total de proteínas, las membranas se sumergieron en una solución de Ponceau (0,1% (w/v) (Sigma, P3504) mediante mediante el reactivo Brilliant Blue R (SIGMA, B0149).

## **2.8. Citometría de flujo**

Se utilizó la citometría de flujo para el análisis de proteínas nucleares en los núcleos aislados según el protocolo anterior. Para ello, los anticuerpos NUP107, NUP93 y MAB414 fueron conjugados con los fluoróforos R-

Phycoerythrin (RPE), allophycocyanin (APC) y APC/Cy7 mediante los Kit de conjugación de Abcam ab102918, ab201807 y ab102859 respectivamente, según las recomendaciones e indicaciones del fabricante. De manera general se añadió 1  $\mu\text{L}$  de reactivo de modificación del fluoróforo (suministrado en el kit de conjugación) a 10  $\mu\text{L}$  del anticuerpo a modificar y se mezcló suavemente. Se retiró la tapa del vial de la mezcla de conjugación (suministrado en el kit de conjugación) del fluoróforo y se pipeteó la muestra de anticuerpos (con el reactivo modificador APC añadido) directamente sobre el material liofilizado (suministrado en el kit de conjugación). Posteriormente se resuspendió el líquido una o dos veces usando una pipeta, se y se dejó reposar durante 3 horas en la oscuridad. Luego se añade 1  $\mu\text{L}$  del fluoróforo *Quencher* (suministrado en el kit de conjugación) por cada 10  $\mu\text{L}$  de anticuerpo utilizado y se mezcló suavemente. Los conjugados se usaron después de 30 minutos, tal como indicaba el kit de conjugación.

Una vez se tuvieron los anticuerpos marcados con sus respectivos fluoróforos, estos se incubaron con los núcleos aislados mediante el método *one pot reaction*. Para ello, se partió de una solución de núcleos en PBS, en una proporción volumen de núcleos:volumen de PBS de 1:20. Se adicionó el anticuerpo conjugado con el fluoróforo en una concentración 1:500 y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego, los núcleos fueron analizados mediante el citómetro digital FACS-Canto II (BD Biosciences).

## 2.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad (Motulsky 2015) Prism 5 o SPSS (Coakes et al. 2008). En el contraste de hipótesis, se tuvo en cuenta un nivel de significación estadística cuando el valor de  $p$  era inferior a 0,05. La distribución de la variable se analizó mediante la prueba de Kolmogorov–Smirnov y se utilizó la prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de la varianza. Para los casos en los cuales la variable a evaluar tenía una distribución normal y la varianza era homogénea, se aplicaron pruebas paramétricas: análisis de varianza (ANOVA) para las comparaciones múltiples o la prueba  $t$  de Student para las comparaciones entre

dos medias muestrales. Para los casos que no cumplían estas condiciones, se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección por *western blot*.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
TDP-43	1:1000	Proteintech	10782-2-AP
ATG4B	1:250	Sigma-Aldrich	A2981
p62	1:1000	Cell Signalling	5114 (USA)
Mab414	1:500	Abcam	ab24609
Tubulina	1:5000	Abcam	ab7291
8oxodG	1:1000	Abcam	ab62623
NeuN	1:1000	Abcam	ab177487
NUP-93	1:1000	Abcam	ab92776
NUP-107	1:1000	Abcam	ab73290
NUP-153	1:1000	Abcam	ab81463
LC3B	1:2000	Cell Signalling	2775
Ubiquitina	1:100	Sigma	U5379
$\gamma$ -H2AX	1:1000	Abcam	ab2893
p-ERK1/2	1:1000	Upstate	05-481
Secondary anti-rabbit, HRP conjugate	1:50000	Thermo Fisher Scientific.	31460
Anti-mouse IgG	1:30000	Amersham	NA931V
Anti-rabbit IgG	1:100000	Pierce	31460

## 2.10. Lipidómica de núcleos aislados

Los lípidos de los núcleos aislados de médula espinal extraídos post mortem de pacientes de ELA (n=4) y controles (n=4) se extrajeron usando metil-tert-butil-éter con la ayuda de un sonicador, tras la adición de patrones internos deuterados representativos de clases. Posteriormente, se separó el lipidoma a través de cromatografía en fase reversa (Waters Acquity HSS T3 × 2,1 mm × 100 mm a 55°C), en gradientes adecuados y descritos previamente (Jové et al. 2014). El análisis se realizó mediante un cromatógrafo líquido (Agilent 1290 UPLC) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent 6520 ESI-QTOF-MS) que permite la caracterización de los lípidos y metabolitos basado en la masa exacta (<10 ppm), espectro isotópico y en los tiempos de retención de patrones internos marcados isotópicamente y representativos de las clases mayoritarias de lípidos. El eluido se monitorizó en el sistema Q-TOF por electroespray en modo de ionización positiva y negativa, colectándose datos en un rango de m/z desde 100 hasta 3000, con fuente de ionización a 120°C y N<sub>2</sub> como gas de solvatación a 250°C (800 L/h). El ajuste de masa exacta se realizó por infusión conjunta en spray de referencia de purina y HP9982, con masas exactas con errores inferiores a 0,5 ppm.

Tras la extracción de las características moleculares, se realizó el análisis de los resultados mediante el software Mass Profiler (versión para espectrometría de masas). Todas las muestras se codificaron y analizaron en modo de doble ciego. Tras la recogida de datos, se decodificaron y se realizaron los análisis estadísticos pertinentes, empleando análisis no paramétricos si la normalidad de las variables no se demuestra para comparación entre los grupos (Wilcoxon) o t de Student para variables de distribución normal. Para el análisis lipidómico multivariante se utilizó un algoritmo de escalado automático, empleando sucesivamente agrupación jerárquica, el análisis de componentes principales (PCA) y el de modelización de acuerdo a discriminantes cuadráticos parciales (PLSDA) empleando un paquete de R denominado OrbisMet disponible en <http://hdl.handle.net/10609/65305>.



## **RESULTADOS**



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Nucleoporinas en médula espinal de pacientes de ELA

##### Inmunoblot de NUPs en médula espinal

Como se ha indicado en la introducción, en la sección Complejo de nucleoporinas del capítulo de Introducción, las NUPs son proteínas del poro nuclear que participan, entre otras funciones, en el transporte nucleocitoplasmático intracelular. Entre estas se encuentran las que presentan un dominio de fenilalanina-glicina, denominadas FG-NUP, las cuales destacan por favorecer el transporte mediado por receptores, como las carioferinas. Para determinar si la ELA se asocia a cambios en la cantidad de NUPs que puedan contribuir a alteraciones en el transporte nucleocitosólico; se determinaron los niveles de miembros representativos de las FG-NUP en homogenados de médula espinal extraídas *post mortem* mediante *western blot*, previa separación en gel de acrilamida e inmunodetección. La inmunodetección se realizó mediante el anticuerpo monoclonal MAb414 que reconoce epítetos compartidos por las FG-NUP (figura 11).

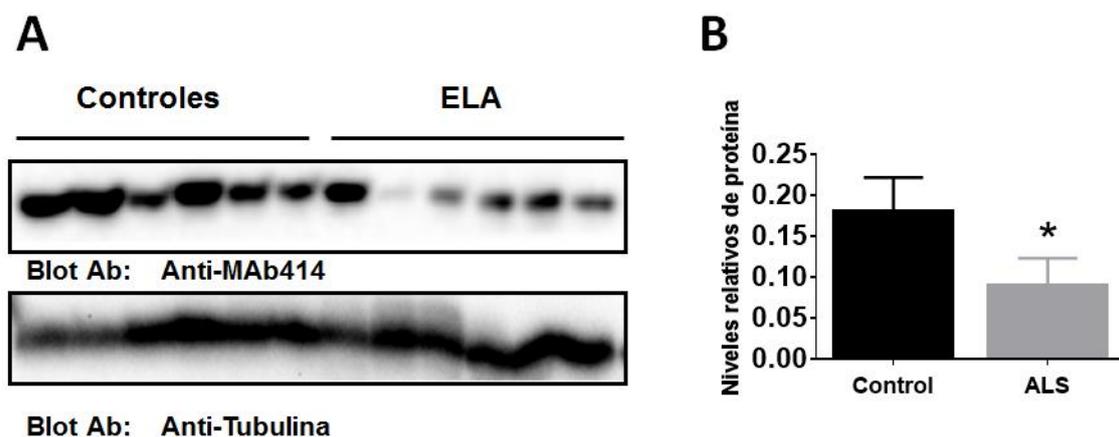


Figura 11. La ELA se asocia a una reducción en los niveles de nucleoporinas en muestras de médula espinal. Homogenados de médula espinal extraídas *post mortem*, se analizaron mediante *western blot* utilizando el anticuerpo MAb414. A: Imagen representativa de inmunoreactividad de los homogenados. Se muestra la inmunoreactividad a anti-tubulina como control de carga proteica en la parte inferior. B: Valores promedios de inmunoreactividad de la imagen anterior tras análisis densitométrico. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de las nucleoporinas examinadas, ajustadas por la carga proteica, con el error típico como indicador de desviación. \* indica diferencias significativas entre muestras de los pacientes con ELA respecto a los controles.  $p < 0,05$ . Prueba t de Student.

Pese a que típicamente las FG-NUP inmunoreactivas se distribuyen en cuatro poblaciones de pesos moleculares diferentes (358, 214, 153 y 62 kDa) (Yoshimura et al. 2013), nuestros resultados muestran una única banda inmunoreactiva a 62 kDa acorde a lo esperado, según las especificaciones del anticuerpo empleado (Abcam, 24609). El análisis de los resultados muestra una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de las FG-NUP inmunoreactivas a MAb414 en las muestras pertenecientes a las médulas espinales de pacientes de ELA evaluados, con respecto a los controles. Esta disminución alcanza aproximadamente un 58%, atendiendo a la inmunoreactividad.

### **Inmunofluorescencia de núcleos aislados**

Teniendo en cuenta que las NUPs se localizan embebidas en la membrana nuclear, se determinaron los niveles de miembros representativos de las FG-NUP en núcleos aislados de médula espinal extraídas *post mortem* mediante inmunofluorescencia indirecta. La inmunodetección se realizó mediante el anticuerpo monoclonal MAb414 que reconoce epítetos compartidos por las FG-NUP (figura 12 A). Para la cuantificación de las imágenes se utilizó el programa de código abierto CellProfiler (Carpenter et al. 2006), el cual permite el análisis automático y simultáneo de las imágenes, como se detalla en la sección de Microscopía de Materiales y Métodos.

El análisis de los resultados muestra una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de las FG-NUP inmunoreactivas a MAb414 en núcleos aislados de médulas espinales de pacientes de ELA, con respecto a los controles. Esta disminución alcanza aproximadamente un 85 % atendiendo a la intensidad de la fluorescencia (figura 12 B).

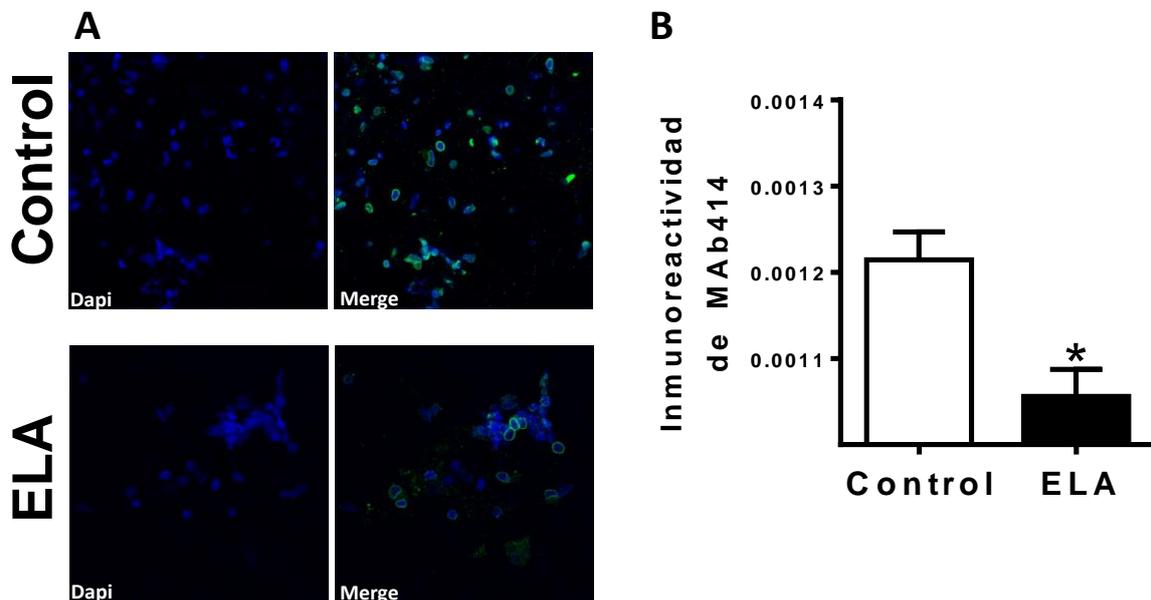


Figura 12. La ELA se asocia a una reducción en los niveles de nucleoporinas en núcleos aislados de médula espinal. Núcleos de médula espinal extraídas *post mortem*, se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo MAb414. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (20x) de MAb414. B: Valores promedios de la inmunoreactividad por núcleo de la imagen anterior, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de las NUPs examinadas, ajustadas por el área nuclear, con el error típico como indicador de desviación. \* indica diferencias significativas entre muestras de los pacientes con ELA respecto a los controles.  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

Tomando en consideración que la corteza cerebral es una de las regiones afectadas en la ELA, se determinaron los niveles de miembros representativos de las FG-NUP en núcleos aislados de corteza cerebral extraídas *post mortem* mediante inmunofluorescencia indirecta (figura 13). La inmunodetección se realizó mediante el anticuerpo monoclonal MAb414 que reconoce epítetos compartidos por las FG-NUP. Además, para discriminar entre poblaciones neuronales y no neuronales (glia), se determinaron los niveles representativos de la proteína Tubulina beta-III (TubIII) mediante inmunofluorescencia indirecta. Para este fin se utilizó el anticuerpo monoclonal Anti-TubIII.

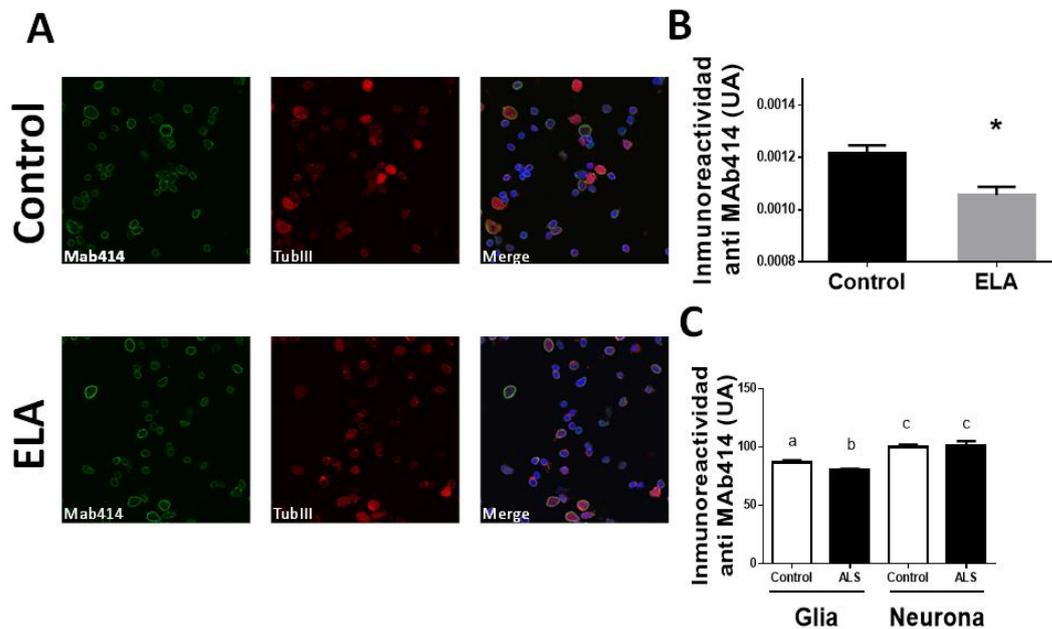


Figura 13. La ELA se asocia a una reducción en los niveles de nucleoporinas en núcleos aislados de corteza frontal. Núcleos de corteza frontal extraídas *post mortem*, se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo MAb414 y TubIII. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (20x) de MAb414 y TubIII. B: Valores promedios de la inmunoreactividad por núcleo de la imagen anterior de MAb414, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de las NUPs examinadas, ajustadas por el área nuclear, con el error típico como indicador de desviación. C: Valores promedios de la inmunoreactividad por núcleo de la imagen anterior de MAb414, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Para la discriminación entre neurona y glia se tomó en cuenta la inmunoreactividad intranuclear de TUBIII. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de las NUPs examinadas, ajustadas por el área nuclear, con el error típico como indicador de desviación. Letras diferentes significa diferencias significativas entre los pacientes con ELA respecto a los controles y entre población neuronal y glia,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

La observación de los resultados no muestra diferencias significativa en los niveles de las FG-NUP en los núcleos aislados de corteza cerebral de pacientes de ELA, con respecto a los controles, aunque la tendencia es a la disminución en el grupo de ELA (figura 13 B). Al diferenciar entre población de núcleos neuronales y gliales, tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de las FG-NUP, asociadas a los núcleos de las neuronas de los pacientes con ELA, con respecto a los controles (figura 13 C). Sin embargo en los núcleos gliales, los niveles de las FG-NUP se observaron disminuidos en el

grupo de ELA respecto a los controles. De igual manera, el análisis de los resultados muestra una disminución significativa de los niveles totales de FG-NUP asociados a la glia, respecto a aquellos asociados a las neuronas (figura 13 C).

### Citometría de núcleos aislados

Posteriormente se determinaron los niveles de las FG-NUP y de algunas NUPs específicas, como es el caso de NUP93 y NUP107, en núcleos aislados de corteza cerebral extraídas *post mortem*, mediante citometría de flujo directa. Para el análisis se empleó el anticuerpo anti-NUP107 conjugado con el fluoróforo *R-phycoerythrin* (RPE), el anticuerpo anti-NUP93 conjugado con el fluoróforo *Allophycocyanin* (APC) y el anticuerpo anti FG-NUP conjugado con el fluoróforo APC-Cy7.

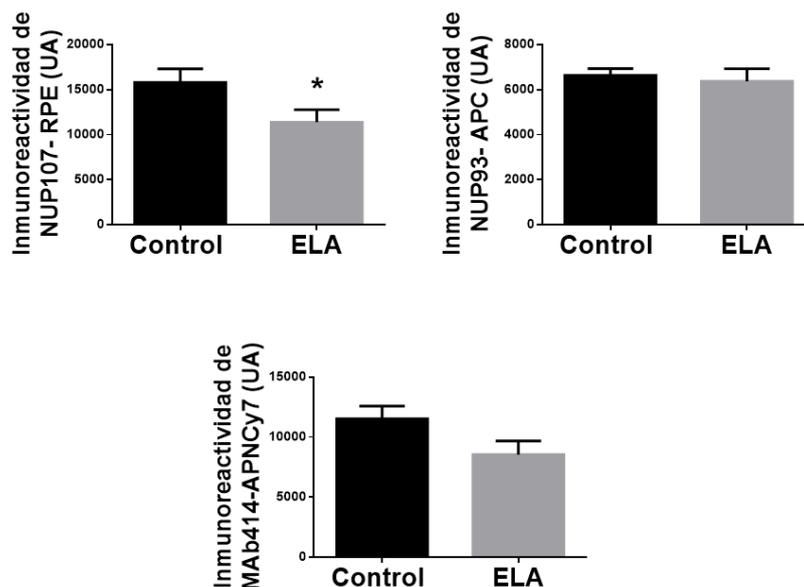


Figura 14. La ELA se asocia a una reducción específica de NUP107 en núcleos aislados de médula espinal. La ELA se asocia a una reducción específica de NUP107 en núcleos aislados de médula espinal. Núcleos de médula espinal extraídas *post mortem*, se analizaron mediante citometría de flujo directa. A: Valores promedios de la inmunoreactividad por núcleo del anticuerpo NUP107 conjugado con el fluoróforo RPE. B: Valores promedios de la inmunoreactividad por núcleo del anticuerpo NUP93 conjugado con el fluoróforo APC. C: Valores promedios de la inmunoreactividad por núcleo del anticuerpo MAb414 conjugado con el fluoróforo APN-Cy7. Se muestra el valor de la mediana con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre núcleos control y núcleos de ELA,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

El análisis de los resultados por citometría de flujo muestra una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de NUP107, de los núcleos extraídos de tejido de pacientes de ELA, respecto a los núcleos extraídos de sujetos controles. En relación a NUP93 y a FG-NUP reactivas a MAb414, no se encontraron diferencias significativas, apreciándose en este último, una tendencia a la disminución de las FG-NUP de los núcleos extraídos de los pacientes de ELA en comparación de los controles (figura 14).

### **3.2. Lipidómica de núcleos aislados de médula espinal de pacientes de ELA**

Como se ha comentado anteriormente el NPC se encuentra embebido en la envoltura nuclear, la cual está formada por una doble bicapa lipídica conectando el núcleo con el citoplasma (Cook et al. 2007; Raices and D'Angelo 2017). Cualquier cambio en la composición lipídica y por ende en la fluidez de la membrana, podría tener impacto en la estructura y localización del NPC (Kosako and Imamoto 2010), dando como resultado una desregulación del transporte nucleocitoplasmático. Para determinar si la ELA se asocia a cambios en la composición lipídica de núcleos aislados, se determinaron los perfiles lipídicos de núcleos provenientes de médula espinal extraídas *post mortem*, mediante una técnica de lipidómica no dirigida.

En la figura 15 se muestran dos herramientas de enfoque no selectivo, (mapa de calor y PCA) en las cuales se seleccionan las características moleculares que están presentes en al menos el 50% de las muestras del mismo grupo. En ambas observaciones se definen y se separan perfectamente los grupos experimentales, lo cual indica que la enfermedad influye sobre los perfiles moleculares de los lípidos nucleares. Además, a través de un análisis estadístico univariante se detectaron cerca de 40 lípidos diferenciales, entre los núcleos del grupo control y el grupo de ELA, donde destacan varios diacilgliceroles, triglicéridos y fosfatidiletanolaminas, entre otros.

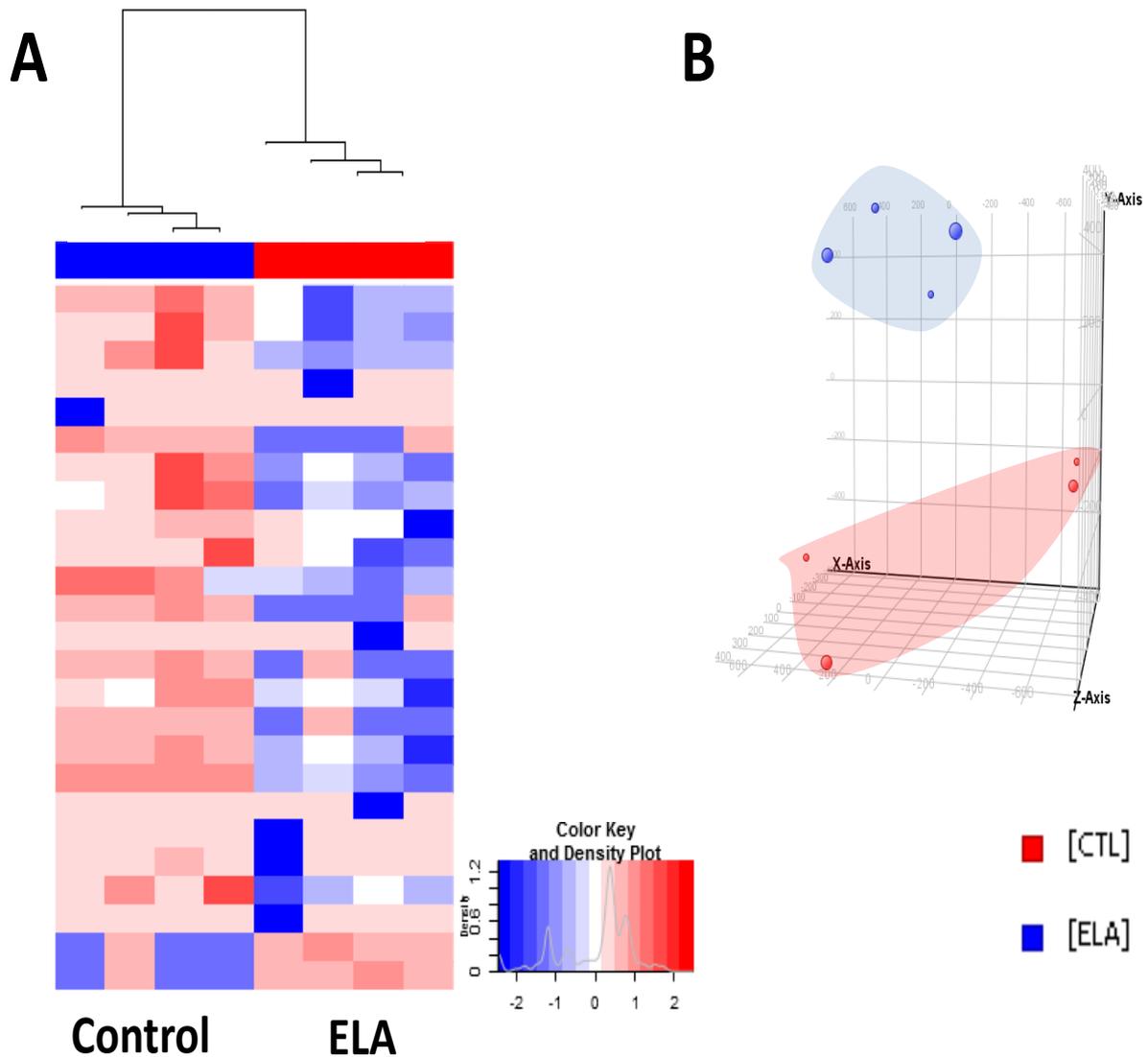


Figura 15. Los núcleos aislados extraídos de médula espinal *post mortem* de pacientes de ELA, presentan un perfil lipídico diferencial respecto a los controles. A: Representación de la agrupación jerárquica de las 25 especies lipídicas más significativas de núcleos aislados extraídos de médula espinal *post mortem*, de pacientes de ELA y controles. Cada línea del gráfico representa una masa precisa ordenada por el tiempo de retención, coloreada por su intensidad de abundancia y normalizada con estándar interno. La escala de -2 (azul) a 2 (rojo) representa esta abundancia normalizada en unidades arbitrarias.  $n=4$ ,  $p < 0,05$ . Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. B: Gráfica tridimensional del análisis de componentes principales (PCA) que demuestra la diferenciación de los perfiles lipídicos de núcleos aislados, extraídos de médula espinal *post mortem* de pacientes de ELA y controles.  $n=4$ ,  $p < 0,05$ . T de student.

Tabla 8. Especies lipídicas diferenciales de núcleos aislados de médula espinal extraído *post mortem* de pacientes de ELA y control. n= 4, p<0,05. T de student.

Compuesto	p	Regulación (ELA vs CTL)
CE(24:0)/DG(46:3)	0,027414	down
Cer(46:0)	0,007346	up
Cer(d18:0/h17:0)	0,027563	down
Cerebroside C/PE(O-38:4)/PE(P-38:3)/PE(38:3)/PC(O-35:4)	0,011598	up
DG(17:0/17:2(9Z,12Z)/0:0)[iso2]	0,017499	down
DG(17:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)[iso2]/PA(O-32:0)	0,007198	up
DG(18:0/14:0/0:0)	0,023379	down
DG(35:1)	0,025619	up
DG(36:0)	0,001003	up
DG(36:2)	0,010411	down
DG(38:0)	0,002498	up
DG(39:6)	0,034444	up
GlcCer(d18:0/24:0)/PC(39:1)/PE(O:42:2)/PE(P-42:1)/PE(42:1)	0,029046	down
Glucosylceramide (d18:1/24:0)/PC(38:1)/PE(41:1)	0,026204	down
LacCer(d18:0/16:0)/PC(42:5)/Ins-1-P-Cer(40:1)/C22 Sulfatide	0,025398	up
PA(18:0)	0,024149	down
PA(O-18:0/18:3(9Z,12Z,15Z))/PG(O-29:0)	0,043124	down
PA(O-32:0)	0,024342	up
PA(P-16:0/21:0)/PG(32:0)/PA(38:5)	0,018452	up
PA(P-18:0/17:1(9Z))	0,018294	up
PC(O-24:0)	0,0235	up
PE(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))/PI(31:1)	5,35E-05	up
PE(O-18:0/19:1(9Z))/Cerebroside B/ GlcCer(35:2)/CerP(42:2)/PC(P-33:2)/PE(P-36:2)/PE(O-36:3)	0,024172	up
PE-NMe2(18:1(9E)/18:1(9E))/PE(O-38:4)/PE(P-38:3)/PE(38:3)/PC(O-35:4)	4,76E-04	up
PG(16:0/17:2(9Z,12Z))	0,025597	up
PG(38:0)/TG(48/8)/PG(O-38:1)/PG(P-38:0)	0,025968	up
PG(P-37:1)/PG(O-37:2)	0,022001	up
PG(P-40:2)/PG(O-40:3)	0,027358	down
PI(O-20:0/12:0)/PC(37:4)/PE(40:4)/PS(P-38:4)/PS(O-38:5)	0,01172	up
PS(17:0/22:1(11Z))/PS(O-40:1)/PS(P-40:0)	0,015925	down
PS(P-38:4)/PS(O-38:5)	0,025977	up
TG(16:0/14:0/16:1(9Z))[iso6]	0,029092	down
TG(16:0/16:1(9Z)/16:1(9Z))[iso3]	0,028442	down
TG(16:1(9Z)/17:1(9Z)/17:1(9Z))[iso3]/PG(41:0)	0,027652	down
TG(16:1(9Z)/18:0/20:2(11Z,14Z))[iso6]	0,01669	up
TG(18:2(9Z,12Z)/20:1(11Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))[iso6]	0,019288	down
TG(21:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))[iso3]	0,001038	up
TG(43:3)/PE-Cer(39:1)/SM(36:1)/PA(P-39:0)/PA(O-39:1)	0,027467	down
TG(50:0)	0,027069	up
TG(59:9)	0,00401	up
TG(65:2)	0,001892	up

### **3.3. Estrés oxidativo en núcleos de médula espinal de pacientes de ELA**

Teniendo en cuenta que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos implicados en la patología de la ELA y además, puede dañar estructuralmente a las nucleoporinas, como se ha comentado en la sección Nucleoporinas; se analizaron los niveles de 8OHdg, el cual es un marcador de daño oxidativo a ácidos nucleicos (Syslová et al. 2014). La determinación fue realizada en núcleos aislados de corteza cerebral extraídas *post mortem* mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-8OHdg. El anticuerpo anti-NeuN se utilizó para diferenciar entre neuronas y células gliales, al reconocer a la proteína NeuN (figura 16 A) la cual es un reconocido marcador nuclear de neuronas (Gusel'nikova and Korzhevskiy 2015).

El análisis de inmunofluorescencia muestra una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en la reactividad del marcador daño oxidativo anti-8OHdg, en los núcleos extraídos *post mortem*, de la corteza cerebral de los pacientes de ELA, con respecto a los controles (figura 16 A). Sin embargo, al discriminar entre neuronas y glia mediante la reactividad intranuclear de NeuN, se observa un aumento significativo de la inmunoreactividad de 8OHdg en los núcleos neuronales en relación con los núcleos de las células gliales, tanto en el grupo control (38 %) como en los núcleos extraídos de tejido *post mortem* de pacientes de ELA (117 %).

### **3.4. Nucleoporinas en modelo de ratón de ELA familiar.**

Los ratones transgénicos que expresan formas mutadas de SOD1, desarrollan neurodegeneración en las motoneuronas y síntomas clínicos similares a los observados en pacientes con ELA. El estudio en estos modelos animales proporciona a los investigadores una mayor comprensión de la fisiopatología de la ELA. Uno de los modelos animales de la ELA más utilizados, son los ratones que expresan múltiples copias de la forma mutada humana del gen humano SOD1 (hSODG93A) (Gurney et al. 1994).

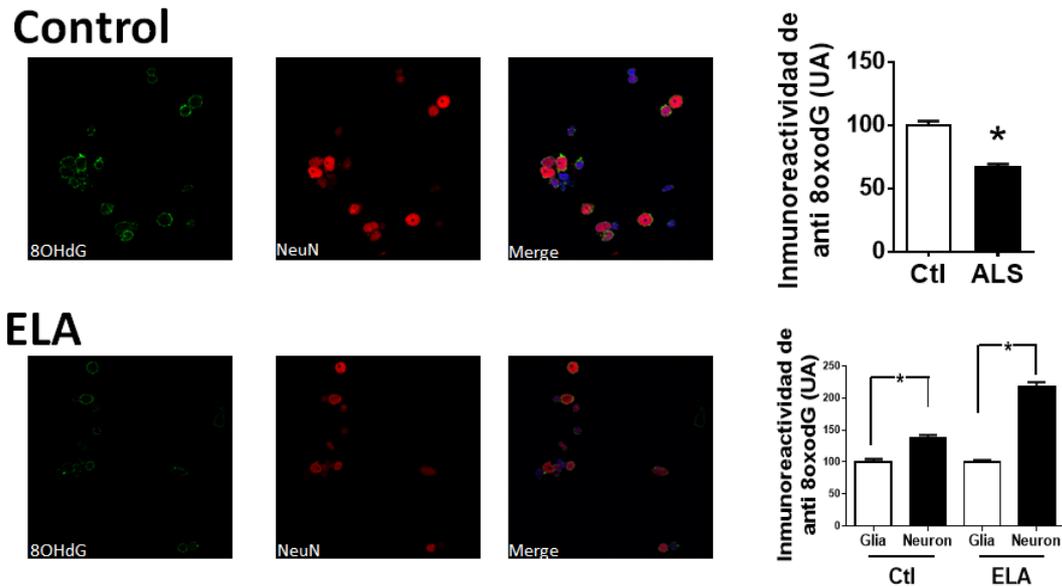


Figura 16. La ELA se asocia a un aumento del estrés oxidativo en los núcleos aislados de neuronas de médula espinal. Núcleos de corteza frontal extraídas post mortem, se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-8OHdg y antiNeuN. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (20x) de 8OHdg y NeuN. B: Valores promedio de la inmunoreactividad por núcleo de la imagen anterior, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de la 8OHdg examinadas, ajustadas por el área nuclear, con el error típico como indicador de desviación. \* indica diferencias significativas entre núcleos neuronales y núcleos,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

En este modelo animal se ha constatado desregulación del transporte nucleocitosólico por deficiencias de carioferinas, en médulas espinales de ratones transgénicos (Zhang et al. 2006). Para determinar si la neurodegeneración se asocia a cambios en la cantidad de NUPs que puedan contribuir a alteraciones en el transporte nucleocitosólico en este modelo; se determinaron los niveles de miembros representativos de las algunas NUPs en homogenados de médula espinal extraídas *post mortem* mediante *western blot*, previa separación en gel de acrilamida e inmunodetección. Las determinaciones se realizaron durante varios estadios de la enfermedad del ratón: estadio presintomático (60 días), inicio de los signos clínicos (90 días) y punto final de la enfermedad (120 días). Además, el estudio se llevó a cabo en ratones hembras y machos en vistas a observar posibles diferencias relacionados con el sexo, propias de la enfermedad de ELA (Cacabelos et al. 2016b).

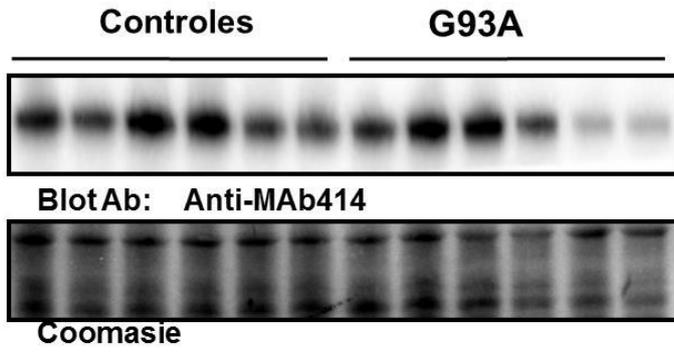
### Estadio presintomático

La figura 17 muestra la determinación de las FG-NUP inmunoreactivas al anticuerpo MAb414, en homogenados de médulas lumbares de ratones SODG93A a 60 días de edad en hembras (figura 17 A) y machos (figura 17 B). A esta edad, los ratones no tienen síntomas clínicos. El análisis de las FG-NUP determinadas en homogenados de ratones controles y aquellas provenientes de los animales modelos de la enfermedad, no muestran diferencias significativas en hembras (figura 17 C) ni en machos (figura 17 B) a los 60 días de edad. Sin embargo, el análisis por dos vías (figura 17 E), demuestra que el género es un factor relevante ( $p < 0.04$ ), indicando un incremento en las hembras (explicando el 16% de la variación de valores), y que la presencia del transgén podría influir, a la baja, la cantidad de motivos FG-NUP ( $p = 0,08$ , explicando el 11% de la variación de valores).

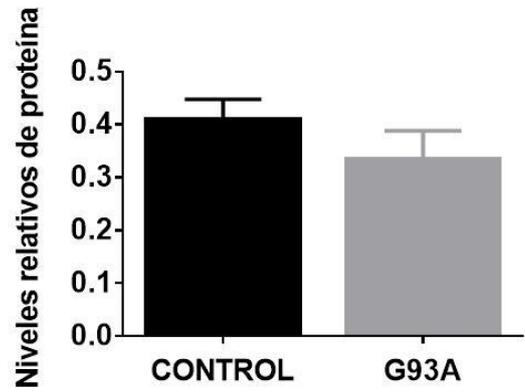
La nucleoporina NUP93, la cual es una proteína estructural que participa activamente en el ensamblaje y mantenimiento del poro nuclear y en el transporte nucleocitoplasmático (Vollmer and Antonin 2014), también fue determinada mediante *western blot* en las médulas de ratones hembras (figura 18 A) y machos (figura 18 B) a la edad de 60 días. En este periodo presintomático de la enfermedad, el análisis de los niveles de NUP93 muestra un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) aproximadamente en un 30 %, en las ratonas transgénicas, en comparación con las ratonas controles (figura 18 C). El análisis de esta proteína en ratones (machos) a esta edad, no muestra diferencias significativas entre los controles y los ratones SODG93A (figura 18 D).

Figura 17. La presencia del transgén hSODG93A no induce una desregulación en MAb414 en médula espinal murina en estadios presintomáticos. Homogenados de médula espinal de ratones hSODG93A de 60 días de edad, se analizaron mediante inmunodetección, utilizando un anticuerpo MAb414. A: Imagen representativa de la inmunoreactividad de los homogenados de ratonas. En la parte inferior se muestra la tinción de Coomassie como control de carga proteica. B: Imagen representativa de inmunoreactividad de los homogenados de ratones. En la parte inferior se muestra la tinción de Coomassie como control de carga proteica. Valores promedios de inmunoreactividad en hembras (C) y machos (D) de las imágenes anteriores, tras análisis densitométrico. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de las FG-NUP, ajustado por la carga proteica, con el error típico como medida de dispersión, en ratones G93A ( $n=6$ ), prueba t de Student. E: Análisis de la influencia del género y el transgén sobre la reactividad de FG-NUP mediante Anova de 2 vías. \* indica diferencias significativas en cuanto al género ( $p < 0.04$ ) entre las muestras de ratones SODG93A ( $n=6$ ).

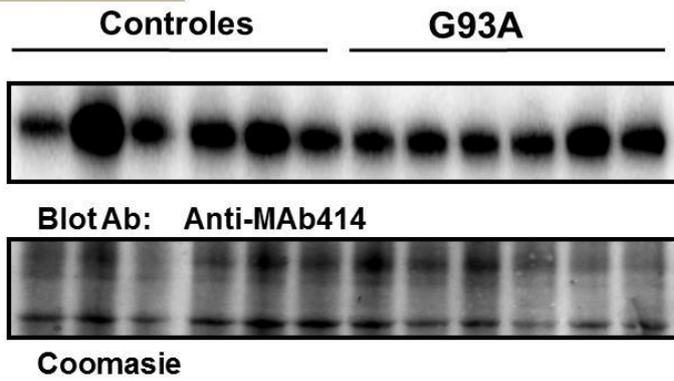
**A**  
**Hembras**



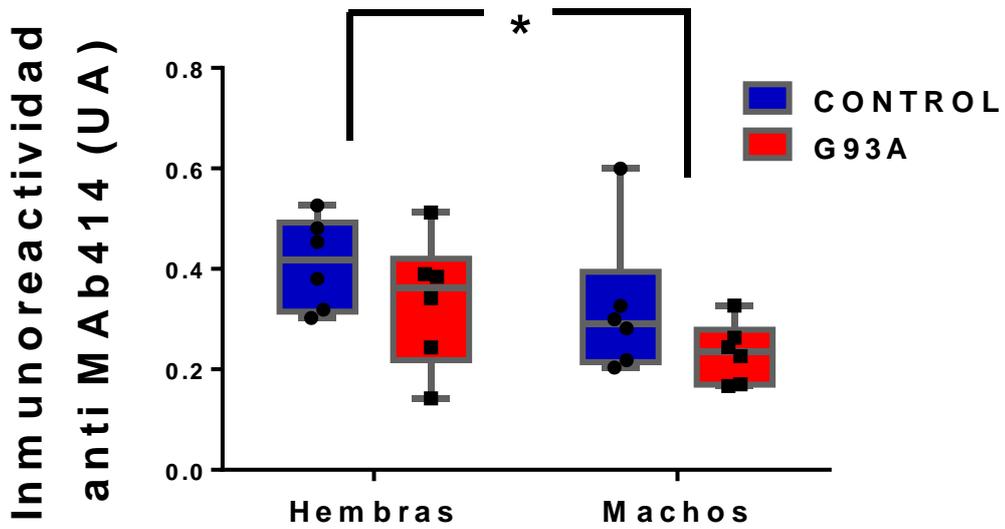
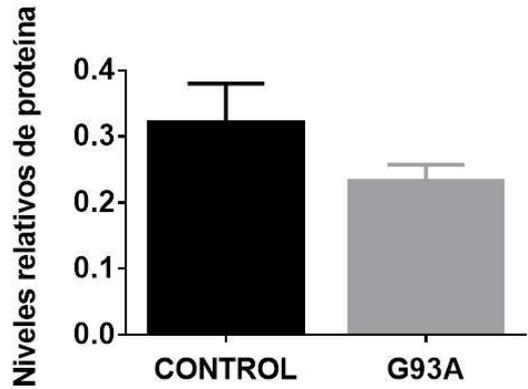
**C**



**B**  
**Machos**



**D**



## Estadio sintomático

Aproximadamente a los 90-100 días de edad, los ratones SODG93A empiezan con signos y síntomas clínicos propios de la enfermedad. Estos se caracterizan principalmente por temblores y debilidad en las extremidades traseras, seguidos por una parálisis progresiva (Shibata 2008). Por lo tanto, se decidió evaluar el nivel de algunas NUPs en ratones a los 100 días de edad, mediante *western blot* en homogenados de médula espinal extraídas *post mortem*.

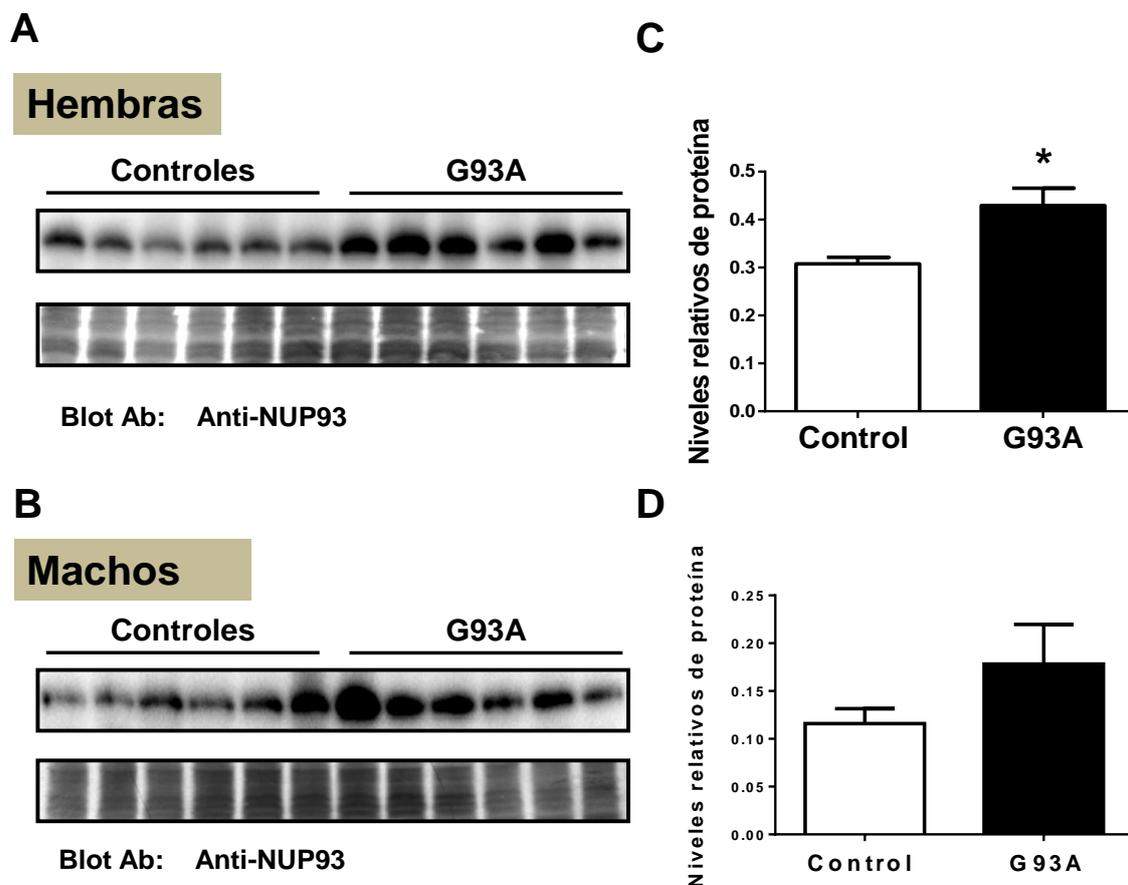
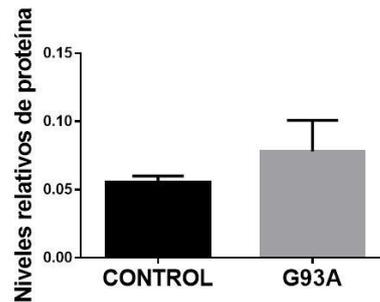
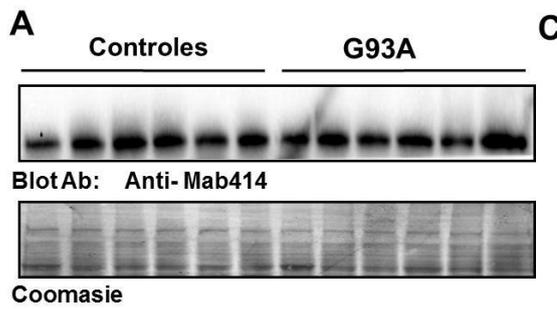


Figura 18. La presencia del transgén hSODG93A induce una desregulación dependiente de género en NUP93 en médula espinal murina a estadios presintomáticos. Homogenados de médula espinal de ratones hSODG93A de 60 días de edad, se analizaron mediante inmunodetección, utilizando un anticuerpo anti-NUP93. A: Imagen representativa de la inmunoreactividad de los homogenados en ratonas. En la parte inferior se muestra la tinción de Coomassie como control de carga proteica. B: Imagen representativa de inmunoreactividad de los homogenados en ratones. En la parte inferior se muestra la tinción de Coomassie como control de carga proteica. C: Cuantificación de los valores promedios de inmunoreactividad en hembras y D: en machos, de las imágenes anteriores tras análisis densitométrico. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de la nucleoporinas ajustado por la carga proteica, con el error típico como medida de dispersión. \* indica diferencias significativas entre las muestras de ratones SODG93A (n=7), respecto a los controles,  $p < 0,05$ . Prueba t de Student.

### Hembras



### Machos

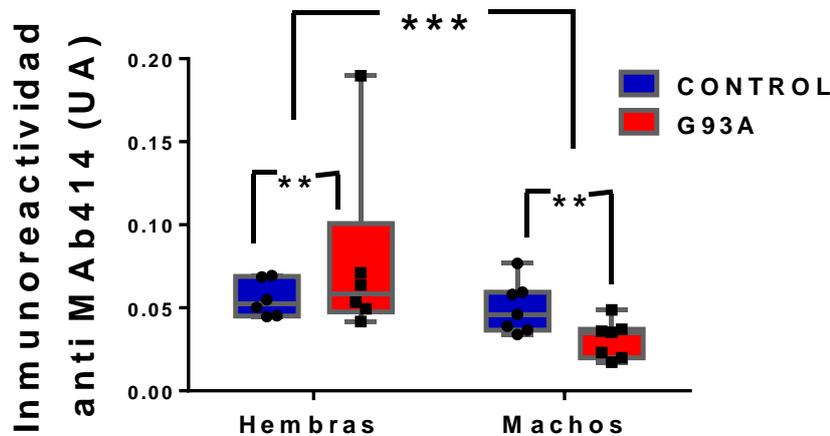
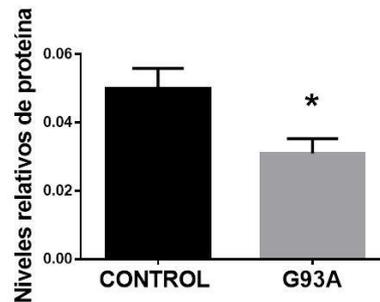
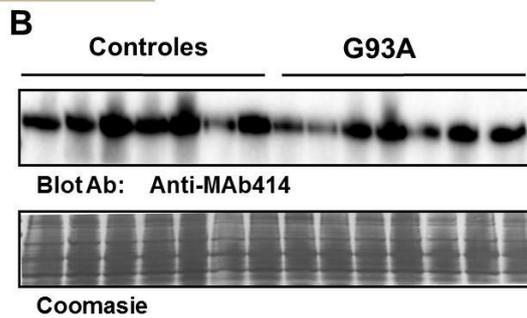


Figura 19. La presencia del transgén hSODG93A induce una depleción dependiente de género en MAb414 en médula espinal murina. Homogenados de médula espinal de ratones hSODG93A de 100 días de edad, se analizaron mediante inmunodetección, utilizando un anticuerpo MAb414. A: Imagen representativa de la inmunoreactividad de los homogenados en ratonas. En la parte inferior se muestra la tinción de Coomassie como control de carga proteica. B: Imagen representativa de inmunoreactividad de los homogenados en ratones. En la parte inferior se muestra la tinción de Coomassie como control de carga proteica. Valores promedios de inmunoreactividad en hembras (C) y machos (D) de las imágenes anteriores, tras análisis densitométrico. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de las FG-NUP ajustado por la carga proteica, con el error típico como medida de dispersión. \* indica diferencias significativas entre las muestras de ratones SODG93A (n=7), respecto a los controles,  $p < 0,05$ . Prueba t de Student. E: Análisis de la influencia del género y el transgén sobre la reactividad de FG-NUP mediante Anova de 2 vías. \*\*\* indica diferencias significativas en cuanto al género ( $p < 0,04$ ) entre las muestras de ratones SODG93A (n=6).

En la figura 19 se muestran la determinación de los niveles de FG-NUP inmunoreactivas al anticuerpo MAb414 en ratones hembras (figura 19 A) y machos (figura 19 C). La evaluación de los resultados muestra una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de aproximadamente el 38 %, en las cantidades de FG-NUP de la médula espinal de los ratones SODG93A machos, con respecto a los controles (figura 19 D). Sin embargo, en las hembras no se evidencian diferencias significativas en los niveles de FG-NUP entre ratones transgénicos y controles (figura 19 C).

En la figura 19 D se representa el análisis Anova de dos vías, en el cual se manifiesta que el género es un factor relevante ( $p < 0,04$ ), indicando un incremento en las hembras (explicando el 30 % de la variación de valores) con respecto a los machos (figura 19 E).

Posteriormente se determinaron los niveles de NUP93 en ratones SODG93A hembras (figura 20 A) y machos (figura 20 B). La determinación se realizó en ratones de 100 días de edad, mediante *western blot* en homogenados de médula espinal extraídas *post mortem*. Los resultados muestran una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la proteína NUP93, en las médulas espinales de los ratones transgénicos, en comparación con los controles, tanto en ratonas (figura 20 C) como en ratones (figura 20 D). La cuantificación de la inmunoreactividad resulta en una disminución aproximada al 48 % en hembras y del 28 % en los ratones machos. Además, el análisis sobre la influencia del género y del transgén sobre la inmunoreactividad de NUP93 mediante Anova de dos vías, indica que el género es un factor relevante ( $p < 0,004$ ), indicando un incremento en las hembras (explicando el 30 % de la variación de valores) con respecto a los machos (figura 20 E).

De la misma manera, se determinaron los niveles de la nucleoporina NUP107, en los animales modelos de la enfermedad, a los 100 días de edad, mediante *western blot* en homogenados de médula espinal extraídas *post mortem*. La proteína NUP107 forma parte del subcomplejo más grande del poro nuclear, el cual está involucrado en muchas funciones celulares tales como: el transporte de macromoléculas, la transcripción y reparación del ADN (González-Aguilera and Askjaer 2012). Al igual que los casos anteriores, las

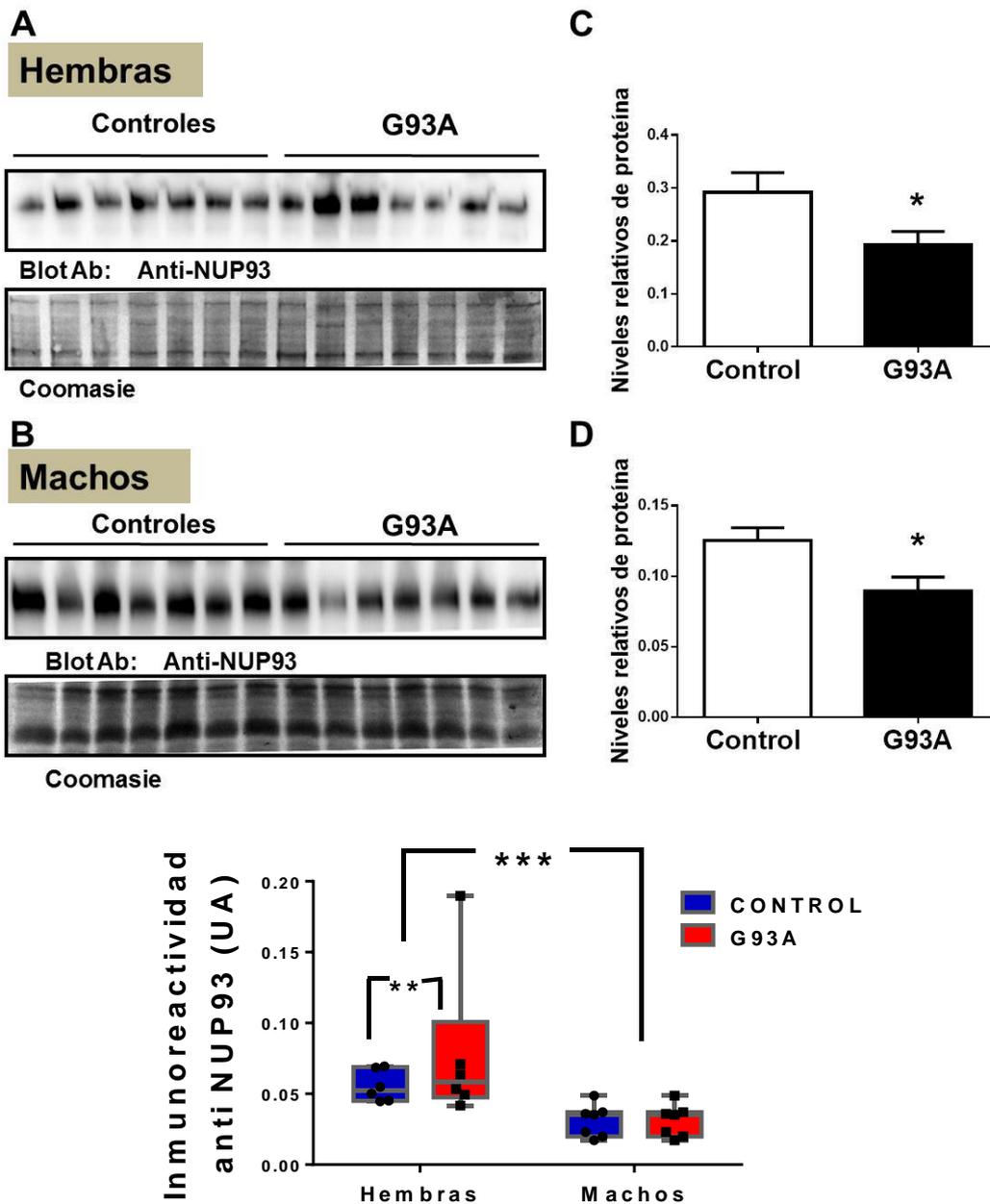


Figura 20. La presencia del transgén hSODG93A induce una depleción en NUP93 en médula espinal murina. Homogenados de médula espinal de ratones hSODG93A de 100 días de edad, se analizaron mediante inmunodetección, utilizando un anticuerpo anti-NUP93. A: Imagen representativa de la inmunoreactividad de los homogenados en ratones. En la parte inferior se muestra la tinción de Coomassie como control de carga proteica. B: Imagen representativa de inmunoreactividad de los homogenados en ratones. En la parte inferior se muestra la tinción de Coomassie como control de carga proteica. C: Cuantificación de los valores promedios de inmunoreactividad en hembras y D: en machos, de las imágenes anteriores tras análisis densitométrico. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de la nucleoporina ajustado por la carga proteica, con el error típico como medida de dispersión. \* indica diferencias significativas entre las muestras de ratones G93A (n=7), respecto a los controles,  $p < 0,05$ . Prueba t de Student. E: Análisis de la influencia del género y el transgén sobre la reactividad de NUP93 mediante Anova de 2 vías. \*\*\* indica diferencias significativas en cuanto al género ( $p < 0,005$ ). \*\* indica diferencias significativas entre las muestras de ratones SODG93A respecto a los controles (n=7),  $p < 0,05$ .

determinaciones se llevaron a cabo en ratones hembras (figura 21 A) y machos (figura 21 B). De igual manera que las proteínas evaluadas anteriormente, el análisis de Anova dos vías pone de manifiesto que el género es un factor importante ( $p < 0,0001$ ), indicando un incremento en las hembras (explicando el 86 % de la variación de valores) con respecto a los machos (figura 21 E).

El análisis de los resultados revela una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del 33 % de la proteína NUP107 en los ratones machos SODG93A, en comparación con los controles (figura 21 D). Por el contrario, en las ratonas no se obtuvieron diferencias significativas en las cantidades de NUP107 entre ratones transgénicos y controles (figura 21 C). El análisis de los resultados no muestra diferencias significativas en los niveles de proteínas de FG-NUP (figura 21 C) y de NUP107 (figura 21 D) en los ratones transgénicos, a la edad de 100 días.

#### **3.4.1. Estadio final**

Por último se determinaron los niveles de las FG-NUP (figura 22 A) y NUP107 (figura 22 B) mediante, *western blot* en homogenados de médula espinal extraídas *post mortem*. La determinación se realizó solamente en ratones machos a la edad de 160 días, que coincide con el punto final de la enfermedad.

El análisis de las FG-NUP y NUP107 no muestra diferencias significativas en los niveles de estas nucleoporinas, en los ratones controles con respecto a los ratones transgénicos a estadio terminal de la enfermedad figura 22 C y figura 22 D.

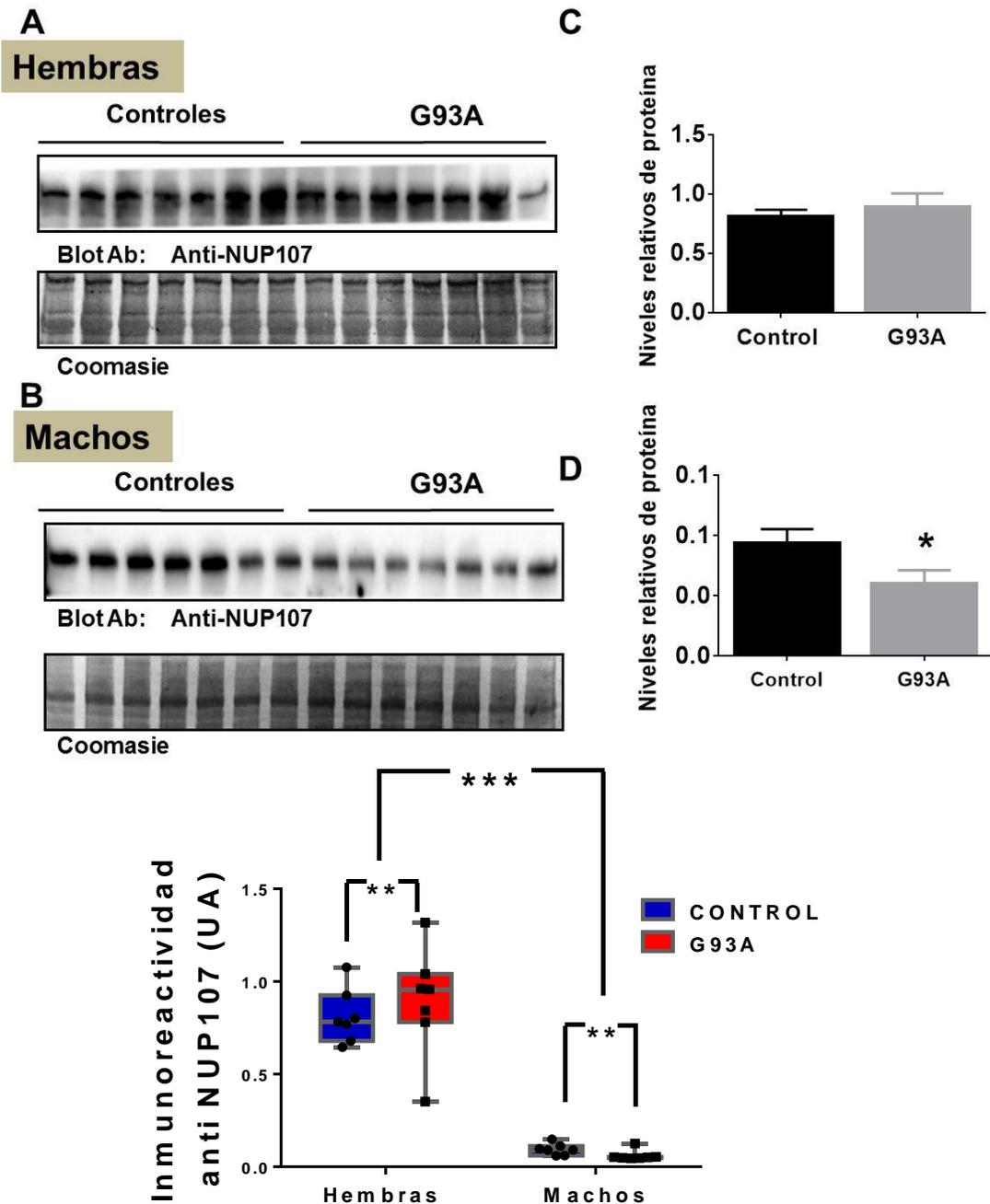


Figura 21. La presencia del transgén hSODG93A induce una depleción en NUP107 en médula espinal murina. Homogenados de médula espinal de ratones hSODG93A de 100 días de edad, se analizaron mediante *western blot* utilizando un anticuerpo anti-NUP107. A: Imagen representativa de la inmunoreactividad de los homogenados en ratonas. En la parte inferior se muestra la tinción de Coomassie como control de carga proteica. B: Imagen representativa de inmunoreactividad de los homogenados en ratones. En la parte inferior se muestra la tinción de Coomassie como control de carga proteica. C: Cuantificación de los valores promedios de inmunoreactividad en hembras y D: en machos, de las imágenes anteriores tras análisis densitométrico. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de la nucleoporinas ajustado por la carga proteica, con el error típico como medida de dispersión. \* indica diferencias significativas entre las muestras de ratones G93A (n=7), respecto a los controles,  $p < 0,05$ . Prueba t de Student. E: Análisis de la influencia del género y el transgén sobre la reactividad de NUP93 mediante Anova de 2 vías. \*\*\* indica diferencias significativas en cuanto al género ( $p < 0,005$ ). \*\* indica diferencias significativas entre las muestras de ratones SODG93A respecto a los controles (n=7),  $p < 0,05$ .

### 3.5. Silenciamiento de nucleoporinas en cultivos celulares

Para determinar si las proteínas del poro nuclear podían influir en la deslocalización de TDP-43, se silenciaron los genes *NUP107* y *NUP93* mediante la co-transfección estable de los plásmido comerciales NUP107 CRISPR/Cas9 KO (sc-405252) y NUP107 HDR (sc-405252) (a partir de ahora: CRISPR-NUP107), específico para *NUP107* y los plásmidos NUP93 CRISPR/Cas9 KO (sc-402116) y NUP93 HDR (sc-402116) (a partir de ahora: CRISPR-NUP93), específico para NUP93, en cultivo de células HEK-293.

El silenciamiento de cada gen se comprobó por *western blot* y la localización y los niveles relativos de TDP-43 se determinaron mediante inmunofluorescencia indirecta.

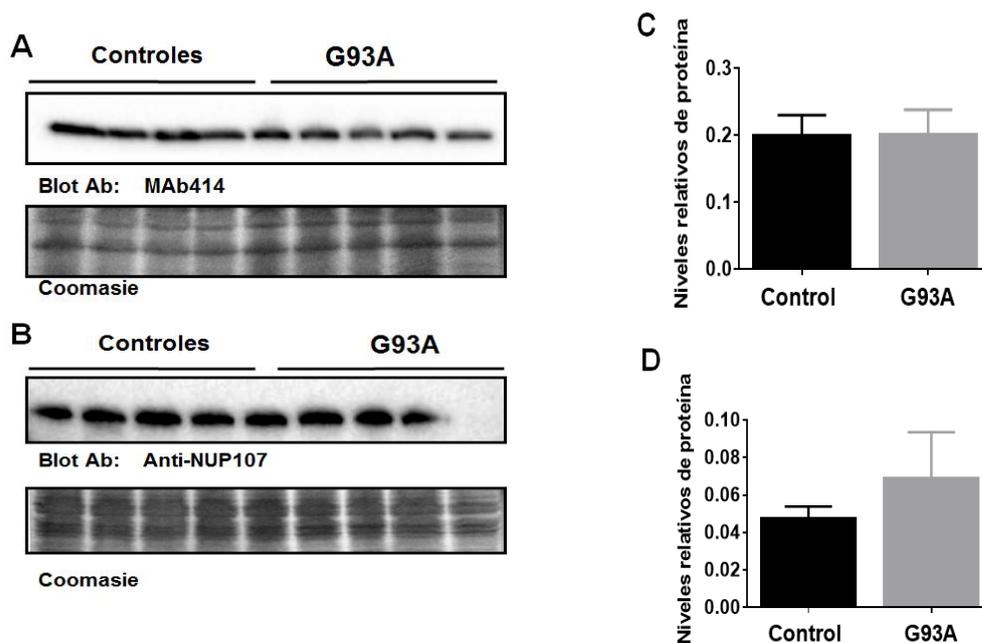


Figura 22. La presencia del transgén hSODG93A no induce una depleción de nucleoporinas en médula espinal murina a estadios finales. La presencia del transgén hSODG93A no induce una depleción de nucleoporinas en médula espinal murina a estadios finales. Homogenados de médula espinal de ratones hSODG93A de 160 días de edad, se analizaron mediante inmunodetección utilizando un anticuerpo (A) MAb414 y (B) anti-NUP107. Se muestran las imágenes representativas de la inmunoreactividad de los homogenados. En la parte inferior se muestra la tinción de Coomassie como control de carga proteica. Cuantificación de los valores promedios de inmunoreactividad de C: MAb414 y D: NUP107, tras análisis densitométrico. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de las nucleoporinas ajustado por la carga proteica, con el error típico como medida de dispersión. \* indica diferencias significativas entre las muestras de ratones G93A (n=4), respecto a los controles,  $p < 0,05$ . Prueba t de Student.

La transfección de la mezcla de plásmidos CRISPR-NUP107 provocó una disminución de la proteína NUP107 en células HEK-293, además de provocar la aparición de una banda reactiva de menor peso molecular (figura 23 A). Sin embargo, la transfección de CRISPR-NUP93 no indujo una disminución de los niveles de la proteína NUP93, a pesar de comprobar bajo varias condiciones de transfección (figura 23 B).

Por otro lado, se detectaron los niveles de otras NUPs bajo el silenciamiento de NUP107 mediante *western blot*. Bajo nuestras condiciones experimentales la disminución de los niveles NUP107 indujo el incremento de las proteínas NUP153 y NUP93 (figura 24).<sup>1</sup>

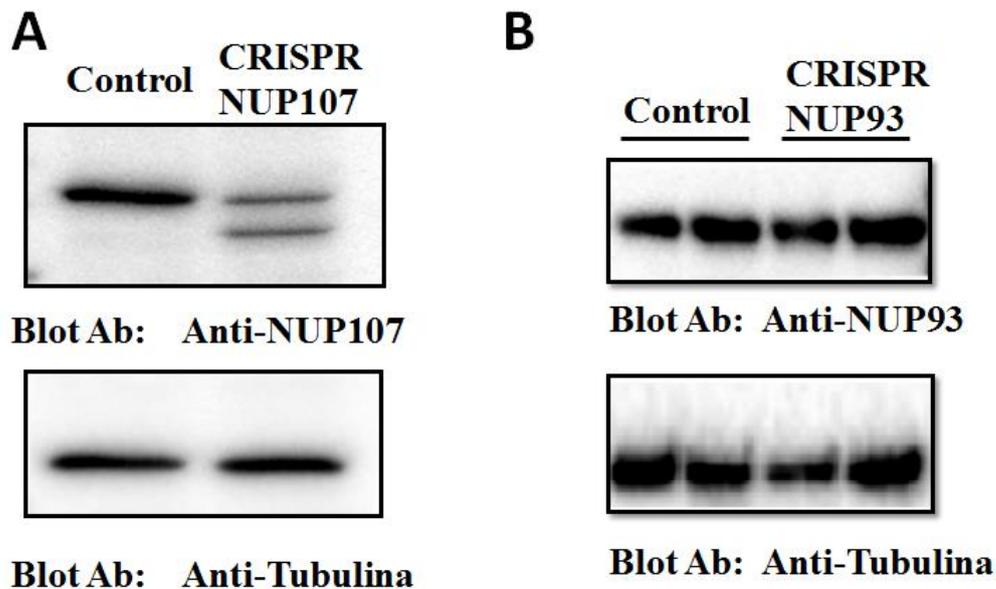


Figura 23. Silenciamiento de nucleoporinas NUP107 y NUP93. La transfección de la mezcla de plásmidos CRISPR-NUP107 en células HEK-293, provoca disminución de la proteína NUP107 y aparición de una banda reactiva a un peso molecular menor. A: Imágenes representativas de la inmunoreactividad a NUP107 en células silenciadas. En la parte inferior se muestra la inmunoreactividad de la tubulina como control de carga proteica. B: La transfección de la mezcla de plásmidos CRISPR-NUP93 en células HEK-293, ni indujo disminución en los niveles de NUP93 bajo nuestras condiciones experimentales.

## NUP107 y TDP-43

Para determinar si el silenciamiento de NUP107 podía influir en la desregulación celular de TDP-43, se detectó la proteína TDP-43 y su fosforilación mediante inmunofluorescencia indirecta. Las imágenes se analizaron mediante la utilización del programa de código abierto CellProfiler (Carpenter et al. 2006).

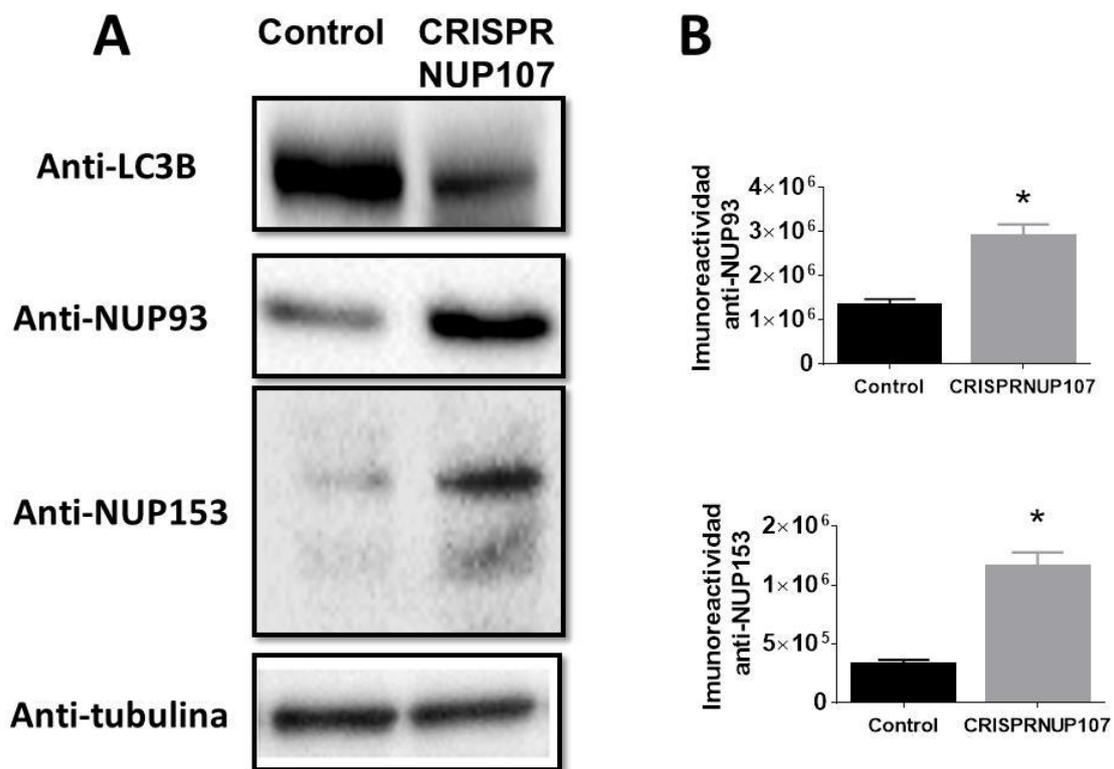


Figura 24. El silenciamiento de NUP107 provoca aumento en los niveles de NUPs. Células HEK-293 fueron silenciadas para el gen NUP107 mediante una técnica de CRISPR y se analizaron mediante inmunodetección utilizando los anticuerpos A: anti-NUP93 y anti-NUP153. En la figura se muestra el silenciamiento de NUP107 y la tubulina como control de carga proteica. B: Cuantificación de los valores promedios de inmunoreactividad de NUP93 y NUP153, tras análisis densitométrico. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de los anticuerpos ajustado por la carga proteica, con el error típico como medida de dispersión. \* indica diferencias significativas entre células control y células silenciadas para NUP107 (n=3),  $p < 0,05$ . Prueba t de Student.

El análisis de las imágenes representativas en la figura 25 A, muestra un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de más del 300 %, del TDP-43 citoplasmático en las células silenciadas para *NUP107* (figura 25 B). Curiosamente, el TDP-43 nuclear no experimentó cambios, según los datos representados en la figura

25C. Además, se analizó la fosforilación de TDP-43 (figura 25 A) como marcador de anomalía en el metabolismo de TDP-43, al ser esta una de las características típicas de la fisiopatología de la ELA como se ha comentado en el apartado de TARDBP de la sección de genética.

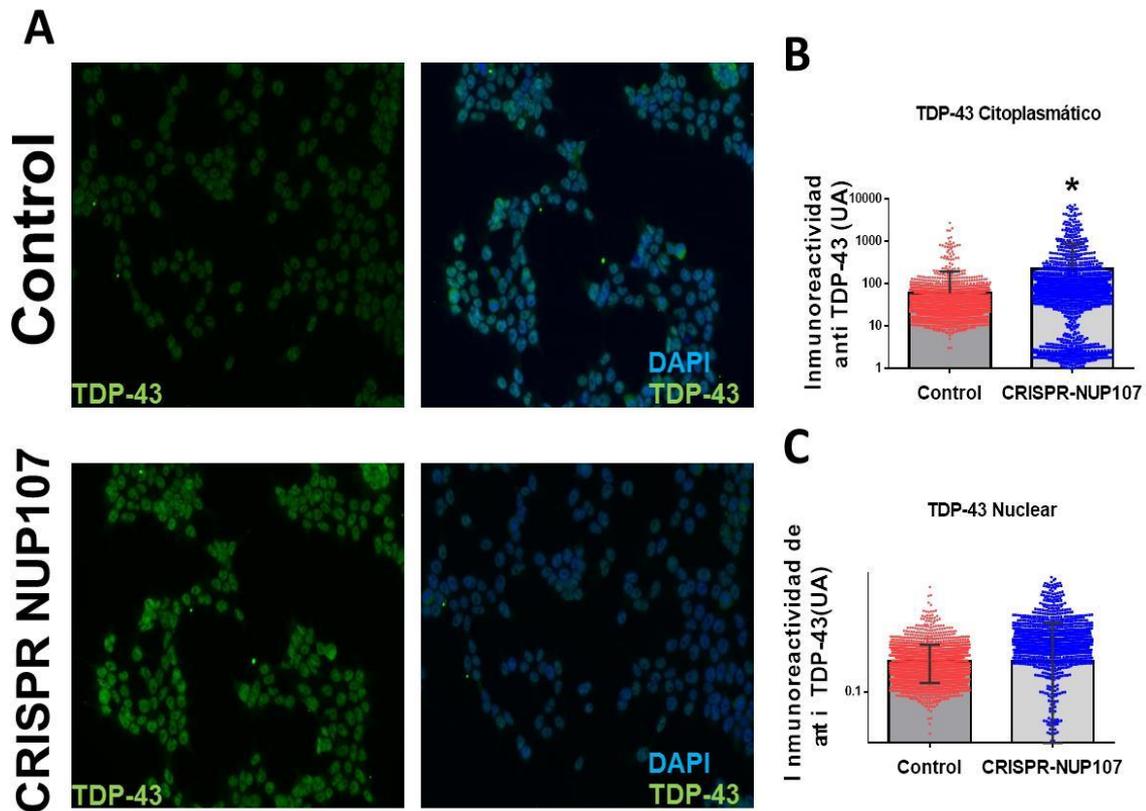


Figura 25. El silenciamiento de NUP107 provoca acumulación de TDP-43 citoplasmático in vitro. Células HEK-293 fueron silenciadas para el gen *NUP107* mediante una técnica de CRISPR y TDP-43 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (20x). B: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y células silenciadas de la fracción citosólica y C: fracción nuclear,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

Los resultados indican un ligero aumento, pero estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ), en la fosforilación de TDP-43, tanto en el compartimento citoplasmático (figura 26 B) como en el compartimento nuclear (figura 26 C). Este aumento alcanza el 12 % y el 17 % respectivamente.

### 3.5.1. NUP107 y agregados de p-TDP-43

En vista que el silenciamiento de *NUP107* provoca un aumento en el TDP-43 citoplasmático y de su fosforilación, tanto en el núcleo como en el citoplasma de células HEK-293, se procedió a estudiar la formación de agregados de TDP-43, como característica fundamental de la patología de la ELA (figura 26 A). Interesantemente el silenciamiento de *NUP107* provoca un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de los agregados de fosfoTDP-43 (p-TDP-43), en el citoplasma y en el núcleo (figura 27 B) de las células HEK-293. De igual manera, el análisis de los agregados en el compartimento celular y nuclear, muestra que estos son significativamente de mayor tamaño ( $p < 0,05$ ) en las células carentes de *NUP107*, en comparación con las células controles, en ambos compartimentos (figura 27 C).

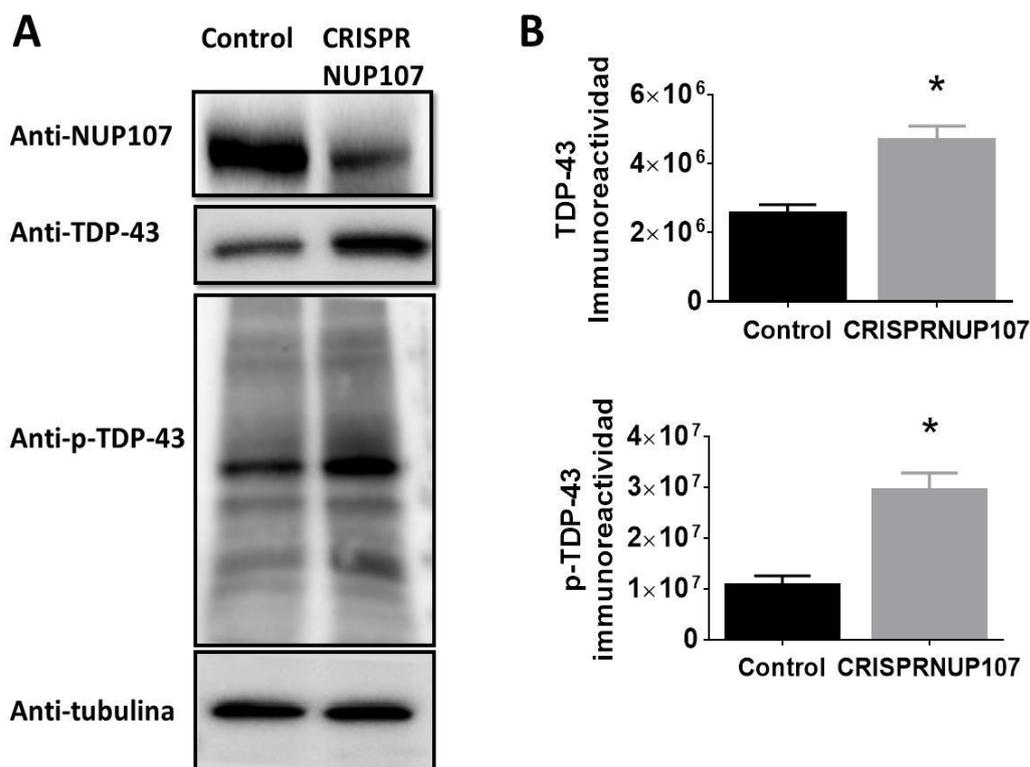


Figura 26. El silenciamiento de NUP107 provoca aumento de los niveles de p-TDP-43 in vitro. Células HEK-293 fueron silenciadas para el gen *NUP107* mediante una técnica de CRISPR y p-TDP-43 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (20x). B: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y células silenciadas de la fracción citosólica y C: Fracción nuclear,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

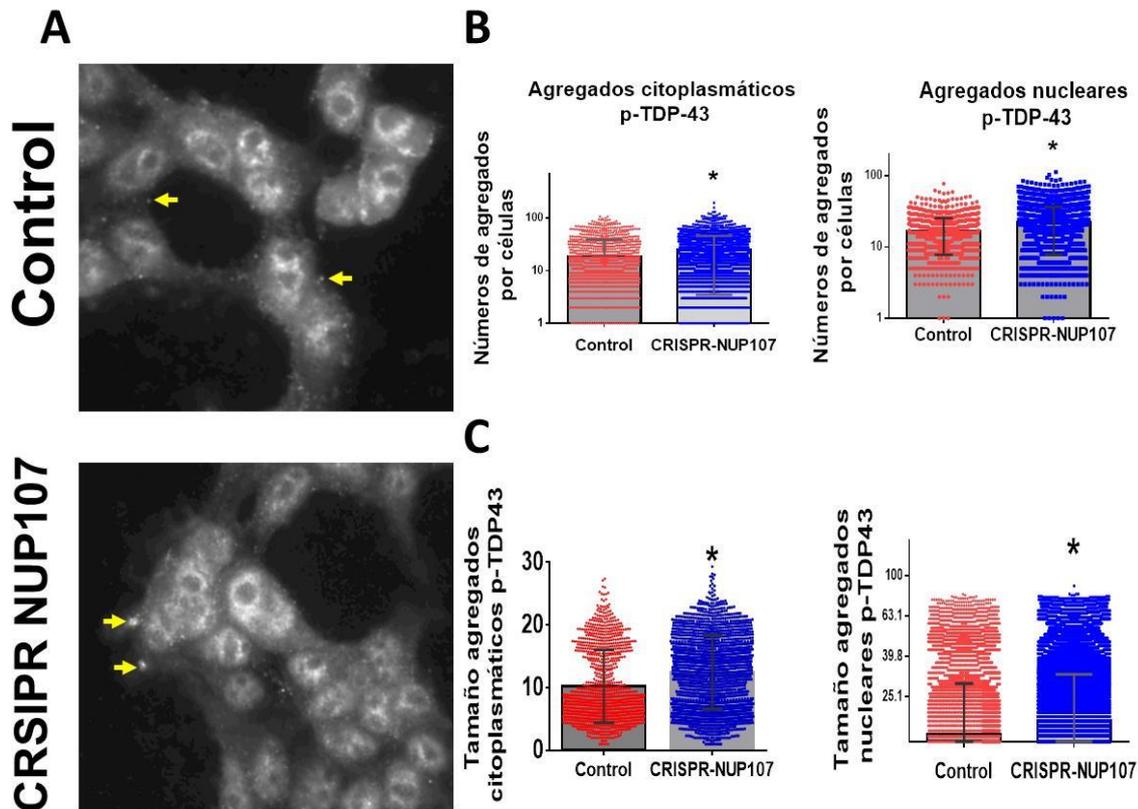


Figura 27. El silenciamiento de NUP107 provoca agregación de p-TDP-43 *in vitro*. Células HEK-293 fueron silenciadas para el gen NUP107 mediante una técnica de CRISPR y p-TDP-43 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (60x) de agregados de p-TDP-43. B: Análisis comparativo del número de agregados por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y células silenciadas de la fracción citosólica y C: Fracción nuclear,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney. D: Análisis comparativo del tamaño de agregados citoplasmáticos y E: agregados nucleares, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. \* indica diferencias significativas entre control y células silenciadas.

La desregulación de TDP-43 provocado por el silenciamiento de NUP107 se comprobó mediante *western blot*. Los resultados representados en la figura 28 indican, que las células silenciadas para NUP107 presentan incrementados los niveles de TDP-43 y de su fosforilación, comparadas con los controles (figura 28 B y figura 28 C).

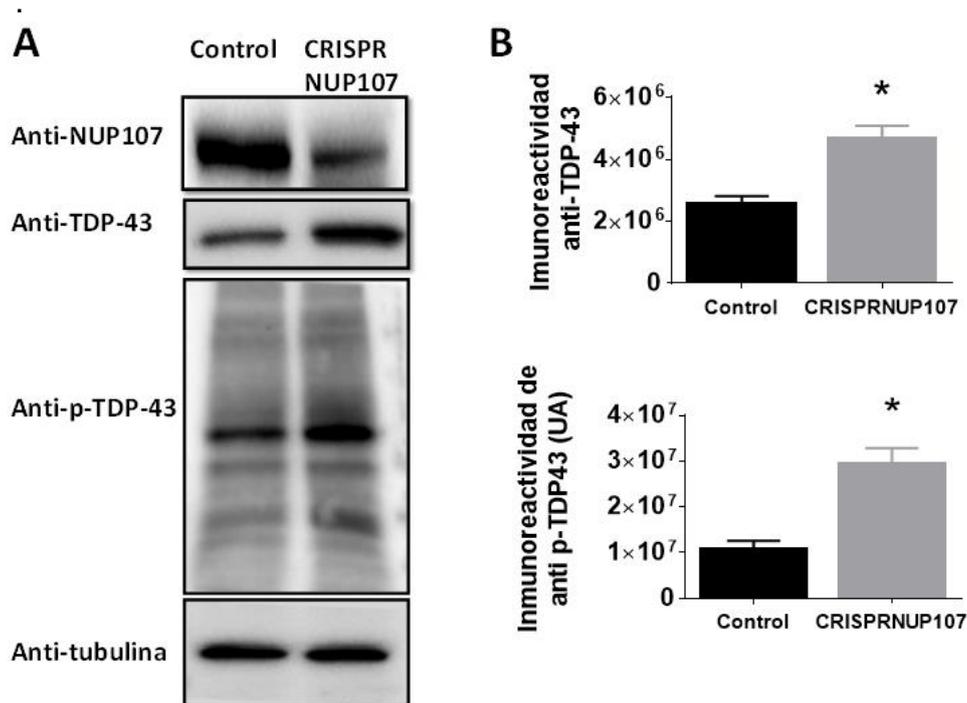


Figura 28. El silenciamiento de NUP107 provoca agregación de p-TDP-43 in vitro. Células HEK-293 fueron silenciadas para el gen NUP107 mediante una técnica de CRISPR y se analizaron mediante inmunodetección utilizando los anticuerpos A: anti-TDP-43 y anti p-TDP-43. En la figura se muestra el silenciamiento de NUP107 y la tubulina como control de carga proteica. B: Cuantificación de los valores promedios de inmunoreactividad de TDP-43 y p-TDP-43, tras análisis densitométrico. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de los anticuerpos ajustado por la carga proteica, con el error típico como medida de dispersión. \* indica diferencias significativas entre células control y células silenciadas para NUP107 (n=3),  $p < 0,05$ . Prueba t de Student.

### NUP107 y autofagia

Además, el gen *NUP107* parece regular el flujo autofágico celular. Bajo silenciamiento de esta nucleoporina, se detectaron los niveles de dos proteínas marcadoras de regulación de la autofagia: LC3B y la proteína p62. La proteína LC3B está involucrada en la formación del autofagosoma y p62 es una proteína adaptadora que funciona de puente entre LC3B y los sustratos ubiquitinizados (Klionsky et al. 2016). Los niveles de ambas proteínas se encontraron incrementados en las células silenciadas con respecto a las controles (figura 29), lo que señala hacia una disrupción del flujo autofágico.

Asimismo, se visualiza una mayor ubiquitinización en las células carentes de *NUP107* lo cual confirma una desregulación de la degradación de proteínas provocada por el silenciamiento de este gen.

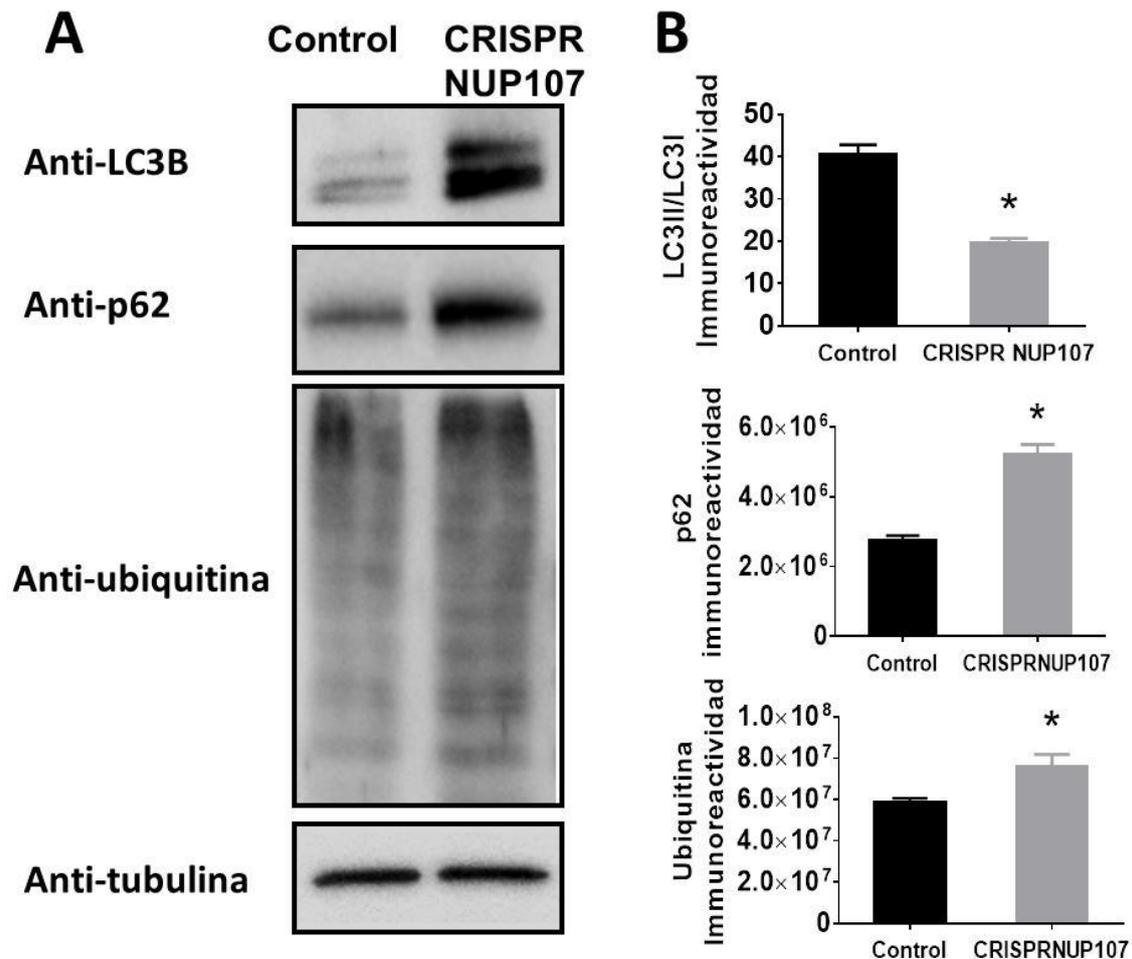


Figura 29. El silenciamiento de *NUP107* provoca desregulación de la autofagia y de TDP-43 in vitro. Células HEK-293 fueron silenciadas para el gen *NUP107* mediante una técnica de CRISPR y se analizaron mediante inmunodetección utilizando los anticuerpos A: anti-LC3B, anti-p62 y anti-ubiquitina. B: anti-*NUP107*, anti-TDP-43 y anti-p-TDP-43. En ambas figuras se muestra la tubulina como control de carga proteica. Cuantificación de los valores promedios de inmunoreactividad de C: MAb414 y D: *NUP107*, tras análisis densitométrico. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de los anticuerpos ajustado por la carga proteica, con el error típico como medida de dispersión. \* indica diferencias significativas entre células control y células silenciadas para *NUP107* (n=3), p<0,05. Prueba t de Student.

La autofagia es un proceso especializado en la degradación y el reciclaje de proteínas y organelos celulares. La inhibición de la autofagia provoca la acumulación de TDP-43 en diversos modelos celulares de ELA (Barmada et al. 2014). Bajo nuestras condiciones comprobamos que la inhibición de este proceso mediante el uso de dos inhibidores específicos de autofagia, la 3-metiladenina (3-MA) y la bafilomicina A2 (BAF), provoca aumento en los niveles citosólicos de TDP-43 (figura 30). La 3-MA es un inhibidor selectivo de la iniciación de la autofagia, mediante la inhibición de la proteína PI3K de clase I (Seglen and Gordon 1982). Por su parte, la Bafilomycin A1 inhibe la autofagia a través del bloqueo de la fusión del autofagosoma con el lisosoma, mediante la inhibición de la ATPasa tipo V (Klionsky et al. 2008).

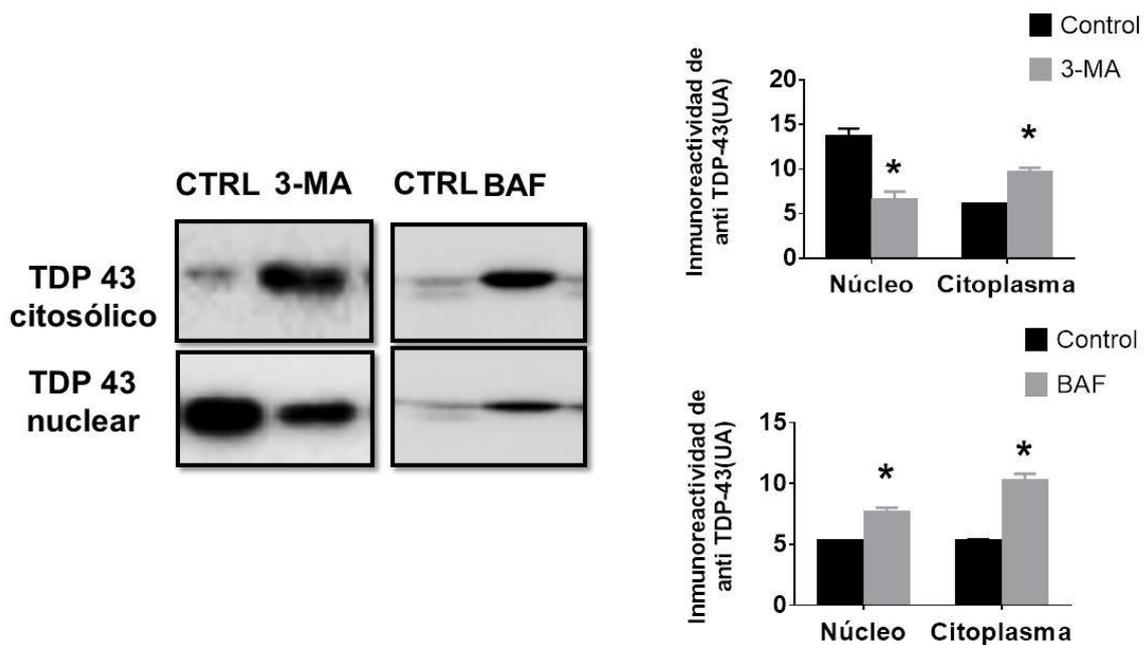


Figura 30. La inhibición de la autofagia provoca deslocalización de TDP-43 endógeno. Células Neuro2A fueron tratadas con 3-MA y Bafilomycin A1 durante 4 horas y TDP-43 fue detectado mediante inmunodetección en fracción citosólica y fracción nuclear. Imágenes representativas de la inmunoreactividad en células control y células tratadas en A: 3-Methyladenine y B: Bafilomycin A1. Cuantificación de los valores promedios de inmunoreactividad de C: TDP-43 en fracción citosólica y nuclear, de células tratadas con 3-MA. D: TDP-43 en fracción citosólica y nuclear de células tratadas con BAF, tras análisis densitométrico. Las barras representan el valor promedio de la inmunoreactividad de los anticuerpos ajustado por la carga proteica, con el error típico como medida de dispersión. \* indica diferencias significativas entre células control y células tratadas (n=3),  $p < 0,05$ . Prueba t de Student.

En la figura 30 se muestra como la inhibición de la autofagia mediada por 3-MA provoca un incremento de TDP-43 citosólico y una disminución del TDP-43 nuclear en las células tratadas comparadas con las controles. En tanto, la BAF incrementa los niveles relativos de TDP-43 en ambos compartimentos en las células tratadas comparadas con las controles. En cualquier caso, la inhibición de la autofagia provoca deslocalización y acumulación citoplasmática de la proteína TDP-43 en células cultivadas *in vitro* (figura 30 A y figura 30 B).

### 3.6. Estrés, nucleoporinas y TDP-43 en cultivos celulares

Bajo algunas condiciones de estrés, TDP-43 recapitula *in vitro* varias de las características histopatológica de la ELA, como la agregación citoplasmática, la fosforilación y la ubiquitinización (Ayala et al. 2011a). Además, varios tipos de estrés como el estrés oxidativo y el estrés osmótico son capaces, no solo de desregular TDP-43, sino también de afectar el transporte nucleocitoplasmático celular (Cohen et al. 2011; Finan et al. 2011). Para intentar establecer el comportamiento de las NUPs bajo estrés celular y su posible relación con TDP-43, evaluamos algunas NUPs y TDP-43, en modelos de agregación de TDP-43 *in vitro* en contexto de estrés celular.

#### Estrés osmótico y FG-NUP

En la figura 31 A, se muestra como el estrés hiperosmótico provocado con sorbitol, es capaz de provocar gran acumulación de agregados citoplasmáticos de TDP-43 (figura 31 B). De la misma manera hubo un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) del TDP-43 citoplasmático y nuclear en las células tratadas con sorbitol con respecto a las controles, que alcanza aproximadamente el 50 % en ambos casos (figura 31 C).

De igual manera, se detectó la presencia de p-TDP-43 en este modelo celular mediante inmunofluorescencia (figura 32 A). Paradójicamente, los niveles de p-TDP-43 disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ), tanto en el compartimento nuclear como en el citoplasma (figura 32 B). No obstante, se observa una relocalización y agregación de la proteína fosforilada alrededor del núcleo, en las células tratadas comparadas con las controles.

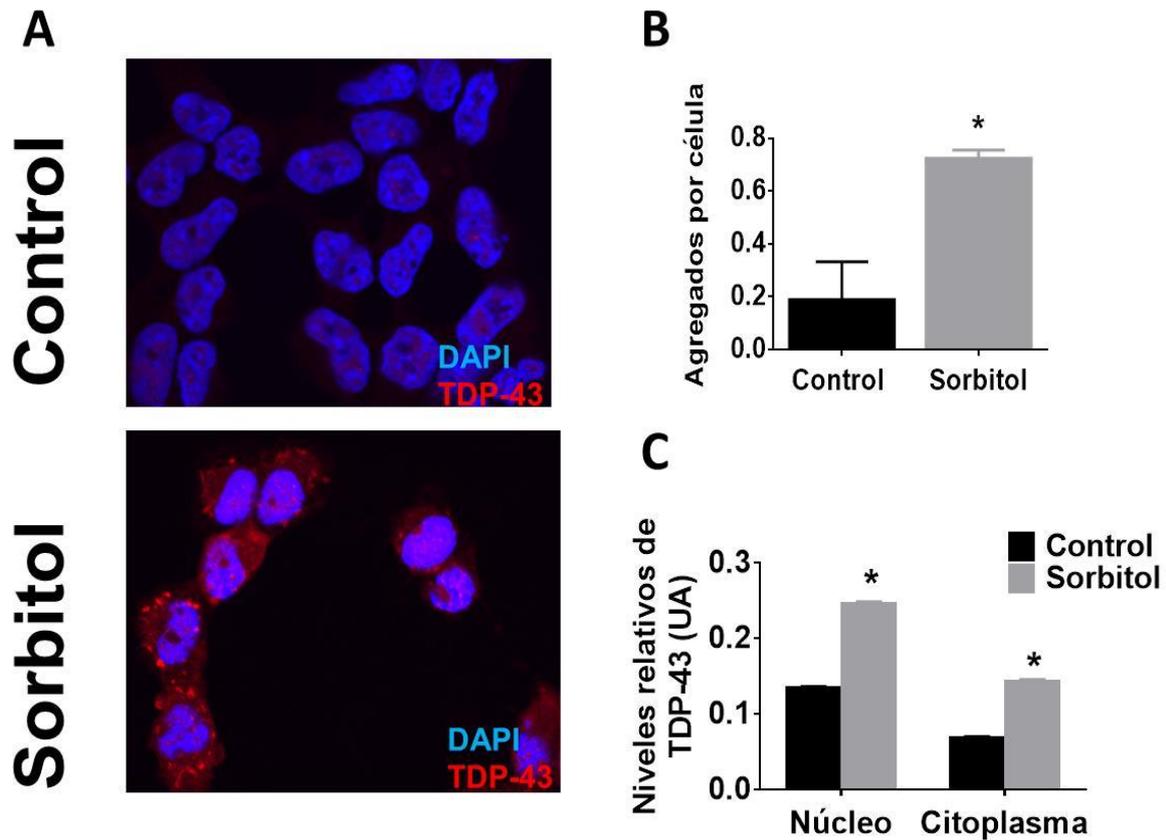


Figura 31. El estrés osmótico provoca deslocalización y agregación de TDP-43 endógeno. Células HEK-293 tratadas con Sorbitol 400mM durante 3 horas y TDP-43 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (60x) con agregados de TDP-43 señalados con flechas. B: Análisis comparativo del número de agregados por células tras cuantificación mediante software de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM) \* indica diferencias significativas entre control y tratado con sorbitol  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney. C: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante software de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y tratado con sorbitol, en fracción citosólica y nuclear,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

El estrés osmótico, bajo nuestras condiciones experimentales, provoca relocalización perinuclear y un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de los niveles relativos de las FG-NUP inmunoreactivas a MAb414 (figura 33 A) y de NUP93 (figura 34 A) en las células tratadas con sorbitol, comparadas con las células controles. Además, este incremento de las NUPs bajo estrés osmótico se verificó tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células estresadas, lo que apunta hacia un reagrupamiento de las proteínas del poro en respuesta al estrés (figura 33 B y figura 34 B).

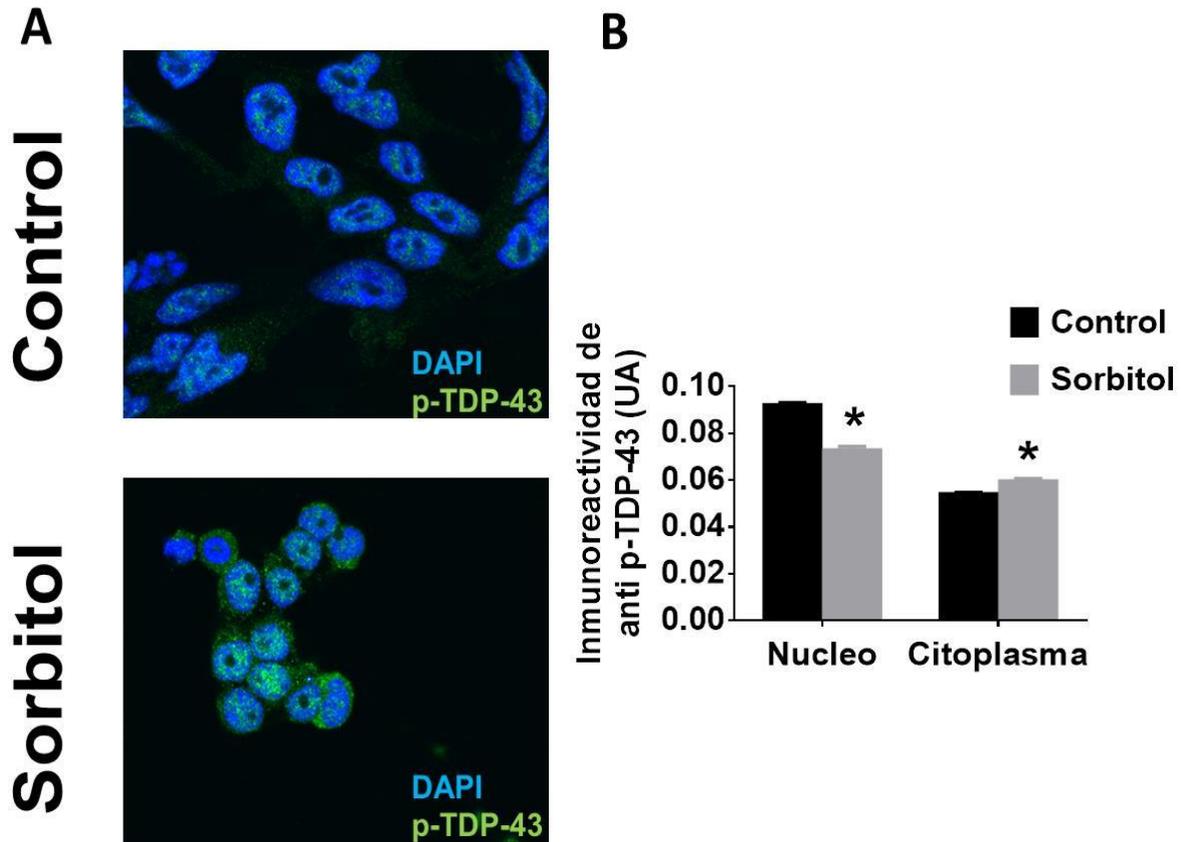


Figura 32. El estrés osmótico provoca deslocalización de la fosforilación TDP-43 endógeno. Células HEK-293 tratadas con Sorbitol 400mM durante 3 horas y p-TDP-43 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (60x) de p-TDP-43. B: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y tratado con sorbitol, en fracción citosólica y nuclear,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

Como se ha comentado previamente en la sección de Introducción, algunos de los mecanismos implicados en la patología de la ELA incluyen al estrés oxidativo, el estrés de retículo, desregulación en los mecanismos de degradación de proteínas entre otros. Todos estos mecanismos están asociados a la formación de agregados y a los cambios histopatológicos de la proteína TDP-43.

Poco es conocido del papel de las NUPs en la fisiopatología de le ELA. Recién se ha comentado que podrían tener alguna implicación en la desregulación del transporte nucleocitoplasmático de algunas proteínas implicadas en la ELA (ver sección Transporte núcleo citoplasmático). Por lo tanto, el estudio de estas proteínas en modelos celulares que mimetizan

algunas de las características fisiopatológicas de la ELA, podría revelar el papel de estas en la patología. Para lo cual, evaluamos las FG-NUP inmunoreactivas al anticuerpo MAb414 mediante inmunofluorescencia, bajo algunas condiciones de estrés celular implicadas en la ELA.

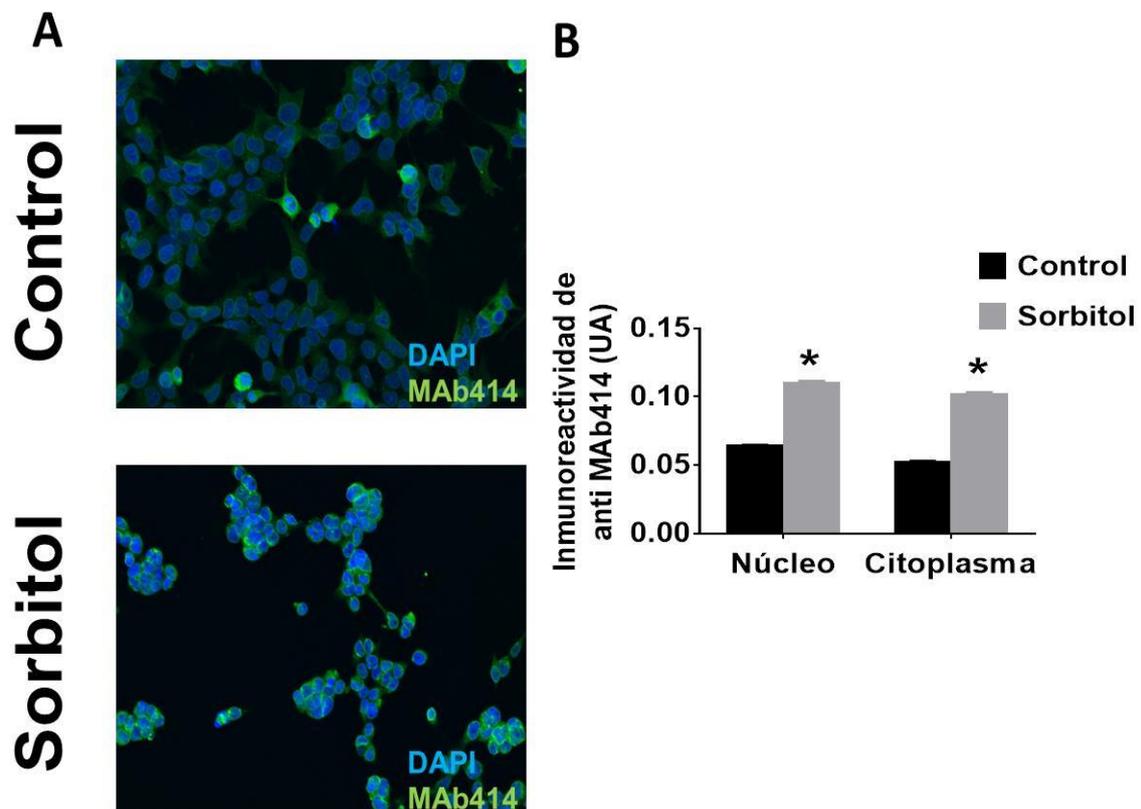


Figura 33. El estrés osmótico aumenta los niveles de FG-NUP. HEK-293 fueron tratadas con Sorbitol 400mM durante 3 horas y MAb414 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (60x) de MAb414. B: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y tratado con sorbitol, en fracción citosólica y nuclear,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

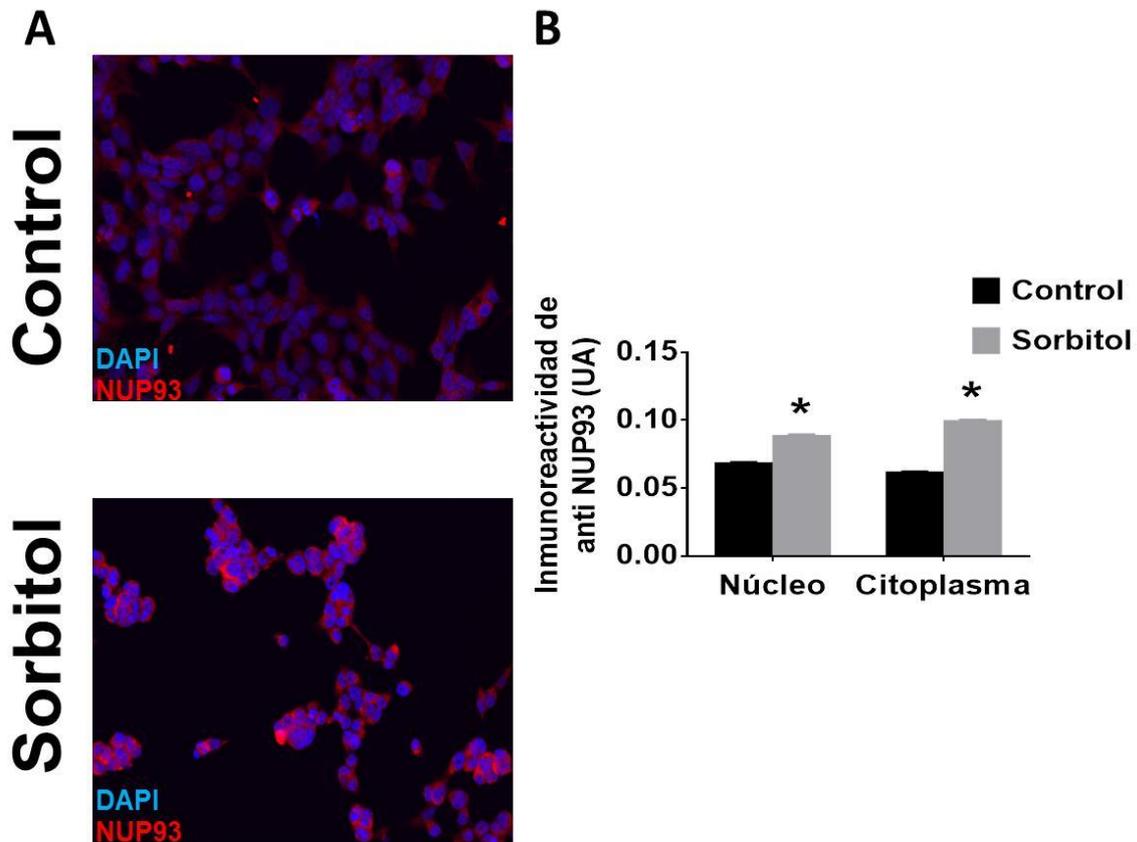


Figura 34. El estrés osmótico provoca un aumento de los niveles de la nucleoporina NUP93. HEK-293 fueron tratadas con Sorbitol 400mM durante 3 horas y NUP93 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (60x) de NUP93. B: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y tratado con sorbitol, en fracción citosólica y nuclear,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

### Estrés oxidativo y FG-NUP

En la figura 35 A y 36 A se muestra el efecto del estrés oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno en células Neuro2A, sobre TDP-43 y las FG-NUP. El análisis de los resultados muestra un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) tanto de TDP-43 como de las FG-NUP en las células tratadas, con respecto a las controles. Curiosamente, el estrés oxidativo provoca un aumento de TDP-43 en el núcleo y en el citoplasma (figura 35 B) pero no se observaron focos citoplasmáticos. Las FG-NUP inmunoreactivas a MAb414 se deslocalizaron

hacia el citoplasma bajo estrés oxidativo y se observa un aumento de los niveles relativos de proteína (figura 36 B).

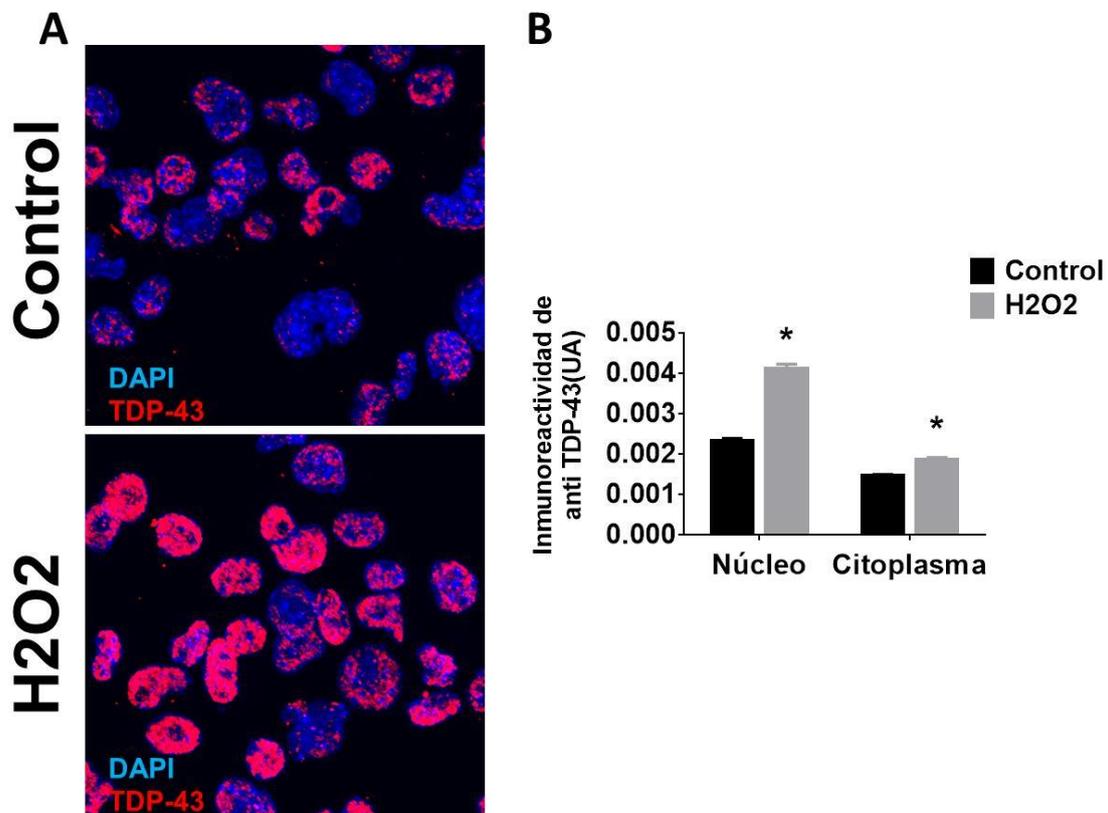


Figura 35. El estrés oxidativo induce aumento de los niveles de TDP-43 en células Neuro2A. Células N2A fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ M durante 4 horas y TDP-43 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (60x) de TDP-43. B: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

El análisis de los resultados de las células tratadas con arsenito de sodio (figura 37 A) muestra un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de TDP-43, en el compartimento nuclear y en el citoplasmático (figura 37 B). Además, las FG-NUP (figura 38 A) también se detectan incrementados sus niveles en las células tratadas y se observa una desregulación de su normal localización perinuclear hacia el citoplasma (figura 38 B).

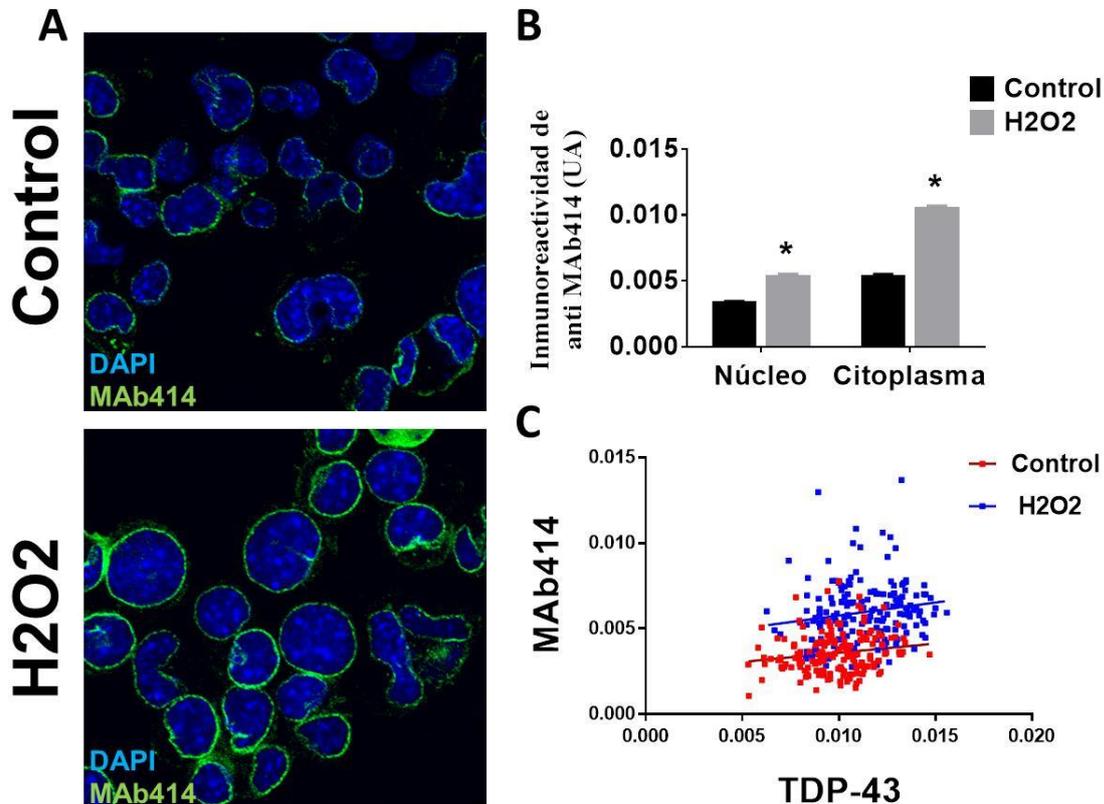


Figura 36. El estrés oxidativo provoca aumento en los niveles de nucleoporinas. Células N2A fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ M durante 4 horas y MAb414 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (60x) de MAb414. B: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney. C: Correlación entre los niveles proteicos de FG-NUP y TDP-43 tras la oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La comparación de las pendientes de las regresiones lineales no muestra diferencias significativas ( $p = 0,6054$ ). Análisis de covarianza.

Estos resultados se repitieron bajo estrés oxidativo inducido por paraquat, donde se observa un aumento tanto de TDP-43 (figura 39) como de las FG-NUP reactivas a MAb414 (figura 40), en el compartimento citoplasmático y en el nuclear.

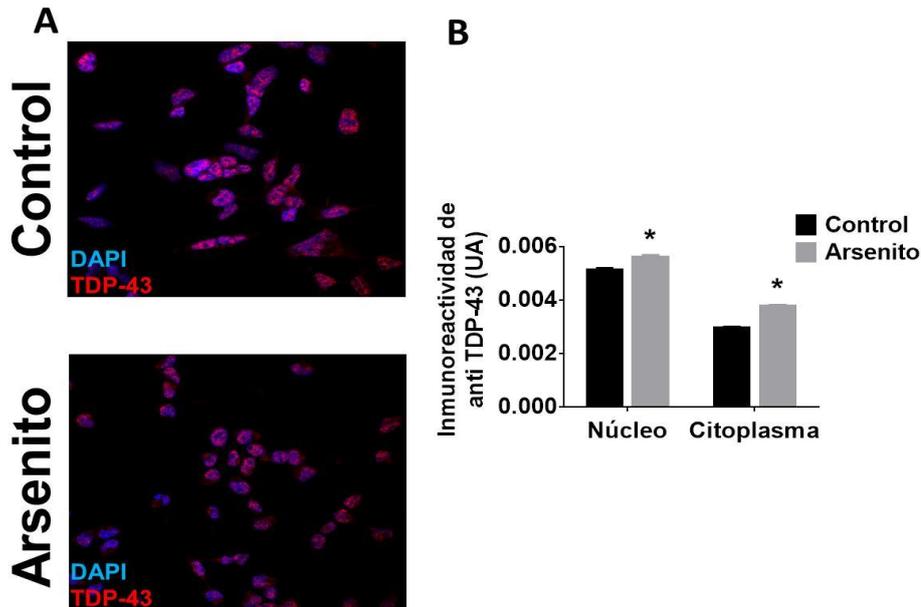


Figura 37. El estrés oxidativo induce aumento en los niveles de TDP-43 en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y fueron tratadas con arsenito de sodio 0,5 mM durante 1 hora y TDP-43 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (20x) de TDP-43. B: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y tratado con arsenito de sodio,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

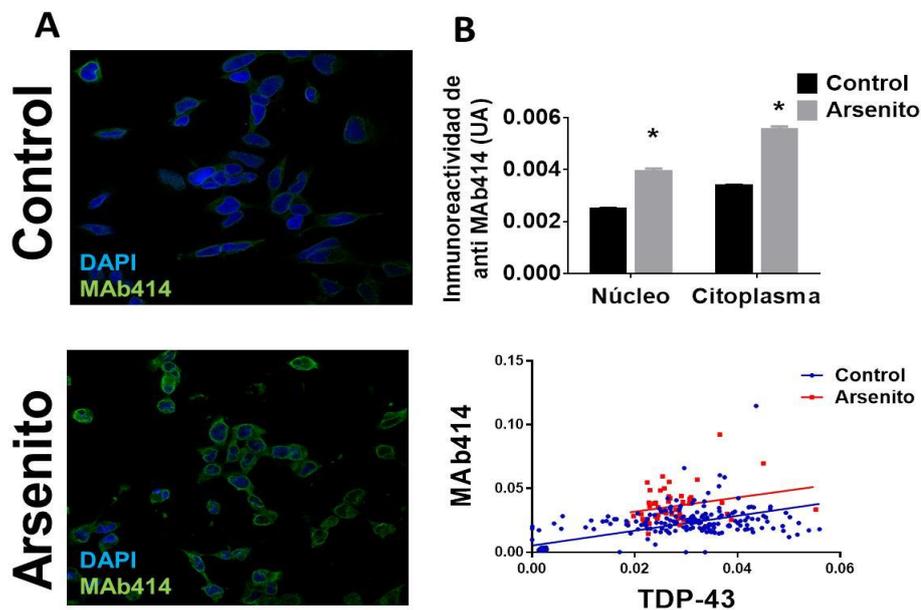


Figura 38. El estrés oxidativo induce aumento en los niveles de FG-NUP en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y fueron tratadas con arsenito de sodio 0,5 mM durante 1 hora y MAb414 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (60x) de MAb414. B: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y tratado con arsenito de sodio,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney. C: Correlación entre los niveles proteicos de FG-NUP y TDP-43 tras la oxidación con arsenito de sodio. La comparación de las pendientes de las regresiones lineales no muestra diferencias significativas ( $p = 0,4052$ ). Análisis de covarianza.

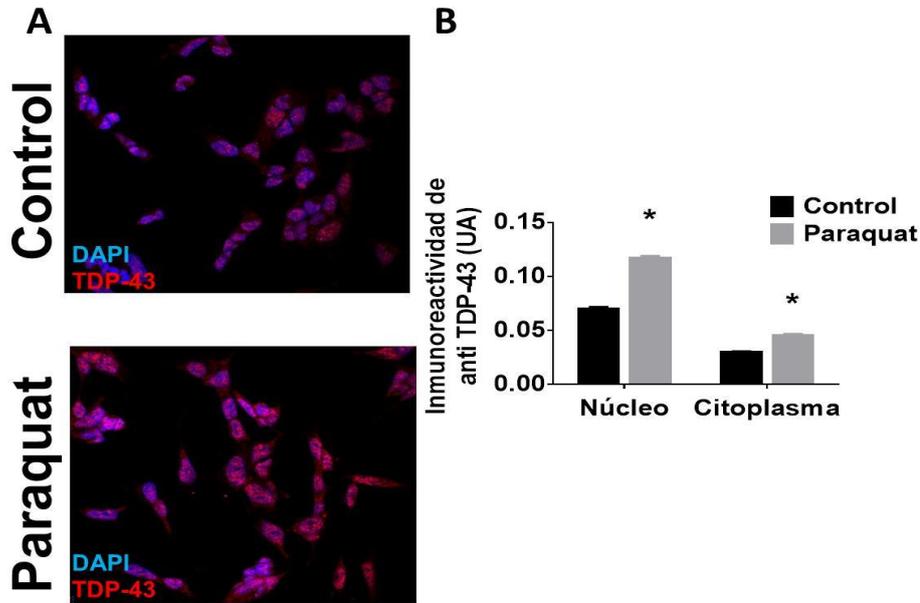


Figura 39. El estrés oxidativo induce aumento de los niveles de TDP-43 en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y fueron tratadas con Paraquat 1 mM durante 24 horas y TDP-43 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (60x) TDP-43. B: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y tratado con Paraquat, en fracción citosólica y nuclear,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney.

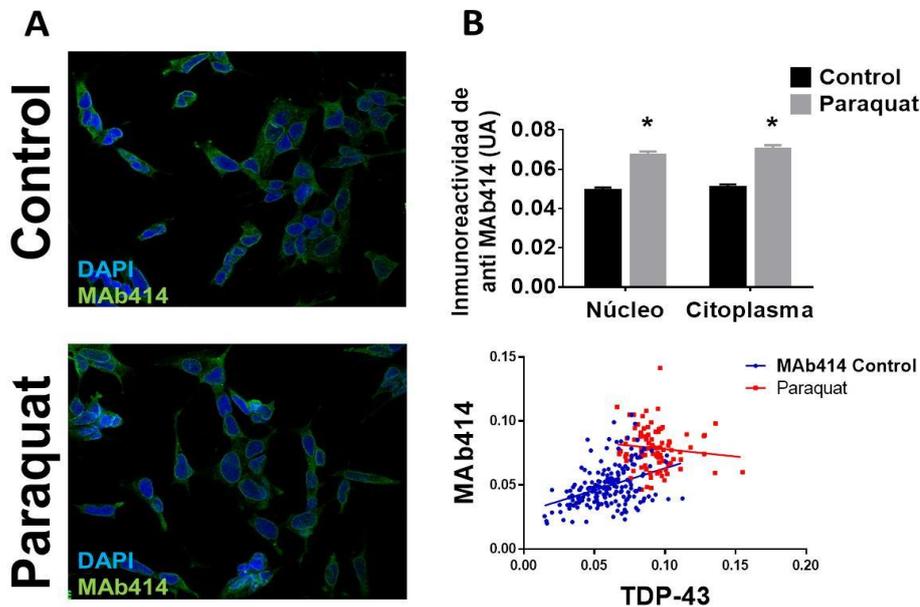


Figura 40. El estrés oxidativo aumenta los niveles de nucleoporinas en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y fueron tratadas con Paraquat 1 mM durante 24 horas y MAB414 fue detectado mediante inmunofluorescencia. A: Imágenes representativas de microscopía confocal (60x) MAB414. B: Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia por células, tras cuantificación mediante programa informático de reconocimiento y análisis de imágenes. Se muestra el valor promedio con el error típico (SEM). \* indica diferencias significativas entre control y tratado con Paraquat, en fracción citosólica y nuclear,  $p < 0,05$ . Prueba U de Mann-Whitney. C: Correlación entre los niveles proteicos de FG-NUP y TDP-43 tras la oxidación con arsenito de sodio. La comparación de las pendientes de las regresiones lineales muestra diferencias significativas ( $p = 0,0001$ ). Análisis de covarianza.

## **DISCUSIÓN**



## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Nucleoporinas en tejido *post mortem* de ELA

Los mecanismos por los cuales las motoneuronas neurodegeneran en la ELA, son actualmente desconocidos. La evidencia científica ha revelado varios procesos celulares afectados que se dan en la enfermedad. Así, este trabajo se enmarca en el posible papel de las nucleoporinas en la ELA y su posible implicación en la patogenia de esta enfermedad.

#### FG-NUP en tejido de pacientes de ELA

En homogenados de tejido de médula espinal extraído *post mortem*, se evidencia la disminución de los niveles relativos de FG-NUP, mediante *western blot*. Las FG-NUP son unas NUPs situadas en canal central del poro nuclear que intervienen en el transporte nucleocitoplasmático, mediante la interacción con proteínas transportadoras, como por ejemplo la carioferina  $\beta$  (Bayliss et al. 2000). De la misma manera, en núcleos aislados de tejido congelado de médula espinal y corteza cerebral, extraídos *post mortem* de pacientes de ELA, se encontraron disminuidos significativamente los niveles relativos a las FG-NUPs, mediante inmunofluorescencia. Sin embargo, en núcleos aislados de corteza motora, al discriminar entre neuronas y células gliales, mediante la tinción de la proteína nuclear específica de neuronas NeuN, se observa una disminución de los niveles relativos de estas NUPs en las células gliales y no se observa en la población neuronal.

Por otro lado en un análisis de varias NUPs en núcleos aislados, específicamente NUP93, NUP107 y FG-NUP, por citometría de flujo, no se demostró disminución de las FG-NUP, pero sí de NUP107 la cual es una NUP estructural que forma complejos con otras proteínas del poro nuclear y es necesario para el ensamblaje de este último (Hoelz et al. 2011).

Previamente se había demostrado alteraciones en la integridad nuclear de motoneuronas de ratones G93A (Kinoshita et al. 2009). Los autores demostraron mediante la detección de las nucleoporina NUP62, NUP88 y

NUP153, que los núcleos de las motoneuronas del asta anterior de la médula espinal de los ratones transgénicos, presentaban contornos irregulares y sinuosos, a diferencia con las células controles que mostraban contornos regulares y suaves (Kinoshita et al. 2009). Similares resultados se obtuvieron en motoneuronas de pacientes de ELAe, donde, a diferencia de los casos controles, la detección de NUP62 mostraba irregularidades del contorno nuclear, en el asta anterior de la médula espinal.

La proteína NUP62 es una proteína FG-NUP glicosidada localizada en el canal central del poro nuclear, que participa activamente en el transporte nucleocitoplasmático, facilitado por los dominios de repeticiones de fenilalanina-glicina (Clarkson et al. 1996). En nuestro estudio, no se observaron irregularidades de la membrana nuclear de los núcleos aislados, pero sí una disminución en el conjunto de las FG-NUP, inmunoreactivas al anticuerpo MAb414 que reconoce epítetos comunes a estas proteínas, mediante inmunofluorescencia cuantitativa y *western blot*. Recientemente se ha demostrado en un modelo roedor de agregación de TDP-43, que algunas FG-NUP como es el caso de NUP62, pueden sufrir proteólisis mediada por calpaína (Yamashita et al. 2017), lo que podría explicar la disminución de las FG-NUP del poro nuclear. En el estudio en cuestión, la actividad de la calpaína no se limitaba solamente a las FG-NUP, también podía actuar sobre otras proteínas del poro nuclear que no comparten dominios de fenilalanina-glicina, como la proteína NUP88 que reside en la parte externa del poro nuclear, en contacto con el citoplasma, lo cual apunta hacia una desorganización generalizada del poro nuclear. Curiosamente, TDP-43 es una diana directa de la calpaína en la ELA. En estudios anteriores se ha constatado acumulación citoplasmática de fragmentos de TDP-43 dependientes de calpaína, en motoneuronas de un modelo roedor de agregación de TDP-43 y en el cerebro y la médula espinal de pacientes de ELA (Yamashita et al. 2012).

Además, en un estudio con la colaboración de nuestro grupo, se observó que la calpaína estaba activada en médulas de ratones SODG93A, en diferentes estadios de la enfermedad (Gou-Fabregas et al. 2014). Estos datos apuntan hacia una degradación de las proteínas del poro nuclear, mediado por calpaína, como un evento asociado a la patogenia de la ELA.

Las NUPs se renuevan cada vez que las células entran en mitosis. El poro nuclear se desensambla y se ensambla durante la formación del nuevo núcleo (Hetzer 2010). Sin embargo, en células post mitóticas como las neuronas, la renovación de las NUPs no tiene lugar y algunas, como los miembros de los subcomplejos NUP107/NUP160 y NUP93/NUP205, permanecen incorporadas en el poro nuclear durante toda la vida útil de la célula (D'angelo et al. 2009). Esto conlleva a una mayor susceptibilidad de estas NUPs de larga vida, al daño ocasionado por el estrés oxidativo, por ejemplo en envejecimiento, donde se ha constatado pérdida de la barrera de permeabilidad nuclear e importe de proteínas citoplasmáticas en el compartimento nuclear (D'angelo et al. 2009). Aunque la ELA no es una patología típica de envejecimiento, la edad es sin duda un factor de riesgo de la enfermedad. Las tasas de incidencia por edad de los registros europeos, muestran que la incidencia de ELA aumenta después de los 40 años de edad y alcanza un pico a finales de los años sesenta o principios de los setenta (Liu et al. 2014). Por lo tanto, el deterioro observado en el poro nuclear en los núcleos envejecidos y la pérdida de la selectividad en el transporte a través del poro nuclear, pudiera ser una característica de la fisiopatología de la ELA, que conlleva a la *proteostasis* típica de esta enfermedad.

En concordancia con la hipótesis anterior, estudios recientes han demostrado desregulaciones de las NUPs en varios modelos experimentales de ELA, que conllevan a un deterioro del transporte nucleocitoplasmático celular y que podría asociarse a la desregulación de TDP-43. Por ejemplo, las nucleoporinas NUP107 y NUP205 presentan anormal localización nuclear en células de corteza motora aisladas de pacientes de ELA<sup>f</sup>, asociados al gen *C9ORF72*. Estas proteínas forman agregados intranucleares que colocalizan con proteínas involucradas en el transporte nuclear como la proteína RanGAP1, lo cual sugiere un deterioro del complejo de nucleoproteínas en estos pacientes (Zhang et al. 2015).

Además, estudios de *screening* genético en modelos de *Drosophila*, que expresan las proteínas de repetición de dipéptidos (DPR), asociadas a la traducción no convencional del gen *C9ORF72*; se identificaron varias NUPs, tales como NUP50, NUP153, TNPO1, NUP107 y NUP160 y componentes de

la maquinaria de transporte nucleocitoplasmático como mediadores de la toxicidad de las DPR, lo cual apunta hacia una posible relación de las nucleoporinas en la etiopatogenia de la ELA.

El incremento neuronal de 8OHdg como marcador del daño oxidativo al ADN observado en la figura 16, refuerza la hipótesis del estrés oxidativo como mediador en la desregulación de las NUPs. Nuestro resultado es consistente con la literatura, donde múltiples hallazgos evidencian el aumento del daño al ADN en pacientes de ELA (Coppede 2011). Los niveles de este marcador ya se habían visto incrementados en el ADN de neuronas de la corteza motora de pacientes de ELAe y de ELAf (Ferrante et al. 1997). De la misma manera, también se vieron incrementados en el plasma, la orina y el líquido cefalorraquídeo de pacientes de ELA. De manera interesante los niveles de 8OHdg en la orina de pacientes, incrementan con el tiempo y correlacionan con el agravamiento de la enfermedad (Bogdanov et al. 2000b).

#### **4.2. Lípidos nucleares y nucleoporinas**

El análisis del perfil lipídomico de los núcleos aislados de tejido *post mortem* de pacientes de ELA y controles, muestra un perfil diferencial entre el grupo control y el grupo patológico. Lo anterior reafirma la complejidad de esta enfermedad, en la cual no sólo existe una desregulación proteica sino también, una restructuración de los lípidos de las estructuras del sistema nervioso central que podrían contribuir a la patogénesis de la enfermedad.

Diversos estudios se han enfocado en correlacionar el perfil lipídico de pacientes de ELA y animales de experimentación, con la prevalencia y progresión de la enfermedad. Sin embargo, los estudios no son consistentes y muestran disparidad en los resultados. Por un lado, se han correlacionado elevados niveles de triglicéridos y colesterol en sangre de pacientes de ELA, con una tasa de supervivencia prolongada de estos, en comparación con los que tenían bajos niveles de triglicéridos y colesterol (Dupuis et al. 2008; Huang et al. 2015). Sin embargo, otros investigadores han concluido que la hiperlipidemia no es un factor predictor de supervivencia en estos pacientes (Kostic Dedic et al. 2012; Paganoni et al. 2011). En línea con lo expuesto

anteriormente, un reciente metaanálisis concluyó que aquellos pacientes con elevados niveles de triglicéridos en sangre, no tenían una mayor supervivencia comparados con aquellos con bajos niveles de triglicéridos (Huang et al. 2015).

Pese a estos estudios en plasma, no existe un gran número de referencias sobre alteraciones membranales celulares en ELA y sus modelos, aunque en estudios previos de nuestro grupo (Cacabelos et al. 2014) y otros (Yip et al. 2013) sugieren la importancia de los omega-3 en la dieta como modificadores de la enfermedad, sin haber entrado en el mecanismo exacto. Desconocemos si los posibles efectos de estas dietas pasan por modificación de los lípidos del tejido nervioso o si son efectos indirectos (e.g. a través de cambios en microvasculatura u otros efectos). Por otro lado, cabe recordar que una de las formas de ELA familiar, el subtipo 8, se debe a una mutación en la proteína VAP-B, implicada en el tráfico membranal intracelular (Nishimura et al. 2004) con lo que se puede aventurar que la composición de las membranas intracelulares puede ser un factor relevante en la fisiopatología de la ELA. Por otro lado, la interacción entre los lípidos la membrana nuclear y las nucleoporinas y su contribución a la homeostasia celular, en general está poco estudiada. Para ejercer su función, las NUPs necesitan estar ancladas adecuadamente en los puntos de fusión entre las membranas nucleares externa e interna de la envoltura nuclear (Mészáros et al. 2015). Las zonas de contacto entre la membrana nuclear y las NUPs, se caracterizan por ser áreas altamente especializadas e intrínsecamente muy curvadas de la envoltura nuclear, en la que están incrustadas algunas nucleoporinas transmembrana como son: Pom121, GP210 y NDC1, las cuales se requieren para el anclaje del poro a la envoltura nuclear (Floch et al. 2015; Stavru et al. 2006). Además de estas proteínas transmembranas, una serie de NUPs, como por ejemplo, miembros del complejo NUP107-160 contienen dominios que interaccionan con la membrana nuclear, especializados en el anclaje del NPC a la envoltura del núcleo (Doucet and Hetzer 2010; Patel and Rexach 2008). Nuestros resultados son compatibles con cambios en la composición de las membranas que conforman la envoltura nuclear, dado que se afectan fosfolípidos como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilinositol, que se encuentran entre los componentes membranales (ver tabla 8). Adicionalmente, los cambios en

triacilglicéridos podrían ser explicados por cambios en las denominadas gotas lipídicas, recientemente descritas en el nucleoplasma (Farese and Walther 2016). Dado que su papel fisiológico se desconoce, no podemos inferir su significado fisiopatológico en nuestras muestras. Finalmente, otro grupo de lípidos con potencial relevancia son los glicoesfingolípidos. Hallazgos previos en el campo sugieren la importancia de estos lípidos: así en el modelo G93A, se demuestra una alteración tanto en la concentración de estos con el desarrollo de la enfermedad, y como la administración de GM3, uno de sus miembros, conduce a una mejora en el curso clínico de la enfermedad (Dodge et al. 2015)). Por otro lado, y de forma congruente con estos hallazgos, se ha demostrado que la transcripción de glucosilceramida sintasa es necesaria para una óptima protección frente a la denervación, y que su inhibición empeora el curso clínico en otro modelo de la ELA familiar, el ratón hSODG86R (Henriques et al. 2015). Nuestros resultados son plenamente compatibles con estos datos previos, ya que encontramos disminuciones significativas en los niveles nucleares de dos lípidos afines con la estructura de glucosilceramidas. Estas moléculas son precursores de intermediarios de señalización, con lo que su papel fisiopatológico podría venir dado por alteraciones en autofagia (Guenther et al. 2008; Guenther and Edinger 2009), hipótesis compatible con los cambios en este proceso que hemos observado en los estudios con cultivo celular. No obstante, múltiples vías (incluyendo la alteración de los denominados *lipid rafts* o dominios de anclaje de receptores tróficos (Cascianelli et al. 2008)) podrían también explicar estos cambios, pese a que su papel en la envoltura nuclear aún está por establecer.

#### 4.3. Silenciamiento de nucleoporinas

El silenciamiento del gen *NUP107* mediante la técnica de CRISPR/CAS9, se llevó a cabo para estudiar la posible relación entre esta NUP y la *proteostasis* asociada a TDP-43. *NUP107* es una proteína estructural, que forma uno de los mayores subcomplejos dentro del poro nuclear, el subcomplejo *NUP107/NUP160*; cuyos componentes participan en diversas funciones como el ensamblaje (Walther et al. 2003), en la distribución de las de las NUPs en el poro nuclear y en la exportación de ARNm en levaduras y

vertebrados (Boehmer et al. 2003; Vasu et al. 2001). Además, como se ha mencionado previamente, las proteínas estructurales como las del complejo NUP107/NUP160 son extremadamente estables en el tiempo y no se renuevan una vez incorporadas en la envoltura nuclear; lo cual les confiere una mayor vulnerabilidad al daño, especialmente en el envejecimiento (D'Angelo et al. 2009) y posiblemente en enfermedades neurodegenerativas donde se evidencia un cúmulo de daño oxidativo (Niedzielska et al. 2016).

Los estudios de silenciamiento del gen *NUP107* en células HEK-293 provocaron una desregulación en los niveles proteicos de TDP-43, tanto por fluorescencia indirecta (figura 25) como por *western blot* (figura 28). Un incremento de los niveles de TDP-43, tanto en el citoplasma como en el compartimento nuclear se ven reflejados en la figura 25. Además, la fosforilación de esta proteína también se observa incrementada en ambos compartimentos celulares (figura 26) y en lisados totales de células silenciadas respecto a las controles (figura 28). El análisis de los agregados de p-TDP-43, como indicador de *proteostasis* de TDP-43, reflejó un aumento de los agregados fosforilados de esta proteína, en las células silenciadas para *NUP107*, en comparación con las células controles (figura 27).

Ningún vínculo directo se ha establecido antes entre NUP107 y TDP-43. Estudios previos, sin embargo, han evidenciado una relación entre estas dos proteínas en el marco de la ELA. En pacientes de ELA asociados al gen *C9ORF72*, que presentan los típicos agregados citoplasmáticos de TDP-43 (Edbauer and Haass 2016), la proteína NUP107 se agrega en la membrana nuclear de células de la corteza motora y colocaliza con proteínas que intervienen en el transporte nuclear como RanGAP1 (Zhang et al. 2015). Igualmente, otros investigadores han reportado deslocalización intranuclear de NUP107 y otras NUPs estructurales en médula espinal de pacientes de ELAe y de ratones G93A (Shang et al. 2017). Estos hechos apuntan a que el silenciamiento de *NUP107* puede provocar una disrupción en el transporte nucleocitoplasmático, que conlleva a la formación de agregados fosforilados de TDP-43. Aunque no necesariamente la fosforilación es un requisito para la agregación (Iguchi et al. 2012), habitualmente es asociada con insolubilidad y mal plegamiento de TDP-43 (Scotter et al. 2015).

NUP107 participa también en el ensamblaje y el reordenamiento de otras nucleoporinas dentro del poro nuclear (Hoelz et al. 2011). El silenciamiento de esta proteína podría causar fallos en la estructura del poro nuclear y afectar el transporte que se realiza a través de estas estructuras y ocasionar o contribuir a la deslocalización de TDP-43. Un análisis de algunas NUPs llevado a cabo después del silenciamiento de NUP107, mediante ARN de silenciamiento (ARNsi) en células HeLa, resultó en disminución de los niveles relativos de estas proteínas (Boehmer et al. 2003). Los autores detectaron que algunas FG-NUP, que participan en el transporte a través del poro nuclear como NUP153, NUP358 y NUP214, reducían sus niveles luego del silenciamiento de NUP107 (Boehmer et al. 2003). En nuestro caso, el silenciamiento de NUP107 ocasionó un aumento de los niveles relativos de varias NUPs (figura 24), en franco contraste con lo reportado en la literatura. No obstante, los elevados niveles de NUPs en células silenciadas, podrían explicarse debido a una respuesta celular compensatoria de los niveles de NUP107. El establecimiento por nuestra parte, de una línea celular estable carente del gen *NUP107*, podría producir en el tiempo, un reordenamiento de las NUPs como respuesta adaptativa de la célula a la falta de NUP107. En cualquier caso, la desorganización de las nucleoporinas podría ocasionar fallos en el transporte de TDP-43 a través del poro nuclear, mediado por transportadores solubles, como las carioferinas. Las carioferinas transportan TDP-43 a ambos lados de la membrana nuclear y establecen un complejo con varias FG-NUPs; por lo que un fallo o deterioro de las NUPs podría contribuir a la deslocalización y subsecuente agregación de TDP-43 (Nishimura et al. 2010). Por ejemplo, el silenciamiento mediante ARNsi de las proteínas NUP62 y NUP54 las cuales tienen dominios de fenilalanina-glicina, provocan acumulación en el citoplasma de TDP-43 en cultivo celular (Nishimura et al. 2010).

### **NUP107 y Autofagia**

La autofagia es uno de principales procesos celulares de degradación que tienen las neuronas para lidiar con los agregados proteicos. Aunque la relación exacta de la autofagia en la patogénesis de la ELA todavía es objeto de controversia, la mayoría de la evidencia científica confluye en que defectos

en el flujo autofágico puede contribuir a la neurodegeneración de las motoneuronas y la progresión de la ELA (Lee et al. 2015; Song et al. 2012).

En este estudio se detectó una desregulación de la autofagia en las células silenciadas para *NUP107* en comparación con las células controles. La alteración de este proceso fue evidenciado por la disminución de la relación entre los niveles relativos de LC3II y LC3I (LC3II/LC3I) y el aumento en los niveles de p62. La proteína LC3II se presenta conjugada con fosfatidiletanolamina y se asocia a las membranas del autofagosoma, por lo que su detección, generalmente es buen indicador del número de autofagosomas (Kabeya 2000). Por su parte, la proteína p62 funciona de puente entre las proteínas ubiquitinizadas y LC3II, desempeñándose como señalizador de la degradación. La acumulación de la proteína p62 habitualmente se asocia un incremento de sustratos señalizados por autofagia y por consecuencia con una inhibición de la autofagia (Bjørkøy et al. 2005). En este caso, el incremento de LC3II, que correlaciona con el aumento en el número de autofagosomas, se puede interpretar como un bloqueo de la fusión del autofagosoma con el autolisosoma, que impide la degradación de sustratos ubiquinizados, de acorde a la acumulación de p62 y de ubiquitina. Otra interpretación de los aumentos de LC3II y p62, podría referirse a una inducción de la autofagia que resulta insuficiente para lidiar con la agregación de TDP-43. Similares resultados se han detectado en médulas espinales de pacientes de ELA y en modelos experimentales, en los cuales se evidencia un aumento de p62 y de LC3II (Sasaki 2011; Song et al. 2012).

En este contexto, un estudio anterior ha relacionado a la proteína TPR, una nucleoporina de la cesta nuclear con el sistema autofágico (Funasaka et al. 2012). Los autores inhibieron la expresión de TPR mediante ARNsi en células HeLa y detectaron un aumento del flujo autofágico mediado por acumulación intranuclear de la proteína supresora de tumor p53, la cual induce autofagia por estimulación de los genes *AMPK* y *DRAM1* (Tavernarakis et al. 2008) y mediante la regulación transcripcional del ARNm de proteínas autofágicas como ATG5 y ATG12 (Funasaka et al. 2012). El silenciamiento de TPR provocó además, disminución de los niveles de FG-NUP reactivas al anticuerpo MAb414, lo cual indica una desorganización del poro nuclear y posiblemente

una disrupción del tráfico nucleocitoplasmático (Funasaka et al. 2012). Aunque la relación entre las NUPs y la autofagia no está bien estudiada, lo anterior demuestra que las NUPs podrían regular procesos como la autofagia, ya sea mediante la unión directa a proteínas transportadas o mediante la regulación transcripcional de genes reguladores del flujo autofágico. En este sentido, en una revisión de los factores transcripcionales que regulan el flujo autofágico celular, se detectaron que muchos de ellos son controlados por el transporte nucleocitoplasmático (Füllgrabe et al. 2014). Dos ejemplos concretos son los factores transcripcionales p53 y TFEB, los cuales son reguladores de autofagia y han sido asociadas a la patogenia de la ELA (Chen et al. 2015; Martin 2000).

#### 4.4. Nucleoporinas y estrés oxidativo

La neurodegeneración en la ELA implica diferentes mecanismos de estrés celular que inician o favorecen el proceso neurodegenerativo. Estudios previos de nuestro grupo han revelado que diferentes estreses celulares, como el estrés de retículo, la disfunción del proteosoma y el estrés oxidativo, inducen los cambios patológicos de TDP-43 asociados a la ELA (Ayala et al. 2011a; Iliava et al. 2007).

En este trabajo estudiamos la implicación de las NUPs en la deslocalización y agregación de TDP-43. En este sentido, evaluamos el comportamiento de las NUPs mediante inmunofluorescencia indirecta, en modelos establecidos *in vitro* de deslocalización y agregación de TDP-43, mediados por inductores de estrés celular.

El estrés oxidativo ha sido relacionado de diversas maneras con la patología de la ELA asociada a la desregulación de TDP-43. Marcadores incrementados de daño oxidativo se han observado elevados en tejido *post mortem* de pacientes de ELA y en modelos animales de la enfermedad (Ikawa et al. 2015; Iliava et al. 2007; Shibata et al. 2001). Por otro lado, numerosos estudios *in vitro*, mediante el empleo de agentes oxidantes, han demostrado que TDP-43 es susceptible al estrés oxidativo, provocando las características que se observan en la enfermedad (Ayala et al. 2011a; Meyerowitz et al. 2011; Parker et al. 2012).

El estrés oxidativo fue inducido mediante el paraquat, el arsenito y el peróxido de hidrógeno, los cuales han sido empleados previamente para el estudio de la agregación de TDP-43 (Ayala et al. 2011a; Meyerowitz et al. 2011; Parker et al. 2012). En todos los casos, se observa una deslocalización de TDP-43, con incremento en las reactividades tanto en el compartimento nuclear como en el citoplasmático.

Es conocido que el estrés oxidativo puede provocar cambios en las NUPs y en la arquitectura del poro nuclear, que dan al traste con el transporte nucleocitoplasmático intracelular. Las NUPs funcionan como una puerta selectiva entre el núcleo y el citoplasma, mediando el transporte a través del poro nuclear, previa unión a proteínas transportadoras, como las carioferinas. TDP-43 es transportado hacia el núcleo mediante la carioferina  $\beta$ , la cual se une a las FG-NUP en su paso por el poro nuclear. Estudios previos han demostrado que el silenciamiento de la carioferina  $\beta$  y de algunas NUPs, como NUP62 y NUP54, producen agregación de TDP-43 citoplasmático, demostrando que las NUP juegan un papel esencial en el transporte y la regulación de TDP-43 (Nishimura et al. 2010). Igualmente, los niveles de carioferina  $\beta$ , de la proteína de susceptibilidad a la apoptosis celular CAS, la cual actúa como exportina de TDP-43 y de varias NUPs como NUP88 y NUP153, se incrementaron en condiciones de estrés oxidativo *en vitro* (Kodiha et al. 2008). En nuestro caso, en concordancia con la literatura, las FG-NUPs reactivas al anticuerpo MAb414, incrementaron la inmunoreactividad como respuesta, tanto al estrés oxidativo como al estrés osmótico. Según (Kodiha et al. 2008), este incremento se debe a entrecruzamientos entre las nucleoporinas producto del estrés oxidativo, como son los casos de NUP153 (FG-NUP reactiva a MAb414) y NUP88 una nucleoporina que no posee repeticiones FG y se encuentra exclusivamente en contacto con el citoplasmática (Köhler et al. 2010), lo cual la hace más vulnerable al estrés oxidativo. Además, la oxidación provoca la acumulación de agregados proteicos en el poro nuclear, compuestos por NUPs y proteínas transportadora que podría conducir a un aumento de la reactividad de estas (Kodiha et al. 2008).

Asimismo, mediante un estudio de fosfoproteómica se comprobó que el estrés oxidativo provoca la fosforilación de algunas FG-NUP como NUP50,

NUP153 y NUP214, mediado por la proteína MAPK quinasa (Kosako et al. 2009). La fosforilación de las FG-NUP reduce la afinidad con proteínas transportadoras como las de la familia de las carioferinas, provocando una desregulación tanto en el importe como en el exporte de sustratos a través del poro nuclear (Kosako et al. 2009). Un estudio previo de nuestro grupo demostró que el estrés oxidativo y el estrés de retículo provocan activación de ERK1/2, una proteína de la familia de las MAPK, asociado a la agregación y ruptura proteolítica de TPD-43. Además, en un modelo de excitotoxicidad crónica los autores demostraron un incremento en la fosforilación extranuclear de ERK1/2 asociado con agregados de p-TPD-43 (Ayala et al. 2011a). Recientemente Liu y colaboradores corroboraron que la activación de AMPK conlleva a la agregación citoplasmática de TDP-43, recapitulando estas características de la ELA (Liu et al. 2015).

El estrés oxidativo además de provocar la fosforilación de las NUPs, también induce la formación de puentes disulfuros intermoleculares entre estas proteínas dentro del poro nuclear. La formación de estos enlaces covalentes afectan directamente el importe nuclear mediado por carioferina  $\beta$  (Yoshimura et al. 2013). Las modificaciones de las NUPs por oxidación podrían ser un proceso regulatorio importante que afecte sustancialmente el transporte de TDP-43 a través del canal central del poro nuclear.

Por otra parte, los análisis de correlación entre TDP-43 y las FG-NUP sugieren que los mecanismos de oxidación involucrados en la relación entre estos dos parámetros, parecen depender de la tasa de producción de radicales libres. Solamente el paraquat es capaz de producir un cambio significativo en la relación entre estas proteínas, constatado por un análisis de covarianza (figura 40).

Como hemos comentado en otros apartados, algunas NUPs estructurales como NUP93 y NUP107 son proteínas de larga vida, que no se renuevan en células postmitóticas y son susceptibles al estrés oxidativo, por ejemplo en envejecimiento. Lo anterior provoca permeabilidad no selectiva del poro nuclear, conduciendo a una desregulación del transporte y la acumulación de proteínas fuera de su hábitat natural (D'Angelo et al. 2009). Este contexto

podiera trasladarse a las enfermedades neurodegenerativas y en especial en la ELA, donde coexisten proteínas deslocalizadas y agregadas tanto en el citoplasma como en el compartimento nuclear.

#### 4.5. NUPs en SODG93A

En este estudio se evidenció un cambio en los niveles de las NUPs en ratones SODG93A a diferentes estadios de la enfermedad. Las mayores diferencias se detectaron a la edad de 100 días, coincidiendo con el inicio de los síntomas clínicos propios de la neurodegeneración. En esta fase se aprecia una disminución de las proteínas NUP107 y FG-NUP en los ratones machos, y de NUP93 en ratones de ambos sexos. Lo anterior apunta hacia una desregulación de las nucleoporinas al inicio de la enfermedad que podría traer como consecuencia un deterioro del poro nuclear y por consiguiente, una desregulación en el transporte nucleocitoplasmático contribuyendo al proceso neurodegenerativo (Bano et al. 2010; Gasset-Rosa et al. 2017; Zhang et al. 2016a).

Estudios previos apoyan nuestros hallazgos en la alteración de las NUPs en ratones SODG93A. Zhang J y colaboradores hipotetizaron, que la alteración en varias moléculas involucradas en el transporte, como la carioferina  $\beta$  y la carioferina  $\alpha 2$ , en médulas espinales de ratones SODG93A, podría ser debido a una disfunción de las proteínas del poro nuclear (Zhang et al. 2006). Los autores, además, hallaron deslocalización citoplasmática de proteínas que se importan al núcleo, tanto por proteínas de la familia de las carioferinas como las histonas H1, como aquellas que se translocan al núcleo por otras vías, como la proteína  $\beta$ -catenina (Zhang et al. 2006). La desregulación en el transporte a través del núcleo en este modelo de ELAf, parece comenzar desde los primeros signos clínicos de neurodegeneración. Así lo demostraron los autores mediante la detección de la carioferina  $\beta$  a diferentes estadios de la enfermedad, observando una deslocalización citoplasmática creciente de esta proteína, según avanza la enfermedad (Zhang et al. 2006).

Otras evidencias en este sentido, señalan una distribución anormal de las nucleoporinas del asta anterior de la médula lumbar, de ratones SODG93A

(Kinoshita et al. 2009). La detección mediante inmunofluorescencia de la nucleoporina NUP62 en médulas espinales de ratones transgénicos, resultó en irregularidades morfológicas dado por un contorno irregular y discontinuo de la membrana de la envoltura nuclear; mientras que los ratones controles presentaban núcleos con un contorno regular y continuo (Kinoshita et al. 2009). Los autores también observaron estas irregularidades morfológicas en pacientes de ELAe, mediante la detección por inmunohistoquímica de otras nucleoporinas como NUP88 y NUP153.

De manera interesante, no se encontraron cambios con el incremento de la edad en las nucleoporinas analizadas en médula lumbar de ratones controles, al menos en las edades comprendidas entre 8 y 20 semanas (Kinoshita et al. 2009). En nuestro caso, detectamos una reducción significativa dependiente de la edad, en los niveles de FG-NUP reactivas a MAb414, tanto en hembras como en machos controles, de acuerdo a un análisis de ANOVA de dos vías controlado por el sexo y el tiempo. Aunque en este análisis se asume una comparación entre datos obtenidos en intervalos de tiempos diferentes (se compara la relación obtenida entre la inmunoseñal del anticuerpo, normalizado por el control de carga proteico), la posible disminución o desregulación de las nucleoporinas en el tiempo, ha sido abordado en la literatura científica. D'angelo y colaboradores demostraron, tanto en *C. elegans* como en células mamíferas, que la estructura y función del poro nuclear se deterioran en el envejecimiento. Con el avance de la edad, los núcleos se vuelven más permeables y acumulan moléculas propias del compartimento citoplasmático como la tubulina (D'Angelo et al. 2009). Una de las posibles razones recae en el hecho que algunas nucleoporinas estructurales como NUP107 y NUP93, son altamente estables y no se renuevan una vez insertadas en el poro nuclear de las células postmitóticas. Esto conlleva a una mayor susceptibilidad de estas NUPs al estrés oxidativo producto del envejecimiento, donde hay un incremento del daño oxidativo a proteínas (Chakravarti and Chakravarti 2007; Dalle-Donne et al. 2006).

En consonancia con lo anterior, los autores encontraron un elevado aumento en los niveles de NUP93 carboxiladas, lo cual es indicativo de daño a la proteína por oxidación, en núcleos envejecidos en comparación con núcleos

jóvenes (D'Angelo et al. 2009). Los autores concluyeron que estrés oxidativo puede deteriorar la barrera de permeabilidad nuclear y que este proceso puede estar directamente asociado al envejecimiento.

No obstante a lo expuesto anteriormente, no podemos afirmar categóricamente que las NUPs evaluadas en los ratones controles de nuestro estudio, disminuyen sus niveles debido al envejecimiento. Sería interesante el estudio de las nucleoporinas en un modelo de envejecimiento, evaluando los niveles proteicos y la localización celular, así como los posibles eventos que se asocian al deterioro del poro nuclear en su conjunto.

De manera interesante, en este estudio evidenciamos mediante un análisis de ANOVA de dos vías, la influencia del género sobre los niveles de NUPs entre ratones hembras y machos. Generalmente las hembras transgénicas tienen incrementados los niveles de NUPs, principalmente a estadio sintomático (figura 19 E); aunque a estadio presintomático ya se revelan diferencias en cuanto al género en las FG-NUP reactivas a MAb414 (figura 17 E). A día de hoy no hay evidencias de dimorfismo sexual asociado a la expresión de las NUPs; sin embargo, en el marco de la ELA es conocido que el género influye en el fenotipo de los pacientes, sumándose a la edad y el lugar de inicio de la enfermedad, así como ciertas características clínicas (Blasco et al. 2012). Además, la mayoría de los estudios epidemiológicos muestran predominio masculino con una proporción de género de 1,2-1,5 hombres por mujer (Manjaly et al. 2010) aunque estas diferencias están estrechamente relacionadas con la edad (Blasco et al. 2012).

En este sentido, diversos estudios en modelos animales que presentan la mutación en el gen hSOD1, han demostrado que el género modifica el curso de la enfermedad y el tiempo de vida de estos. Los ratones y ratas machos transgénicos presentan un inicio de enfermedad más temprano que las hembras y un tiempo de vida más corto (Cacabelos et al. 2016c; Suzuki et al. 2007; Veldink et al. 2003). Investigaciones de nuestro grupo al respecto, han evidenciado que los ratones machos transgénicos presentan niveles incrementados de marcadores de oxidación lipídica, posiblemente debido a alteraciones en el complejo I mitocondrial que deriva en un aumento de ROS, el

cual es diferencial entre machos y hembras (Cacabelos et al. 2016c). Como dato interesante, en el propio estudio se demostró que las hembras G93A tenían incrementados los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA) el cual es un ácido graso polinsaturado con propiedades neuroprotectoras y que se encuentra disminuido en la médula espinal de pacientes con ELA (Cacabelos et al. 2016a; Ilieva et al. 2007). En este contexto, mediante un ensayo semicuantitativo, de detección de proteínas inflamatorias de ratón, comprobamos que, en las mismas médulas espinales donde medimos NUPs, la presencia de G93A se asocia a un evado estatus neuroinflamatorio en machos, comparado con las hembras transgénicas a estadio sintomático (ver Anexos). Lo anterior refuerza la hipótesis del dimorfismo sexual en el marco de este modelo de ELA. No obstante, a pesar que ningún vínculo previo se ha logrado establecer la relación entre la neuroinflamación y la expresión de NUPs; mediante un análisis *in silico* de interacción de genes se determinaron varios tipos de interacciones entre NUPs y citoquinas, principalmente a nivel de coexpresión e interacción génica (ver Anexos).

## **CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

1. Los niveles proteicos de las FG-NUP disminuyen en tejido de médula lumbar extraído *post mortem* de pacientes de ELA.
2. Los niveles proteicos de las FG-NUP disminuyen en núcleos aislados de tejido de médula lumbar y corteza frontal, extraído *post mortem* de pacientes de ELA.
3. Los núcleos neuronales de tejido de corteza frontal extraído *post mortem* de pacientes de ELA, presentan más daño oxidativo a ADN, comparado con los núcleos de células gliales.
4. En el modelo murino de ELA familiar SODG93A, disminuyen los niveles relativos de NUPs específicas como NUP93 y NUP107, evidenciándose en el estadio sintomático de la enfermedad, siendo el transgén y el sexo factores que inciden en los niveles diferenciales de nucleoporinas.
5. El silenciamiento de NUP107 provoca aumento de los niveles relativos de TDP-43, tanto en el compartimento nuclear como en el citoplasma, así como aumento en su fosforilación; lo cual apunta hacia el papel regulador de las NUPs en el metabolismo de TDP-43.
6. El silenciamiento de NUP107 altera el flujo autofágico evidenciado por el incremento de LC3II, p62 y los niveles de ubiquitinización global.
7. El estrés oxidativo y el estrés osmótico inducen un aumento de la deslocalización de TDP-43 e incrementa los niveles de FG-NUP.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## 6. BIBLIOGRAFÍA

Abhyankar MM, Urekar C, Reddi PP. A novel CpG-free vertebrate insulator silences Abhyankar MM, Urekar C, Reddi PP. A novel CpG-free vertebrate insulator silences the testis-specific SP-10 gene in somatic tissues: role for TDP-43 in insulator function. *J. Biol. Chem.* 2007 Dec 14;282(50):36143–54.

Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol. Cell.* 2007 Jul 6;27(1):53–66.

Aebischer P, Kato AC. Playing defense against Lou Gehrig's disease. *Sci. Am.* 2007 Nov;297(5):86–93.

Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C, King A, Al-Sarraj S, Van Den Berg LH. The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2012. p. 339–52.

Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, et al. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature.* 2007 Nov 29;450(7170):695–701.

Allen TD, Cronshaw JM, Bagley S, Kiseleva E, Goldberg MW. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J. Cell Sci.* 2000 May;1651–9.

Andersen PM. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2006;6(1):37–46.

Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;351(3):602–11.

Arianna R, Raffaella S, Regina Federico L, Melissa ME, Nicla R, Dennis DW, et al. Increased Cytoplasmic TDP-43 Reduces Global Protein Synthesis by Interacting with RACK1 on Polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.* 2017 Feb 1;

Armon C. An evidence-based medicine approach to the evaluation of the role of exogenous risk factors in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology.* 2003;22(4):217–28.

Armon C. Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. *Neurology.* 2009. p. 1693–8.

Ascherio A, Weisskopf MG, O'Reilly EJ, Jacobs EJ, McCullough ML, Calle EE, et al. Vitamin E intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 2005;57(1):104–10.

Aulas A, Vande Velde C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Front. Cell. Neurosci. Frontiers Media SA;* 2015 Oct 23;9:423.

- Ayala V, Granado-Serrano AB, Cacabelos D, Naudí A, Ilieva E V, Boada J, et al. Cell stress induces TDP-43 pathological changes associated with ERK1/2 dysfunction: implications in ALS. *Acta Neuropathol.* 2011a Sep;122(3):259–70.
- Ayala YM, De Conti L, Avendaño-Vázquez SE, Dhir A, Romano M, D'Ambrogio A, et al. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J.* 2011b;30(2):277–88.
- Ayala YM, Misteli T, Baralle FE. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008a Mar 11;105(10):3785–9.
- Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu Y-F, Petrucelli L, Buratti E, et al. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J. Cell Sci.* 2008b Nov 15;121(Pt 22):3778–85.
- Bano D, Hengartner MO, Nicotera P. Nuclear pore complex during neuronal degeneration: cracking the last barrier! *Nucleus.* Taylor & Francis; 2010;1(2):136–8.
- Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic. Biol. Med.* 2010 Mar 1;48(5):629–41.
- Barmada SJ, Serio A, Arjun A, Bilican B, Daub A, Ando DM, et al. Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models. *Nat. Chem. Biol.* Nature Publishing Group; 2014;10(8):677–85.
- Bayliss R, Littlewood T, Stewart M. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell.* 2000;102(1):99–108.
- Beard JD, Engel LS, Richardson DB, Gammon MD, Baird C, Umbach DM, et al. Military service, deployments, and exposures in relation to amyotrophic lateral sclerosis etiology. *Environ. Int.* 2016;91:104–15.
- Beghi E, Pupillo E, Messina P, Giussani G, Chiò A, Zoccolella S, et al. Coffee and amyotrophic lateral sclerosis: A possible preventive role. *Am. J. Epidemiol.* 2011;174(9):1002–8.
- Bendotti C, Marino M, Cheroni C, Fontana E, Crippa V, Poletti A, et al. Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response. *Prog. Neurobiol.* 2012 May;97(2):101–26.
- Bentmann E, Haass C, Dormann D. Stress granules in neurodegeneration - Lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS J.* 2013. p. 4348–70.
- Bentmann E, Neumann M, Tahirovic S, Rodde R, Dormann D, Haass C. Requirements for Stress Granule Recruitment of Fused in Sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43). *J. Biol. Chem.* 2012 Jun 29;287(27):23079–94.
- Bhattacharya A, Bokov A, Muller FL, Jernigan AL, Maslin K, Diaz V, et al.

- Dietary restriction but not rapamycin extends disease onset and survival of the H46R/H48Q mouse model of ALS. *Neurobiol. Aging*. 2012 Aug;33(8):1829–32.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. 1973 Nov;33(11):2643–52.
- Birch-Machin MA, Bowman A. Oxidative stress and ageing. *Br. J. Dermatol*. 2016 Oct;175:26–9.
- Birch-Machin MA, Swalwell H. How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. *Mutagenesis*. 2010 Mar 1;25(2):101–7.
- Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol*. 2005 Nov 21;171(4):603–14.
- Blasco H, Guennoc A-M, Veyrat-Durebex C, Gordon PH, Andres CR, Camu W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis: A hormonal condition? *Amyotroph. Lateral Scler*. 2012 Oct 8;13(6):585–8.
- van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2013 Jun 1;5(6):a011072.
- Blobel G, Potter VR. Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science*. 1966 Dec 30;154(3757):1662–5.
- Bocca B, Forte G, Oggiano R, Clemente S, Asara Y, Peruzzu A, et al. Level of neurotoxic metals in amyotrophic lateral sclerosis: A population-based case-control study. *J. Neurol. Sci*. 2015;359(1):11–7.
- Boehmer T, Enninga J, Dales S, Blobel G, Zhong H. Depletion of a single nucleoporin, Nup107, prevents the assembly of a subset of nucleoporins into the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2003 Feb 4;100(3):981–5.
- Bogdanov M, Brown RH, Matson W, Smart R, Hayden D, O'Donnell H, et al. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic. Biol. Med*. 2000a Oct 1;29(7):652–8.
- Bogdanov M, Brown RH, Matson W, Smart R, Hayden D, O'Donnell H, et al. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic. Biol. Med*. 2000b Oct 1;29(7):652–8.
- Bonvicini F, Marcello N, Mandrioli J, Pietrini V, Vinceti M. Exposure to pesticides and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. *Ann. Ist. Super. Sanita*. 2010;46(3):284–7.
- Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Shaw PJ, Turnbull DM. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann. Neurol*. 1999 Nov;46(5):787–90.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976 May 7;72:248–54.

Brady OA, Meng P, Zheng Y, Mao Y, Hu F. Regulation of TDP-43 aggregation by phosphorylation and p62/SQSTM1. *J. Neurochem.* 2011;116(2):248–59.

Braun RJ, Sommer C, Carmona-Gutierrez D, Khoury CM, Ring J, Büttner S, et al. Neurotoxic 43-kDa TAR DNA-binding protein (TDP-43) triggers mitochondrion-dependent programmed cell death in yeast. *J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2011 Jun 3;286(22):19958–72.

Vanden Broeck L, Callaerts P, Dermaut B. TDP-43-mediated neurodegeneration: towards a loss-of-function hypothesis? *Trends Mol. Med.* 2014 Feb;20(2):66–71.

Budini M, Baralle FE, Buratti E. Targeting TDP-43 in neurodegenerative diseases. *Expert Opin. Ther. Targets.* Taylor & Francis; 2014 Jun 20;18(6):617–32.

Buratti E. Functional Significance of TDP-43 Mutations in Disease. 2015. p. 1–53.

Buratti E, Baralle FE. The Molecular Links Between TDP-43 Dysfunction and Neurodegeneration. *Adv. Genet.* 1st ed. Elsevier Inc.; 2009. p. 1–34.

Buratti E, Baralle FE. TDP-43: Gumming up neurons through protein-protein and protein-RNA interactions. *Trends Biochem. Sci.* 2012. p. 237–47.

Buratti E, Brindisi A, Giombi M, Tisminetzky S, Ayala YM, Baralle FE. TDP-43 Binds Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A/B through Its C-terminal Tail: AN IMPORTANT REGION FOR THE INHIBITION OF CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR EXON 9 SPLICING. *J. Biol. Chem.* 2005 Nov 11;280(45):37572–84.

Cacabelos D, Ayala V, Granado-Serrano AB, Jov? M, Torres P, Boada J, et al. Interplay between TDP-43 and docosahexaenoic acid-related processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 2016a Apr;88:148–60.

Cacabelos D, Ayala V, Ramírez-Núñez O, Granado-Serrano AB, Boada J, Serrano JCE, et al. Dietary Lipid Unsaturation Influences Survival and Oxidative Modifications of an Amyotrophic Lateral Sclerosis Model in a Gender-Specific Manner. *NeuroMolecular Med.* 2014;

Cacabelos D, Ramírez-Núñez O, Granado-Serrano AB, Torres P, Ayala V, Moiseeva V, et al. Early and gender-specific differences in spinal cord mitochondrial function and oxidative stress markers in a mouse model of ALS. *Acta Neuropathol. Commun. BioMed Central*; 2016b Jan 13;4:3.

Cacabelos D, Ramírez-Núñez O, Granado-Serrano AB, Torres P, Ayala V, Moiseeva V, et al. Early and gender-specific differences in spinal cord mitochondrial function and oxidative stress markers in a mouse model of ALS. *Acta Neuropathol. Commun.* 2016c Jan 13;4(1):3.

- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002 Jan 3;415(6867):92–6.
- Callaghan B, Feldman D, Gruis K, Feldman E. The association of exposure to lead, mercury, and selenium and the development of amyotrophic lateral sclerosis and the epigenetic implications. *Neurodegener. Dis. Karger Publishers*; 2011;8(1–2):1–8.
- Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol*. 2006;7(10):R100.
- Cascianelli G, Villani M, Tosti M, Marini F, Bartoccini E, Magni MV, et al. Lipid microdomains in cell nucleus. *Mol. Biol. Cell. American Society for Cell Biology*; 2008 Dec;19(12):5289–95.
- Chakravarti B, Chakravarti DN. Oxidative modification of proteins: age-related changes. *Gerontology*. 2007;53(3):128–39.
- Chalupnikova K, Lattmann S, Selak N, Iwamoto F, Fujiki Y, Nagamine Y. Recruitment of the RNA Helicase RHAU to Stress Granules via a Unique RNA-binding Domain. *J. Biol. Chem*. 2008 Dec 12;283(50):35186–98.
- Chancellor AM, Slattery JM, Fraser H, Warlow CP. Risk factors for motor neuron disease: a case-control study based on patients from the Scottish Motor Neuron Disease Register. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1993 Nov;56(11):1200–6.
- Chen-plotkin AS, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2010 Apr 16;6(4):211–20.
- Chen L, Liu B. Relationships between Stress Granules, Oxidative Stress, and Neurodegenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2017;2017:1–10.
- Chen S, Zhang X, Song L, Le W. Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol*. 2012 Jan;22(1):110–6.
- Chen Y, Liu H, Guan Y, Wang Q, Zhou F, Jie L, et al. The altered autophagy mediated by TFEB in animal and cell models of amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Transl. Res. e-Century Publishing Corporation*; 2015;7(9):1574–87.
- Chiang P-M, Ling J, Jeong YH, Price DL, Aja SM, Wong PC. Deletion of TDP-43 down-regulates Tbc1d1, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*; 2010 Sep 14;107(37):16320–4.
- Chiò A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain*. 2005;128(Pt 3):472–6.
- Chiò A, Borghero G, Pugliatti M, Ticca A, Calvo A, Moglia C, et al. Large proportion of amyotrophic lateral sclerosis cases in Sardinia due to a single founder mutation of the TARDBP gene. *Arch. Neurol*. 2011 May 1;68(5):594–8.

Chiò A, Calvo A, Moglia C, Restagno G, Ossola I, Brunetti M, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis–Frontotemporal Lobar Dementia in 3 Families With p.Ala382Thr TARDBP Mutations. *Arch. Neurol.* 2010 Aug 1;67(8):1002–9.

Chiò A, Traynor BJ, Lombardo F, Fimognari M, Calvo A, Ghiglione P, et al. Prevalence of SOD1 mutations in the Italian ALS population. *Neurology.* 2008;70(7):533–7.

Choi AMK, Ryter SW. Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(7):651–62.

Ciura S, Lattante S, Le Ber I, Latouche M, Tostivint H, Brice A, et al. Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 2013;74(2):180–7.

Clarkson WD, Kent HM, Stewart M. Separate Binding Sites on Nuclear Transport Factor 2 (NTF2) for GDP-Ran and the Phenylalanine-rich Repeat Regions of Nucleoporins p62 and Nsp1p. *J. Mol. Biol.* 1996 Nov 8;263(4):517–24.

Coakes SJ, Steed L, Price J. SPSS: Analysis Without Anguish; version 15.0 for Windows. SPSS Wind. 2008. p. 270.

Cohen TJ, Hwang AW, Restrepo CR, Yuan C-X, Trojanowski JQ, Lee VMY. An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity. *Nat. Commun. NIH Public Access;* 2015 Jan 5;6:5845.

Cohen TJ, Hwang AW, Unger T, Trojanowski JQ, Lee VMY. Redox signalling directly regulates TDP-43 via cysteine oxidation and disulphide cross-linking. *EMBO J.* 2012 Mar 7;31(5):1241–52.

Cohen TJ, Lee VMY, Trojanowski JQ. TDP-43 functions and pathogenic mechanisms implicated in TDP-43 proteinopathies. *Trends Mol. Med.* 2011. p. 659–67.

Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, Buratti E, et al. TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J. Neurochem.* 2009 Nov;111(4):1051–61.

Contestabile A. Oxidative stress in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr. Top. Med. Chem.* 2001 Dec;1(6):553–68.

De Conti L, Akinyi M V, Mendoza-Maldonado R, Romano M, Baralle M, Buratti E. TDP-43 affects splicing profiles and isoform production of genes involved in the apoptotic and mitotic cellular pathways. *Nucleic Acids Res.* 2015 Oct 15;43(18):8990–9005.

Cook A, Bono F, Jinek M, Conti E. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu. Rev. Biochem.* 2007;76:647–71.

Cooper-Knock J, Higginbottom A, Stopford MJ, Highley JR, Ince PG, Wharton SB, et al. Antisense RNA foci in the motor neurons of C9ORF72-ALS patients are associated with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol.* 2015 Jul 6;130(1):63–75.

- Cooper-Knock J, Shaw PJ, Kirby J. The widening spectrum of C9ORF72-related disease; genotype/phenotype correlations and potential modifiers of clinical phenotype. *Acta Neuropathol.* 2014 Mar 4;127(3):333–45.
- Coppede F. An overview of DNA repair in amyotrophic lateral sclerosis. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:1679–91.
- Cosgrove JP, Church DF, Pryor WA. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 1987 May;22(5):299–304.
- Coyne AN, Siddegowda BB, Estes PS, Johannesmeyer J, Kovalik T, Daniel SG, et al. Futsch/MAP1B mRNA is a translational target of TDP-43 and is neuroprotective in a Drosophila model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 2014 Nov 26;34(48):15962–74.
- Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ. Ethnic variation in the incidence of ALS: A systematic review. *Neurology.* 2007;68(13):1002–7.
- D'Angelo MA, Raices M, Panowski SH, Hetzer MW. Age-Dependent Deterioration of Nuclear Pore Complexes Causes a Loss of Nuclear Integrity in Postmitotic Cells. *Cell.* 2009 Jan;136(2):284–95.
- D'angelo MA, Raices M, Panowski SH, Hetzer MW, D'Angelo MA, Raices M, et al. Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in post-mitotic cells. *Cell.* 2009 Jan;136(2):284–95.
- Dal Canto MC, Gurney ME. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res.* 1995 Apr 3;676(1):25–40.
- Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med. Wiley-Blackwell;* 2006;10(2):389–406.
- Dehay B, Bove J, Rodriguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, et al. Pathogenic Lysosomal Depletion in Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 2010 Sep 15;30(37):12535–44.
- Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Dries DR, Mayer P, Good SK, et al. TDP-43 Is Directed to Stress Granules by Sorbitol, a Novel Physiological Osmotic and Oxidative Stressor. *Mol. Cell. Biol.* 2011 Mar 1;31(5):1098–108.
- Dodge JC, Treleaven CM, Pacheco J, Cooper S, Bao C, Abraham M, et al. Glycosphingolipids are modulators of disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences;* 2015 Jun 30;112(26):8100–5.
- Doucet CM, Hetzer MW. Nuclear pore biogenesis into an intact nuclear envelope. *Chromosoma.* Springer-Verlag; 2010 Oct 19;119(5):469–77.
- Duan W, Li X, Shi J, Guo Y, Li Z, Li C. Mutant TAR DNA-binding protein-43 induces oxidative injury in motor neuron-like cell. *Neuroscience.* 2010 Sep 15;169(4):1621–9.

Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar J-L, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, et al. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2008 Mar 25;70(13):1004–9.

Edbauer D, Haass C. An amyloid-like cascade hypothesis for C9orf72 ALS/FTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2016 Feb;36:99–106.

van Eersel J, Ke YD, Gladbach A, Bi M, Götz J, Kril JJ, et al. Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon proteasome inhibition in cultured neurons. *PLoS One*. 2011;6(7):e22850.

Fang F, Kwee LC, Allen KD, Umbach DM, Ye W, Watson M, et al. Association between blood lead and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Epidemiol.* 2010;171(10):1126–33.

Farese R V., Walther TC. Lipid droplets go nuclear. *J. Cell Biol.* 2016 Jan 4;212(1):7–8.

Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson a J, Sendtner M, Shaw PJ. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 2011;7(11):616–30.

Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, et al. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 1997 Nov;69(5):2064–74.

Ferrarese C, Sala G, Riva R, Begni B, Zoia C, Tremolizzo L, et al. Decreased platelet glutamate uptake in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2001 Jan 23;56(2):270–2.

Finan JD, Leddy HA, Guilak F. Osmotic stress alters chromatin condensation and nucleocytoplasmic transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011.

Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* 2004 Feb;185(2):232–40.

Floch AG, Taresté D, Fuchs PFJ, Chadrin A, Naciri I, Léger T, et al. Nuclear pore targeting of the yeast Pom33 nucleoporin depends on karyopherin and lipid binding. *J. Cell Sci.* 2015;128(2).

Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, et al. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105(6):2052–7.

Fournier M-J, Gareau C, Mazroui R. The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules. *Cancer Cell Int.* 2010 Apr 29;10(1):12.

Frake RA, Ricketts T, Menzies FM, Rubinsztein DC, Riess O, Rubinsztein D. Autophagy and neurodegeneration. *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*; 2015 Jan 2;125(1):65–74.

Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP. Global Analysis of TDP-43 Interacting Proteins Reveals Strong Association with RNA Splicing and

- Translation Machinery. *J. Proteome Res.* 2010 Feb 5;9(2):1104–20.
- Freibaum BD, Lu Y, Lopez-Gonzalez R, Kim NC, Almeida S, Lee K-H, et al. GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature.* 2015 Aug 26;525(7567):129–33.
- Füllgrabe J, Klionsky DJ, Joseph B. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014 Dec 11;15(1):65–74.
- Funasaka T, Tsuka E, Wong RW. Regulation of autophagy by nucleoporin Tpr. *Sci. Rep.* 2012;2:878.
- Gallo V, Bueno-De-Mesquita HB, Vermeulen R, Andersen PM, Kyrozis A, Linseisen J, et al. Smoking and risk for amyotrophic lateral sclerosis: Analysis of the EPIC cohort. *Ann. Neurol.* 2009;65(4):378–85.
- Gallo V, Vanacore N, Bueno-de-Mesquita HB, Vermeulen R, Brayne C, Pearce N, et al. Physical activity and risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis in a prospective cohort study. *Eur. J. Epidemiol.* 2016;31(3):255–66.
- Gasset-Rosa F, Chillon-Marinas C, Goginashvili A, Atwal RS, Artates JW, Tabet R, et al. Polyglutamine-Expanded Huntingtin Exacerbates Age-Related Disruption of Nuclear Integrity and Nucleocytoplasmic Transport. *Neuron.* 2017 Apr 5;94(1):48–57.e4.
- Gendron TF, Bieniek KF, Zhang Y-J, Jansen-West K, Ash PEA, Caulfield T, et al. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol.* 2013 Dec 16;126(6):829–44.
- González-Aguilera C, Askjaer P. Dissecting the NUP107 complex: multiple components and even more functions. *Nucleus.* 2012;3(4):340–8.
- Goodier JL, Zhang L, Vetter MR, Kazazian HH. LINE-1 ORF1 Protein Localizes in Stress Granules with Other RNA-Binding Proteins, Including Components of RNA Interference RNA-Induced Silencing Complex. *Mol. Cell. Biol.* 2007 Sep 15;27(18):6469–83.
- Gou-Fabregas M, Ramírez-Núñez O, Cacabelos D, Bahi N, Portero M, Garcera A, et al. Calpain activation and CaMKIV reduction in spinal cords from hSOD1G93A mouse model. *Mol. Cell. Neurosci. Academic Press Inc.;* 2014;61:219–25.
- Goulet I, Boisvenue S, Moka S, Mazroui R, Cote J. TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules. *Hum. Mol. Genet.* 2008 Jul 9;17(19):3055–74.
- Govoni V, Cesnik E, Casetta I, Tugnoli V, Tola MR, Granieri E. Temporal trend of amyotrophic lateral sclerosis incidence in southern Europe: a population study in the health district of Ferrara, Italy. *J. Neurol. Springer-Verlag;* 2012 Aug 10;259(8):1623–31.
- Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJA. Selective degradation of oxidatively

- modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003 Jun 6;305(3):709–18.
- Guenther GG, Edinger AL. A new take on ceramide: Starving cells by cutting off the nutrient supply. *Cell Cycle.* Taylor & Francis; 2009 Apr 15;8(8):1122–6.
- Guenther GG, Peralta ER, Rosales KR, Wong SY, Siskind LJ, Edinger AL. Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences;* 2008 Nov 11;105(45):17402–7.
- Guerrero EN, Wang H, Mitra J, Hegde PM, Stowell SE, Liachko NF, et al. TDP-43/FUS in motor neuron disease: Complexity and challenges. *Prog. Neurobiol.* Elsevier Ltd; 2016;145–146:78–97.
- Guo L, Shorter J. Biology and Pathobiology of TDP-43 and Emergent Therapeutic Strategies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016 Dec 5;a024554.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science.* 1994 Jun 17;264(5166):1772–5.
- Gusel'nikova V V, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae.* 7(2):42–7.
- Hardiman O, Chalabi A Al, Brayne C, Beghi E, van den Berg LH, Chio A, et al. The changing picture of amyotrophic lateral sclerosis: lessons from European registers. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2017 Mar 11;jnnp-2016-314495.
- Henriques A, Croixmarie V, Priestman DA, Rosenbohm A, Dirrig-Grosch S, D'Ambra E, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. *Hum. Mol. Genet.* Oxford University Press; 2015 Dec 20;24(25):7390–405.
- Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012 Jan 18;13(2):89–102.
- Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The Unfolded Protein Response: Integrating Stress Signals Through the Stress Sensor IRE1. *Physiol. Rev.* 2011 Oct 1;91(4):1219–43.
- Hetz C, Thielen P, Matus S, Nassif M, Court F, Kiffin R, et al. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* 2009;23(19):2294–306.
- Hetzer MW. The role of the nuclear pore complex in aging of post-mitotic cells. *Aging (Albany. NY).* 2010 Mar 2;2(2):74–5.
- Hoelz A, Debler EW, Blobel G. The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:613–43.
- Horner RD, Feussner JR, Kasarskis EJ. Prospective study of military service and mortality from ALS. *Neurology.* 2005 Jul 12;65(1):180-1-1.

Huang R, Guo X, Chen X, Zheng Z, Wei Q, Cao B, et al. The serum lipid profiles of amyotrophic lateral sclerosis patients: A study from south-west China and a meta-analysis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener. Informa Healthcare*; 2015 Aug 27;16(5–6):359–65.

Ibarra A, Hetzer MW. Nuclear pore proteins and the control of genome functions. *Genes Dev.* 2015;29(4):337–49.

Igaz LM, Kwong LK, Chen-Plotkin A, Winton MJ, Unger TL, Xu Y, et al. Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies. *J. Biol. Chem.* 2009 Mar 27;284(13):8516–24.

Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa J, Hasegawa M, et al. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol. Dis.* 2012 Mar;45(3):862–70.

Ikawa M, Okazawa H, Tsujikawa T, Matsunaga A, Yamamura O, Mori T, et al. Increased oxidative stress is related to disease severity in the ALS motor cortex: A PET study. *Neurology.* 2015 May 19;84(20):2033–9.

Ilieva E V, Ayala V, Jové M, Dalfó E, Cacabelos D, Povedano M, et al. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2007 Dec;130(Pt 12):3111–23.

Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Epidemiol.* Dove Press; 2015;7:181–93.

Ito Y, Yamada M, Tanaka H, Aida K, Tsuruma K, Shimazawa M, et al. Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiol. Dis.* 2009;36(3):470–6.

Jiang Z, Wang W, Perry G, Zhu X, Wang X. Mitochondrial dynamic abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Transl. Neurodegener. BioMed Central*; 2015 Dec 5;4(23):14.

de Jong SW, Huisman MHB, Suttedja NA, van der Kooij AJ, de Visser M, Schelhaas HJ, et al. Smoking, Alcohol Consumption, and the Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Population-based Study. *Am. J. Epidemiol.* 2012 Aug 1;176(3):233–9.

Josephs KA, Whitwell JL, Weigand SD, Murray ME, Tosakulwong N, Liesinger AM, et al. TDP-43 is a key player in the clinical features associated with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2014 Jun 23;127(6):811–24.

Jovičić A, Paul JW, Gitler AD. Nuclear transport dysfunction: a common theme in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *J. Neurochem.* 2016;138:134–44.

Ju JS, Fuentealba RA, Miller SE, Jackson E, Piwnicka-Worms D, Baloh RH, et al. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J. Cell Biol.* 2009;187(6):875–88.

- Kabeya Y. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19(21):5720–8.
- Kabuta T, Suzuki Y, Wada K. Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 2006 Oct 13;281(41):30524–33.
- Kamel F, Umbach DM, Bedlack RS, Richards M, Watson M, Alavanja MCRR, et al. Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology.* 2012 Jun;33(3):457–62.
- Kamel F, Umbach DM, Munsat TL, Shefner JM, Hu H, Sandler DP. Lead exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Epidemiology.* 2002;13:311–9.
- Kamentsky L, Jones TR, Fraser A, Bray M-A, Logan DJ, Madden KL, et al. Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics.* 2011 Apr 15;27(8):1179–80.
- Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev.* 2015 May;21:16–29.
- Kandola K, Bowman A, Birch-Machin MA. Oxidative stress - a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2015 Dec;37:1–8.
- Kaneb HM, Folkmann AW, Belzil V V, Jao L-E, Leblond CS, Girard SL, et al. Deleterious mutations in the essential mRNA metabolism factor, hGle1, in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* Oxford University Press; 2015 Mar 1;24(5):1363–73.
- Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene.* 2016. p. 109–18.
- Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 2012 Aug;22(8):407–17.
- Kawahara Y, Mieda-Sato A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012 Feb 28;109(9):3347–52.
- Kedersha N, Anderson P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):963–9.
- Khosravi B, Hartmann H, May S, Möhl C, Ederle H, Michaelson M, et al. Cytoplasmic poly-GA aggregates impair nuclear import of TDP-43 in *C9orf72* ALS/FTLD. *Hum. Mol. Genet.* 2016 Dec 30;3:ddw432.
- Kinoshita Y, Ito H, Hirano A, Fujita K, Wate R, Nakamura M, et al. Nuclear Contour Irregularity and Abnormal Transporter Protein Distribution in Anterior Horn Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2009 Nov;68(11):1184–92.

Kirby J, Al Sultan A, Waller R, Heath P. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degener. Neurol. Neuromuscul. Dis.* Dove Press; 2016 May 13;Volume 6:49.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin J, Abeliovich H, Bartolom A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy ( 3rd edition ). 2016;12(1):1–222.

Klionsky DJ, Elazar Z, Seglen PO, Rubinsztein DC. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy.* 2008;4(7):849–50.

Kodiha M, Tran D, Qian C, Morogan A, Presley JF, Brown CM, et al. Oxidative stress mislocalizes and retains transport factor importin- $\alpha$  and nucleoporins Nup153 and Nup88 in nuclei where they generate high molecular mass complexes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2008;1783(3):405–18.

Köhler A, Hurt E, Köhler A, Hurt E. Gene Regulation by Nucleoporins and Links to Cancer. *Mol. Cell.* 2010;38(1):6–15.

Koppers M, Blokhuis AM, Westeneng H-J, Terpstra ML, Zundel CAC, Vieira de Sá R, et al. C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann. Neurol.* 2015 Sep;78(3):426–38.

Kosako H, Imamoto N. Phosphorylation of nucleoporins: signal transduction-mediated regulation of their interaction with nuclear transport receptors. *Nucleus.* Taylor & Francis; 2010;1(4):309–13.

Kosako H, Yamaguchi N, Aranami C, Ushiyama M, Kose S, Imamoto N, et al. Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009;16(10):1026–35.

Kostic Dedic SI, Stevic Z, Dedic V, Stojanovic VR, Milicev M, Lavrnic D. Is hyperlipidemia correlated with longer survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis? *Neurol. Res.* 2012 Jul 1;34(6):576–80.

Krishna A, Biryukov M, Trefois C, Antony PM, Hussong R, Lin J, et al. Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease.

Kruger NJ. The Bradford Method for Protein Quantitation. *Basic Protein Pept. Protoc.* New Jersey: Humana Press; 1994. p. 9–16.

Kuo PH, Doudeva LG, Wang YT, Shen CKJ, Yuan HS. Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(6):1799–808.

Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Görlich D. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell.* 1997 Sep 19;90(6):1061–71.

Kwan JY, Jeong SY, van Gelderen P, Deng HX, Quezado MM, Danielian LE, et al. Iron accumulation in deep cortical layers accounts for MRI signal abnormalities in ALS: Correlating 7 tesla MRI and pathology. *PLoS One.*

2012;7(4).

Kwon I, Xiang S, Kato M, Wu L, Theodoropoulos P, Wang T, et al. Polydipeptides encoded by the C9orf72 repeats bind nucleoli, impede RNA biogenesis, and kill cells. *Science* (80-. ). 2014;345(6201):1139–45.

Lacorte E, Ferrigno L, Leoncini E, Corbo M, Boccia S, Vanacore N. Physical activity, and physical activity related to sports, leisure and occupational activity as risk factors for ALS: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2016 Jul;66:61–79.

Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 2010 Apr 15;19(R1):R46–64.

Lammoglia MF, Lozano R, García C, Avilez C, Trejo V, Muñoz R, et al. La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investig. en discapacidad.* 2016;5(2):116–28.

Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin. *J. Biol. Chem.* 2007 Feb 23;282(8):5101–5.

Lattante S, Rouleau GA, Kabashi E. TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. *Hum. Mutat.* 2013 Jun;34(6):812–26.

Leary S, Anthony R, Cartner S, Grandin T, Ann McCrackin M, Meyer R, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition Members of the Panel on Euthanasia.

Lee EB, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011 Nov 30;13(1):38–50.

Lee JK, Shin JH, Lee JE, Choi E-J. Role of autophagy in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2015 Nov;1852(11):2517–24.

Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2002 Feb 15;16(4):452–66.

Lehman EJ, Hein MJ, Baron SL, Gersic CM. Neurodegenerative causes of death among retired national football league players. *Neurology.* 2012;79(19):1970–4.

Leigh PN, Anderton BH, Dodson A, Gallo JM, Swash M, Power DM. Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neurosci. Lett.* 1988 Nov 11;93(2–3):197–203.

Levine TP, Daniels RD, Gatta AT, Wong LH, Hayes MJ. The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related

- to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics*. 2013 Feb 15;29(4):499–503.
- Li A, Zhang X, Le W. Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy*. 2008;4(3):290–3.
- Li W, Li J, Bao J. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci*. 2012 Apr 12;69(7):1125–36.
- Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J. Cell Biol*. 2013. p. 361–72.
- Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int. J. Biochem. Mol. Biol*. 2013. p. 1–26.
- Lin Y-C, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat. Commun. Nature Publishing Group*; 2014 Sep 3;5(11):4767.
- Ling JP, Pletnikova O, Troncoso JC, Wong PC. TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science*. 2015 Aug 7;349(6248):650–5.
- Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang Y-J, Vanderwyde T, Citro A, Mehta T, et al. Tar DNA Binding Protein-43 (TDP-43) Associates with Stress Granules: Analysis of Cultured Cells and Pathological Brain Tissue. Bush AI, editor. *PLoS One*. 2010 Oct 11;5(10):e13250.
- Liu MS, Cui LY, Fan DS, Chinese ALS Association. Age at onset of amyotrophic lateral sclerosis in China. *Acta Neurol. Scand*. 2014 Mar;129(3):163–7.
- Liu Y-J, Ju T-C, Chen H-M, Jang Y-S, Lee L-M, Lai H-L, et al. Activation of AMP-activated protein kinase 1 mediates mislocalization of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet. Oxford University Press*; 2015 Feb 1;24(3):787–801.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013 Jun;153(6):1194–217.
- Lowe J, Lennox G, Jefferson D, Morrell K, McQuire D, Gray T, et al. A filamentous inclusion body within anterior horn neurones in motor neurone disease defined by immunocytochemical localisation of ubiquitin. *Neurosci. Lett*. 1988 Nov 22;94(1–2):203–10.
- Mackenzie IRA, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann. Neurol*. 2007;61(5):427–34.
- Mackenzie IRA, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol. Elsevier Ltd*; 2010;9(10):995–1007.
- MacLeod RAF, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H, Drexler HG.

Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int. J. Cancer*. 1999;83(4):555–63.

Maekawa S, Leigh PN, King A, Jones E, Steele JC, Bodi I, et al. TDP-43 is consistently co-localized with ubiquitinated inclusions in sporadic and Guam amyotrophic lateral sclerosis but not in familial amyotrophic lateral sclerosis with and without SOD1 mutations. *Neuropathology*. 2009 Dec;29(6):672–83.

Magrane J, Cortez C, Gan W-B, Manfredi G. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum. Mol. Genet.* 2014 Mar 15;23(6):1413–24.

Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EGP, Waite A, Rollinson S, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: A cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2012;11(4):323–30.

Majumder P, Chu J-F, Chatterjee B, Swamy KBS, Shen C-KJ. Co-regulation of mRNA translation by TDP-43 and Fragile X Syndrome protein FMRP. *Acta Neuropathol*. 2016 Nov 12;132(5):721–38.

Malek AM, Barchowsky A, Bowser R, Youk A, Talbott EO. Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis of epidemiological studies. *Environ. Res*. 2012 Aug;117:112–9.

Manjaly ZR, Scott KM, Abhinav K, Wijesekera L, Ganesalingam J, Goldstein LH, et al. The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Amyotroph Lateral Scler*. 2010;11(5):439–42.

Marangi G, Traynor BJ. Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: New genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges. *Brain Res*. 2015. p. 75–93.

Martin LJ. p53 Is Abnormally Elevated and Active in the CNS of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiol. Dis*. 2000 Dec;7(6):613–22.

Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, et al. Mutated Human SOD1 Causes Dysfunction of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria of Transgenic Mice. *J. Biol. Chem*. 2002 Aug 9;277(33):29626–33.

Matus S, Valenzuela V, Medinas DB, Hetz C. ER dysfunction and protein folding stress in ALS. *Int. J. Cell Biol*. Hindawi Publishing Corporation; 2013 p. 674751.

McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EMC, Greensmith L. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis*. 2013 Sep;1832(9):1421–36.

Mészáros N, Cibulka J, Mendiburo MJ, Romanauska A, Schneider M, Köhler A. Nuclear pore basket proteins are tethered to the nuclear envelope and can regulate membrane curvature. *Dev. Cell*. Elsevier; 2015 May 4;33(3):285–98.

Meyerowitz J, Parker SJ, Vella LJ, Ng DC, Price KA, Liddell JR, et al. C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by

oxidative stress. *Mol. Neurodegener.* 2011 Aug 8;6(1):57.

Michal Freedman D, Kuncl RW, Weinstein SJ, Malila N, Virtamo J, Albanes D. Vitamin E serum levels and controlled supplementation and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 2013;14(4):246–51.

Mizielinska S, Gronke S, Niccoli T, Ridler CE, Clayton EL, Devoy A, et al. C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in *Drosophila* through arginine-rich proteins. *Science (80- )*. 2014;345(6201):1192–4.

Mizielinska S, Isaacs AM. C9orf72 amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: gain or loss of function? *Curr. Opin. Neurol.* Wolters Kluwer Health; 2014 Oct;27(5):515–23.

Mor A, White MA, Fontoura BM. Nuclear Trafficking in Health and Disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2014 Jun;28:28–35.

Morgan S, Orrell RW. Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Br. Med. Bull. Oxford University Press*; 2016 Sep;119(July):1–11.

Mori K, Arzberger T, Grässer FA, Gijssels I, May S, Rentzsch K, et al. Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathol.* 2013a;126(6):881–93.

Mori K, Weng S-M, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, et al. The C9orf72 GGGGCC Repeat Is Translated into Aggregating Dipeptide-Repeat Proteins in FTL/ALS. *Science (80- )*. 2013b Mar 15;339(6125):1335–8.

Morris J. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Related Motor Neuron Diseases: An Overview. *Neurodiagn. J. Routledge*; 2015 Sep 11;55(3):180–94.

Mosammaparast N, Pemberton LF. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol.* 2004 Oct;14(10):547–56.

Motulsky HJ. Common misconceptions about data analysis and statistics. *Br. J. Pharmacol.* 2015;172(8):2126–32.

Nardo G, Pozzi S, Pignataro M, Lauranzano E, Spano G, Garbelli S, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis Multiprotein Biomarkers in Peripheral Blood Mononuclear Cells. Pant H, editor. *PLoS One. Public Library of Science*; 2011 Oct 5;6(10):e25545.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science (80- )*. 2006a Oct 6;314(5796):130–3.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2006b Oct 6;314(5796):130–3.

Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al.

Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* 2016 Aug 22;53(6):4094–125.

Nieves JW, Gennings C, Factor-Litvak P, Hupf J, Singleton J, Sharf V, et al. Association Between Dietary Intake and Function in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* American Medical Association; 2016 Dec 1;73(12):1425.

Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HCA, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 2004 Nov;75(5):822–31.

Nishimura AL, Zupunski V, Troakes C, Kathe C, Fratta P, Howell M, et al. Nuclear import impairment causes cytoplasmic trans-activation response DNA-binding protein accumulation and is associated with frontotemporal lobar degeneration. *Brain.* 2010 Jun 1;133(6):1763–71.

Nofrini V, Di Giacomo D, Mecucci C. Nucleoporin genes in human diseases. *Eur. J. Hum. Genet.* 2016 Apr 13;(February):1–7.

Okamoto K, Kihira T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, et al. Fruit and vegetable intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Neuroepidemiology.* 2009a;32(4):251–6.

Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, et al. Lifestyle Factors and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case-Control Study in Japan. *Ann. Epidemiol.* 2009b;19(6):359–64.

Otten EG, Manni D, Korolchuk VI. Mitochondrial Degradation, Autophagy and Neurodegenerative Disease. *Mitochondrial Dysfunct. Neurodegener. Disord.* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 255–78.

Ou SH, Wu F, Harrich D, García-Martínez LF, Gaynor RB. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J. Virol.* 1995 Jun;69(6):3584–96.

Paganoni S, Deng J, Jaffa M, Cudkowicz ME, Wills A-M. Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2011 Jul;44(1):20–4.

Parakh S, Spencer DM, Halloran MA, Soo KY, Atkin JD. Redox Regulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013;2013:1–12.

Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Crouch PJ, Kanninen KM, et al. Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates. *Neurochem. Int.* 2012 Mar;60(4):415–24.

Patel SS, Rexach MF. Discovering Novel Interactions at the Nuclear Pore Complex Using Bead Halo. *Mol. Cell. Proteomics.* 2008 Jan;7(1):121–31.

Peters TL, Kamel F, Lundholm C, Feychting M, Weibull CE, Sandler DP, et al. Occupational exposures and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Occup.*

Environ. Med. 2016;117(9):1387–92.

Prpar Mihevc S, Darovic S, Kovanda A, Bajc Česnik A, Župunski V, Rogelj B. Nuclear trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Brain*. 2017 Jan;140(Pt 1):13–26.

Pujol G, Söderqvist H, Radu A. Age-associated reduction of nuclear protein import in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;294(2):354–8.

Pupillo E, Messina P, Giussani G, Logroscino G, Zoccolella S, Chiò A, et al. Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: A European population-based case-control study. *Ann. Neurol.* 2014 May;75(5):708–16.

Rabut G, Doye V, Ellenberg J. Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat. Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2004 Nov 24;6(11):1114–21.

Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques.* 2009 Apr;46(4):277–84.

Raices M, D'Angelo MA. Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012 Oct 23;13(11):687–99.

Raices M, D'Angelo MA. Nuclear pore complexes and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2017 Jun;46:26–32.

Ravikumar B, Futter M, Jahreiss L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, et al. Mammalian macroautophagy at a glance. *J. Cell Sci.* 2009 Jun 1;122(Pt 11):1707–11.

Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* 2004 Jun 16;36(6):585–95.

Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* NIH Public Access; 2014 Jan;17(1):17–23.

Riancho J, Gonzalo I, Ruiz-Soto M, Berciano J. ¿Por qué degeneran las motoneuronas? Actualización en la patogenia de la esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología.* 2016;

Riku Y, Atsuta N, Yoshida M, Tatsumi S, Iwasaki Y, Mimuro M, et al. Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy: a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open.* 2014;4(5):e005213.

Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* Nature Publishing Group; 2013 Mar 6;14(4):1–17.

Romano V, Quadri Z, Baralle FE, Buratti E. The structural integrity of TDP-43 N-terminus is required for efficient aggregate entrapment and consequent loss of

protein function. *Prion*. 2015 Jan 2;9(1):1–9.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):519–29.

Roos PM, Lierhagen S, Flaten TP, Syversen T, Vesterberg O, Nordberg M. Manganese in cerebrospinal fluid and blood plasma of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2012;237(7):803–10.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993 Mar 4;362(6415):59–62.

Rowland LP. How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot. *Arch. Neurol.* 2001 Mar;58(3):512–5.

Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2001 May 31;344(22):1688–700.

Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. Nature Publishing Group; 2006 Oct 19;443(7113):780–6.

Ruckenstuhl C, Netzerberger C, Entfellner I, Carmona-Gutierrez D, Kickenweiz T, Stekovic S, et al. Lifespan Extension by Methionine Restriction Requires Autophagy-Dependent Vacuolar Acidification. Kim SK, editor. *PLoS Genet.* 2014 May 1;10(5):e1004347.

Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J. Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurol. Clin. NIH Public Access*; 2015 Nov;33(4):855–76.

Sasaki S. Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2011 May 1;70(5):349–59.

Sasaki S, Maruyama S. Synapse loss in anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 1994;88(3):222–7.

Savas JN, Toyama BH, Xu T, Yates JR, Hetzer MW. Extremely Long-Lived Nuclear Pore Proteins in the Rat Brain. *Science* (80-. ). 2012 Feb 24;335(6071):942–942.

Saxena S, Caroni P. Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron*. 2011 Jul 14;71(1):35–48.

SC Y, Muralidhara. Beneficial Role of Coffee and Caffeine in Neurodegenerative Diseases: A Minireview. *AIMS Public Heal.* 2016;3(2):407–22.

Schwartz TU. Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005 Apr;15(2):221–6.

Scotter EL, Chen H-J, Shaw CE. TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into

Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics*. Springer US; 2015 Apr 5;12(2):352–63.

Scotter EL, Vance C, Nishimura AL, Lee Y-B, Chen H-J, Urwin H, et al. Differential roles of the ubiquitin proteasome system and autophagy in the clearance of soluble and aggregated TDP-43 species. *J. Cell Sci.* 2014 Mar 15;127(Pt 6):1263–78.

Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*; 1982 Mar;79(6):1889–92.

Shahrizaila N, Sobue G, Kuwabara S, Kim SH, Birks C, Fan DS, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and motor neuron syndromes in Asia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(8):821–30.

Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science. NIH Public Access*; 2014 Jan 3;343(6166):84–7.

Shang J, Yamashita T, Nakano Y, Morihara R, Li X, Feng T, et al. Aberrant distributions of nuclear pore complex proteins in ALS mice and ALS patients. *Neuroscience*. 2017 Mar 24;350:158–68.

Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2005 Aug 1;76(8):1046–57.

Shibata N. Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathology*. Blackwell Science Pty; 2008 Jul 7;21(1):82–92.

Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano a, et al. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res*. 2001;917(1):97–104.

Song C, Guo J, Liu Y, Tang B. Autophagy and Its Comprehensive Impact on ALS. *Int. J. Neurosci*. 2012;122(12):695–703.

Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci*. 2003;4(1):49–60.

Spilman P, Podlutskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, et al. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid- $\beta$  levels in a mouse model of alzheimer's disease. *PLoS One*. 2010;5(4):1–8.

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* (80-). 2008 Mar 21;319(5870):1668–72.

Stavru F, Hülsmann BB, Spang A, Hartmann E, Cordes VC, Görlich D. NDC1: a crucial membrane-integral nucleoporin of metazoan nuclear pore complexes. *J.*

Cell Biol. 2006;173(4).

Stewart M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):195–208.

Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* 2014 May 30;16(6):495–501.

Strong MJ, Grace GM, Freedman M, Lomen-Hoerth C, Woolley S, Goldstein LH, et al. Consensus criteria for the diagnosis of frontotemporal cognitive and behavioural syndromes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* 2009;10(3):131–46.

Sullivan PM, Zhou X, Robins AM, Paushter DH, Kim D, Smolka MB, et al. The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway. *Acta Neuropathol. Commun. BioMed Central;* 2016 May 18;4(1):51.

Suzuki M, Tork C, Shelley B, Mchugh J, Wallace K, Klein SM, et al. Sexual dimorphism in disease onset and progression of a rat model of ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Taylor & Francis;* 2007 Jan 10;8(1):20–5.

Suzuki N, Maroof AM, Merkle FT, Koszka K, Intoh A, Armstrong I, et al. The mouse C9ORF72 ortholog is enriched in neurons known to degenerate in ALS and FTD. *Nat. Neurosci.* 2013 Dec 3;16(12):1725–7.

Syslová K, Böhmová A, Mikoška M, Kuzma M, Pelclová D, Kačer P. Multimarker Screening of Oxidative Stress in Aging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014;2014:1–14.

Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 2011;13(3):184–90.

Talbot K. Motor neuron disease: THE BARE ESSENTIALS. *Pract. Neurol.* 2009 Oct 1;9(5):303–9.

Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. Chapter 13 – The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handb. Clin. Neurol.* 2016a. p. 225–38.

Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handb. Clin. Neurol.* 2016b;138:225–38.

Tavernarakis N, Paspadaki A, Tasdemir E, Maiuri MC, Kroemer G. The effects of p53 on whole organism longevity are mediated by autophagy. *Autophagy.* 2008;4(7):870–3.

Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature.* 2016;539(7628):197–206.

Therrien M, Rouleau GA, Dion PA, Parker JA. Deletion of C9ORF72 results in motor neuron degeneration and stress sensitivity in *C. elegans*. *PLoS One.* 2013;8(12).

Tremblay RG, Sikorska M, Sandhu JK, Lanthier P, Ribocco-Lutkiewicz M, Bani-

- Yaghoub M. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *J. Neurosci. Methods*. 2010 Jan 30;186(1):60–7.
- Valastyan JS, Lindquist S. Mechanisms of protein-folding diseases at a glance. *Dis. Model. Mech*. 2014;7(1):9–14.
- Vanderweyde T, Youmans K, Liu-Yesucevitz L, Wolozin B. Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: A mini-review. *Gerontology*. 2013. p. 524–33.
- Vasu S, Shah S, Orjalo A, Park M, Fischer WH, Forbes DJ. Novel vertebrate nucleoporins Nup133 and Nup160 play a role in mRNA export. *J. Cell Biol*. 2001 Oct 29;155(3):339–54.
- Veldink JH, B?r PR, Joosten EAJ, Otten M, Wokke JHJ, van den Berg LH. Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul. Disord*. 2003 Nov;13(9):737–43.
- Vijayalakshmi K, Alladi PA, Ghosh S, Prasanna VK, Sagar BC, Nalini A, et al. Evidence of endoplasmic reticular stress in the spinal motor neurons exposed to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol. Dis*. 2011 Mar;41(3):695–705.
- Visser AE, Seelen M, Hulsbergen A, de Graaf J, van der Kooi AJ, Raaphorst J, et al. Exploring the fitness hypothesis in ALS: a population-based case-control study of parental cause of death and lifespan. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2017;(May 2010):jnnp-2016-315071.
- Vollmer B, Antonin W. The diverse roles of the Nup93/Nic96 complex proteins - structural scaffolds of the nuclear pore complex with additional cellular functions. *Biol. Chem*. 2014 May;395(5):515–28.
- Walter P, Ron D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* (80-. ). 2011 Nov 25;334(6059):1081–6.
- Walther TC, Alves A, Pickersgill H, Loiodice I, Hetzer M, Galy V, et al. The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell*. 2003 Apr 18;113(2):195–206.
- Wang H, O'Reilly ÉJ, Weisskopf MG, Logroscino G, McCullough ML, Thun MJ, et al. Smoking and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a pooled analysis of 5 prospective cohorts. *Arch. Neurol*. 2011 Feb 1;68(2):207–13.
- Wang I-F, Guo B-S, Liu Y-C, Wu C-C, Yang C-H, Tsai K-J, et al. Autophagy activators rescue and alleviate pathogenesis of a mouse model with proteinopathies of the TAR DNA-binding protein 43. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2012 Sep 11;109(37):15024–9.
- Wang M-D, Little J, Gomes J, Cashman NR, Krewski D. Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology*. Elsevier B.V.; 2016a Jul;
- Wang W, Li L, Lin W-L, Dickson DW, Petrucelli L, Zhang T, et al. The ALS

disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Hum. Mol. Genet.* 2013 Dec 1;22(23):4706–19.

Wang W, Wang L, Lu J, Siedlak SL, Fujioka H, Liang J, et al. The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. 2016b;(May).

Wang X, Fan H, Ying Z, Li B, Wang H, Wang G. Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neurosci. Lett.* 2010 Jan 18;469(1):112–6.

Wang X, Ma M, Teng J, Che X, Zhang W, Feng S, et al. Valproate Attenuates 25-kDa C-Terminal Fragment of TDP-43-Induced Neuronal Toxicity via Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress and Activating Autophagy. *Int. J. Biol. Sci.* Ivyspring International Publisher; 2015;11(7):752–61.

Webster CP, Smith EF, Bauer CS, Moller A, Hautbergue GM, Ferraiuolo L, et al. The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy. *EMBO J. European Molecular Biology Organization*; 2016 Aug 1;35(15):1656–76.

Weiduschat N, Mao X, Hupf J, Armstrong N, Kang G, Lange DJ, et al. Motor cortex glutathione deficit in ALS measured in vivo with the J-editing technique. *Neurosci. Lett.* 2014 Jun;570:102–7.

Weisskopf MG, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Cudkovicz M, Ascherio a. Prospective study of cigarette smoking and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Epidemiol.* 2004;160(1):26–33.

Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J. Neurochem.* 2002 Feb;80(4):616–25.

Wong E, Cuervo AM. Integration of Clearance Mechanisms: The Proteasome and Autophagy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010 Dec 1;2(12):a006734–a006734.

Wooley CM, Sher RB, Kale A, Frankel WN, Cox GA, Seburn KL. Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve.* 2005 Jul;32(1):43–50.

Wu L-S, Cheng W-C, Hou S-C, Yan Y-T, Jiang S-T, Shen C-KJ. TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *genesis.* 2009 Jan;48(1):n/a-n/a.

Xu Y-F, Gendron TF, Zhang Y-J, Lin W-L, D'Alton S, Sheng H, et al. Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J. Neurosci.* NIH Public Access; 2010 Aug 11;30(32):10851–9.

Yamashita T, Aizawa H, Teramoto S, Akamatsu M, Kwak S. Calpain-dependent disruption of nucleo-cytoplasmic transport in ALS motor neurons. *Sci. Rep.* Nature Publishing Group; 2017 Jan 3;7:39994.

Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Takano J, Iwata N, et al. A

role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. *Nat. Commun.* 2012 Dec 18;3:1307.

Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010. p. 124–31.

Yip PK, Pizzasegola C, Gladman S, Biggio ML, Marino M, Jayasinghe M, et al. The Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid Accelerates Disease Progression in a Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Kleinschultz C, editor. *PLoS One.* 2013 Apr 19;8(4):e61626.

Yoshimura SH, Otsuka S, Kumeta M, Taga M, Takeyasu K. Intermolecular disulfide bonds between nucleoporins regulate karyopherin-dependent nuclear transport. *J. Cell Sci.* 2013 Jul 15;126(14):3141–50.

Zaldivar T, Gutierrez J, Lara G, Carbonara M, Logroscino G, Hardiman O. Reduced frequency of ALS in an ethnically mixed population: A population-based mortality study. *Neurology.* 2009;72(19):1640–5.

Zapata-Zapata C, Franco-Dáger E, Solano-Atehortúa J, Ahunca-Velásquez L. Esclerosis lateral amiotrófica: actualización. *IATREIA. Universidad de Antioquia;* 2016 Apr 1;29(2):194–205.

Zhan L, Xie Q, Tibbetts RS. Opposing roles of p38 and JNK in a *Drosophila* model of TDP-43 proteinopathy reveal oxidative stress and innate immunity as pathogenic components of neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 2015 Feb 1;24(3):757–72.

Zhang J, Ito H, Wate R, Ohnishi S, Nakano S, Kusaka H. Altered distributions of nucleocytoplasmic transport-related proteins in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2006 Oct 24;112(6):673–80.

Zhang K, Donnelly CJ, Haeusler AR, Grima JC, Machamer JB, Steinwald P, et al. The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature.* 2015 Sep 3;525(7567):56–61.

Zhang K, Grima JC, Rothstein JD, Lloyd TE. Nucleocytoplasmic transport in C9orf72-mediated ALS/FTD. *Nucleus.* 2016a Apr 26;1–6.

Zhang X, Chen S, Song L, Tang Y, Shen Y, Jia L, et al. MTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy.* 2014;10(4):588–602.

Zhang X, Li L, Chen S, Yang D, Wang Y, Zhang X, et al. Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy.* 2011;7(4):412–25.

Zhang Y-J, Gendron TF, Grima JC, Sasaguri H, Jansen-West K, Xu Y-F, et al. C9ORF72 poly(GA) aggregates sequester and impair HR23 and nucleocytoplasmic transport proteins. *Nat. Neurosci.* 2016b Mar 21;19(5):668–77.

Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD, et al. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011 Jan 4;108(1):260–5.

Zu T, Liu Y, Banez-Coronel M, Reid T, Pletnikova O, Lewis J, et al. RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013 Dec 17;110(51):E4968-77.

the testis-specific SP-10 gene in somatic tissues: role for TDP-43 in insulator function. *J. Biol. Chem.* 2007 Dec 14;282(50):36143–54.

Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol. Cell.* 2007 Jul 6;27(1):53–66.

Aebischer P, Kato AC. Playing defense against Lou Gehrig's disease. *Sci. Am.* 2007 Nov;297(5):86–93.

Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C, King A, Al-Sarraj S, Van Den Berg LH. The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2012. p. 339–52.

Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, et al. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature.* 2007 Nov 29;450(7170):695–701.

Allen TD, Cronshaw JM, Bagley S, Kiseleva E, Goldberg MW. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J. Cell Sci.* 2000 May;1651–9.

Andersen PM. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2006;6(1):37–46.

Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;351(3):602–11.

Arianna R, Raffaella S, Regina Federico L, Melissa ME, Nicla R, Dennis DW, et al. Increased Cytoplasmic TDP-43 Reduces Global Protein Synthesis by Interacting with RACK1 on Polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.* 2017 Feb 1;

Armon C. An evidence-based medicine approach to the evaluation of the role of exogenous risk factors in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology.* 2003;22(4):217–28.

Armon C. Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. *Neurology.* 2009. p. 1693–8.

Ascherio A, Weisskopf MG, O'Reilly EJ, Jacobs EJ, McCullough ML, Calle EE, et al. Vitamin E intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 2005;57(1):104–10.

Aulas A, Vande Velde C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Front. Cell. Neurosci.* Frontiers Media SA; 2015 Oct 23;9:423.

Ayala V, Granado-Serrano AB, Cacabelos D, Naudí A, Ilieva E V, Boada J, et al. Cell stress induces TDP-43 pathological changes associated with ERK1/2 dysfunction: implications in ALS. *Acta Neuropathol.* 2011a Sep;122(3):259–70.

Ayala YM, De Conti L, Avendaño-Vázquez SE, Dhir A, Romano M, D'Ambrogio A, et al. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J.* 2011b;30(2):277–88.

Ayala YM, Misteli T, Baralle FE. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008a Mar 11;105(10):3785–9.

Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu Y-F, Petrucelli L, Buratti E, et al. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J. Cell Sci.* 2008b Nov 15;121(Pt 22):3778–85.

Bano D, Hengartner MO, Nicotera P. Nuclear pore complex during neuronal degeneration: cracking the last barrier! *Nucleus.* Taylor & Francis; 2010;1(2):136–8.

Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic. Biol. Med.* 2010 Mar 1;48(5):629–41.

Barmada SJ, Serio A, Arjun A, Bilican B, Daub A, Ando DM, et al. Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models. *Nat. Chem. Biol.* Nature Publishing Group; 2014;10(8):677–85.

Bayliss R, Littlewood T, Stewart M. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell.* 2000;102(1):99–108.

Beard JD, Engel LS, Richardson DB, Gammon MD, Baird C, Umbach DM, et al. Military service, deployments, and exposures in relation to amyotrophic lateral sclerosis etiology. *Environ. Int.* 2016;91:104–15.

Beghi E, Pupillo E, Messina P, Giussani G, Chiò A, Zoccolella S, et al. Coffee and amyotrophic lateral sclerosis: A possible preventive role. *Am. J. Epidemiol.* 2011;174(9):1002–8.

Bendotti C, Marino M, Cheroni C, Fontana E, Crippa V, Poletti A, et al. Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response. *Prog. Neurobiol.* 2012 May;97(2):101–26.

Bentmann E, Haass C, Dormann D. Stress granules in neurodegeneration - Lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS J.* 2013. p. 4348–70.

Bentmann E, Neumann M, Tahirovic S, Rodde R, Dormann D, Haass C. Requirements for Stress Granule Recruitment of Fused in Sarcoma (FUS) and

TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43). *J. Biol. Chem.* 2012 Jun 29;287(27):23079–94.

Bhattacharya A, Bokov A, Muller FL, Jernigan AL, Maslin K, Diaz V, et al. Dietary restriction but not rapamycin extends disease onset and survival of the H46R/H48Q mouse model of ALS. *Neurobiol. Aging.* 2012 Aug;33(8):1829–32.

Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 1973 Nov;33(11):2643–52.

Birch-Machin MA, Bowman A. Oxidative stress and ageing. *Br. J. Dermatol.* 2016 Oct;175:26–9.

Birch-Machin MA, Swalwell H. How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. *Mutagenesis.* 2010 Mar 1;25(2):101–7.

Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 2005 Nov 21;171(4):603–14.

van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2013 Jun 1;5(6):a011072.

Blobel G, Potter VR. Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science.* 1966 Dec 30;154(3757):1662–5.

Bocca B, Forte G, Oggiano R, Clemente S, Asara Y, Peruzzu A, et al. Level of neurotoxic metals in amyotrophic lateral sclerosis: A population-based case–control study. *J. Neurol. Sci.* 2015;359(1):11–7.

Boehmer T, Enninga J, Dales S, Blobel G, Zhong H. Depletion of a single nucleoporin, Nup107, prevents the assembly of a subset of nucleoporins into the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003 Feb 4;100(3):981–5.

Bogdanov M, Brown RH, Matson W, Smart R, Hayden D, O'Donnell H, et al. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic. Biol. Med.* 2000a Oct 1;29(7):652–8.

Bogdanov M, Brown RH, Matson W, Smart R, Hayden D, O'Donnell H, et al. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic. Biol. Med.* 2000b Oct 1;29(7):652–8.

Bonvicini F, Marcello N, Mandrioli J, Pietrini V, Vinceti M. Exposure to pesticides and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case–control study. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 2010;46(3):284–7.

Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Shaw PJ, Turnbull DM. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann. Neurol.* 1999 Nov;46(5):787–90.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976 May 7;72:248–54.

Brady OA, Meng P, Zheng Y, Mao Y, Hu F. Regulation of TDP-43 aggregation by phosphorylation and p62/SQSTM1. *J. Neurochem.* 2011;116(2):248–59.

Braun RJ, Sommer C, Carmona-Gutierrez D, Khoury CM, Ring J, Büttner S, et al. Neurotoxic 43-kDa TAR DNA-binding protein (TDP-43) triggers mitochondrion-dependent programmed cell death in yeast. *J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2011 Jun 3;286(22):19958–72.

Vanden Broeck L, Callaerts P, Dermaut B. TDP-43-mediated neurodegeneration: towards a loss-of-function hypothesis? *Trends Mol. Med.* 2014 Feb;20(2):66–71.

Budini M, Baralle FE, Buratti E. Targeting TDP-43 in neurodegenerative diseases. *Expert Opin. Ther. Targets.* Taylor & Francis; 2014 Jun 20;18(6):617–32.

Buratti E. Functional Significance of TDP-43 Mutations in Disease. 2015. p. 1–53.

Buratti E, Baralle FE. *The Molecular Links Between TDP-43 Dysfunction and Neurodegeneration.* Adv. Genet. 1st ed. Elsevier Inc.; 2009. p. 1–34.

Buratti E, Baralle FE. TDP-43: Gumming up neurons through protein-protein and protein-RNA interactions. *Trends Biochem. Sci.* 2012. p. 237–47.

Buratti E, Brindisi A, Giombi M, Tisminetzky S, Ayala YM, Baralle FE. TDP-43 Binds Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A/B through Its C-terminal Tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J. Biol. Chem.* 2005 Nov 11;280(45):37572–84.

Cacabelos D, Ayala V, Ramírez-Núñez O, Granado-Serrano AB, Boada J, Serrano JCE, et al. Dietary Lipid Unsaturation Influences Survival and Oxidative Modifications of an Amyotrophic Lateral Sclerosis Model in a Gender-Specific Manner. *NeuroMolecular Med.* 2014;

Cacabelos D, Ramírez-Núñez O, Granado-Serrano AB, Torres P, Ayala V, Moiseeva V, et al. Early and gender-specific differences in spinal cord mitochondrial function and oxidative stress markers in a mouse model of ALS. *Acta Neuropathol. Commun. BioMed Central*; 2016 Jan 13;4:3.

Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature.* 2002 Jan 3;415(6867):92–6.

Callaghan B, Feldman D, Gruis K, Feldman E. The association of exposure to lead, mercury, and selenium and the development of amyotrophic lateral sclerosis and the epigenetic implications. *Neurodegener. Dis.* Karger Publishers; 2011;8(1–2):1–8.

Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* 2006;7(10):R100.

Chakravarti B, Chakravarti DN. Oxidative modification of proteins: age-related changes. *Gerontology.* 2007;53(3):128–39.

Chalupnikova K, Lattmann S, Selak N, Iwamoto F, Fujiki Y, Nagamine Y. Recruitment of the RNA Helicase RHAU to Stress Granules via a Unique RNA-binding Domain. *J. Biol. Chem.* 2008 Dec 12;283(50):35186–98.

Chancellor AM, Slattery JM, Fraser H, Warlow CP. Risk factors for motor neuron disease: a case-control study based on patients from the Scottish Motor Neuron Disease Register. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1993 Nov;56(11):1200–6.

Chen-plotkin AS, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2010 Apr 16;6(4):211–20.

Chen L, Liu B. Relationships between Stress Granules, Oxidative Stress, and Neurodegenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017;2017:1–10.

Chen S, Zhang X, Song L, Le W. Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol.* 2012 Jan;22(1):110–6.

Chen Y, Liu H, Guan Y, Wang Q, Zhou F, Jie L, et al. The altered autophagy mediated by TFEB in animal and cell models of amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Transl. Res.* e-Century Publishing Corporation; 2015;7(9):1574–87.

Chiang P-M, Ling J, Jeong YH, Price DL, Aja SM, Wong PC. Deletion of TDP-43 down-regulates *Tbc1d1*, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences;* 2010 Sep 14;107(37):16320–4.

Chiò A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain.* 2005;128(Pt 3):472–6.

Chiò A, Borghero G, Pugliatti M, Ticca A, Calvo A, Moglia C, et al. Large proportion of amyotrophic lateral sclerosis cases in Sardinia due to a single founder mutation of the TARDBP gene. *Arch. Neurol.* 2011 May 1;68(5):594–8.

Chiò A, Calvo A, Moglia C, Restagno G, Ossola I, Brunetti M, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis–Frontotemporal Lobar Dementia in 3 Families With p.Ala382Thr TARDBP Mutations. *Arch. Neurol.* 2010 Aug 1;67(8):1002–9.

Chiò A, Traynor BJ, Lombardo F, Fimognari M, Calvo A, Ghiglione P, et al. Prevalence of SOD1 mutations in the Italian ALS population. *Neurology.* 2008;70(7):533–7.

Choi AMK, Ryter SW. Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(7):651–62.

Ciura S, Lattante S, Le Ber I, Latouche M, Tostivint H, Brice A, et al. Loss of

function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 2013;74(2):180–7.

Clarkson WD, Kent HM, Stewart M. Separate Binding Sites on Nuclear Transport Factor 2 (NTF2) for GDP-Ran and the Phenylalanine-rich Repeat Regions of Nucleoporins p62 and Nsp1p. *J. Mol. Biol.* 1996 Nov 8;263(4):517–24.

Coakes SJ, Steed L, Price J. *SPSS: Analysis Without Anguish*; version 15.0 for Windows. SPSS Wind. 2008. p. 270.

Cohen TJ, Hwang AW, Restrepo CR, Yuan C-X, Trojanowski JQ, Lee VMY. An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity. *Nat. Commun. NIH Public Access*; 2015 Jan 5;6:5845.

Cohen TJ, Hwang AW, Unger T, Trojanowski JQ, Lee VMY. Redox signalling directly regulates TDP-43 via cysteine oxidation and disulphide cross-linking. *EMBO J.* 2012 Mar 7;31(5):1241–52.

Cohen TJ, Lee VMY, Trojanowski JQ. TDP-43 functions and pathogenic mechanisms implicated in TDP-43 proteinopathies. *Trends Mol. Med.* 2011. p. 659–67.

Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, Buratti E, et al. TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J. Neurochem.* 2009 Nov;111(4):1051–61.

Contestabile A. Oxidative stress in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr. Top. Med. Chem.* 2001 Dec;1(6):553–68.

De Conti L, Akinyi M V, Mendoza-Maldonado R, Romano M, Baralle M, Buratti E. TDP-43 affects splicing profiles and isoform production of genes involved in the apoptotic and mitotic cellular pathways. *Nucleic Acids Res.* 2015 Oct 15;43(18):8990–9005.

Cook A, Bono F, Jinek M, Conti E. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu. Rev. Biochem.* 2007;76:647–71.

Cooper-Knock J, Higginbottom A, Stopford MJ, Highley JR, Ince PG, Wharton SB, et al. Antisense RNA foci in the motor neurons of C9ORF72-ALS patients are associated with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol.* 2015 Jul 6;130(1):63–75.

Cooper-Knock J, Shaw PJ, Kirby J. The widening spectrum of C9ORF72-related disease; genotype/phenotype correlations and potential modifiers of clinical phenotype. *Acta Neuropathol.* 2014 Mar 4;127(3):333–45.

Coppede F. An overview of DNA repair in amyotrophic lateral sclerosis. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:1679–91.

Cosgrove JP, Church DF, Pryor WA. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 1987 May;22(5):299–304.

Coyne AN, Siddegowda BB, Estes PS, Johannesmeyer J, Kovalik T, Daniel SG,

et al. Futsch/MAP1B mRNA is a translational target of TDP-43 and is neuroprotective in a *Drosophila* model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 2014 Nov 26;34(48):15962–74.

Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ. Ethnic variation in the incidence of ALS: A systematic review. *Neurology.* 2007;68(13):1002–7.

D'Angelo MA, Raices M, Panowski SH, Hetzer MW. Age-Dependent Deterioration of Nuclear Pore Complexes Causes a Loss of Nuclear Integrity in Postmitotic Cells. *Cell.* 2009 Jan;136(2):284–95.

Dal Canto MC, Gurney ME. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res.* 1995 Apr 3;676(1):25–40.

Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* Wiley-Blackwell; 2006;10(2):389–406.

Dehay B, Bove J, Rodriguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, et al. Pathogenic Lysosomal Depletion in Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 2010 Sep 15;30(37):12535–44.

Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Dries DR, Mayer P, Good SK, et al. TDP-43 Is Directed to Stress Granules by Sorbitol, a Novel Physiological Osmotic and Oxidative Stressor. *Mol. Cell. Biol.* 2011 Mar 1;31(5):1098–108.

Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Johnson BA, Herz J, Yu G. TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key? *Brain Res. NIH Public Access;* 2012 Jun 26;1462:16–25.

Duan W, Li X, Shi J, Guo Y, Li Z, Li C. Mutant TAR DNA-binding protein-43 induces oxidative injury in motor neuron-like cell. *Neuroscience.* 2010 Sep 15;169(4):1621–9.

Edbauer D, Haass C. An amyloid-like cascade hypothesis for C9orf72 ALS/FTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2016 Feb;36:99–106.

van Eersel J, Ke YD, Gladbach A, Bi M, Götz J, Kril JJ, et al. Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon proteasome inhibition in cultured neurons. *PLoS One.* 2011;6(7):e22850.

Fang F, Kwee LC, Allen KD, Umbach DM, Ye W, Watson M, et al. Association between blood lead and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Epidemiol.* 2010;171(10):1126–33.

Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson a J, Sendtner M, Shaw PJ. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 2011;7(11):616–30.

Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, et al. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 1997 Nov;69(5):2064–74.

Ferrarese C, Sala G, Riva R, Begni B, Zoia C, Tremolizzo L, et al. Decreased platelet glutamate uptake in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2001 Jan 23;56(2):270–2.

Finan JD, Leddy HA, Guilak F. Osmotic stress alters chromatin condensation and nucleocytoplasmic transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011.

Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* 2004 Feb;185(2):232–40.

Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsiuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, et al. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105(6):2052–7.

Fournier M-J, Gareau C, Mazroui R. The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules. *Cancer Cell Int.* 2010 Apr 29;10(1):12.

Frake RA, Ricketts T, Menzies FM, Rubinsztein DC, Riess O, Rubinsztein D. Autophagy and neurodegeneration. *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*; 2015 Jan 2;125(1):65–74.

Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP. Global Analysis of TDP-43 Interacting Proteins Reveals Strong Association with RNA Splicing and Translation Machinery. *J. Proteome Res.* 2010 Feb 5;9(2):1104–20.

Freibaum BD, Lu Y, Lopez-Gonzalez R, Kim NC, Almeida S, Lee K-H, et al. GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature*. 2015 Aug 26;525(7567):129–33.

Füllgrabe J, Klionsky DJ, Joseph B. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014 Dec 11;15(1):65–74.

Funasaka T, Tsuka E, Wong RW. Regulation of autophagy by nucleoporin Tpr. *Sci. Rep.* 2012;2:878.

Gallo V, Bueno-De-Mesquita HB, Vermeulen R, Andersen PM, Kyrozis A, Linseisen J, et al. Smoking and risk for amyotrophic lateral sclerosis: Analysis of the EPIC cohort. *Ann. Neurol.* 2009;65(4):378–85.

Gallo V, Vanacore N, Bueno-de-Mesquita HB, Vermeulen R, Brayne C, Pearce N, et al. Physical activity and risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis in a prospective cohort study. *Eur. J. Epidemiol.* 2016;31(3):255–66.

Gasset-Rosa F, Chillon-Marinas C, Goginashvili A, Atwal RS, Artates JW, Tabet R, et al. Polyglutamine-Expanded Huntingtin Exacerbates Age-Related Disruption of Nuclear Integrity and Nucleocytoplasmic Transport. *Neuron*. 2017 Apr 5;94(1):48–57.e4.

Gendron TF, Bieniek KF, Zhang Y-J, Jansen-West K, Ash PEA, Caulfield T, et al. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol.* 2013 Dec 16;126(6):829–44.

- González-Aguilera C, Askjaer P. Dissecting the NUP107 complex: multiple components and even more functions. *Nucleus*. 2012;3(4):340–8.
- Goodier JL, Zhang L, Vetter MR, Kazazian HH. LINE-1 ORF1 Protein Localizes in Stress Granules with Other RNA-Binding Proteins, Including Components of RNA Interference RNA-Induced Silencing Complex. *Mol. Cell. Biol.* 2007 Sep 15;27(18):6469–83.
- Gou-Fabregas M, Ramírez-Núñez O, Cacabelos D, Bahi N, Portero M, Garcera A, et al. Calpain activation and CaMKIV reduction in spinal cords from hSOD1G93A mouse model. *Mol. Cell. Neurosci. Academic Press Inc.*; 2014;61:219–25.
- Goulet I, Boisvenue S, Mokas S, Mazroui R, Cote J. TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules. *Hum. Mol. Genet.* 2008 Jul 9;17(19):3055–74.
- Govoni V, Cesnik E, Casetta I, Tugnoli V, Tola MR, Granieri E. Temporal trend of amyotrophic lateral sclerosis incidence in southern Europe: a population study in the health district of Ferrara, Italy. *J. Neurol. Springer-Verlag*; 2012 Aug 10;259(8):1623–31.
- Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJA. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003 Jun 6;305(3):709–18.
- Guerrero EN, Wang H, Mitra J, Hegde PM, Stowell SE, Liachko NF, et al. TDP-43/FUS in motor neuron disease: Complexity and challenges. *Prog. Neurobiol. Elsevier Ltd*; 2016;145–146:78–97.
- Guo L, Shorter J. Biology and Pathobiology of TDP-43 and Emergent Therapeutic Strategies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016 Dec 5;a024554.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 1994 Jun 17;264(5166):1772–5.
- Gusel'nikova V V, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*. 7(2):42–7.
- Hardiman O, Chalabi A Al, Brayne C, Beghi E, van den Berg LH, Chio A, et al. The changing picture of amyotrophic lateral sclerosis: lessons from European registers. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2017 Mar 11;jnnp-2016-314495.
- Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012 Jan 18;13(2):89–102.
- Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The Unfolded Protein Response: Integrating Stress Signals Through the Stress Sensor IRE1. *Physiol. Rev.* 2011 Oct 1;91(4):1219–43.
- Hetz C, Thielen P, Matus S, Nassif M, Court F, Kiffin R, et al. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* 2009;23(19):2294–306.

Hetzer MW. The role of the nuclear pore complex in aging of post-mitotic cells. *Aging (Albany, NY)*. 2010 Mar 2;2(2):74–5.

Hoelz A, Debler EW, Blobel G. The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:613–43.

Horner RD, Feussner JR, Kasarskis EJ. Prospective study of military service and mortality from ALS. *Neurology*. 2005 Jul 12;65(1):180-1-1.

Ibarra A, Hetzer MW. Nuclear pore proteins and the control of genome functions. *Genes Dev*. 2015;29(4):337–49.

Igaz LM, Kwong LK, Chen-Plotkin A, Winton MJ, Unger TL, Xu Y, et al. Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies. *J. Biol. Chem*. 2009 Mar 27;284(13):8516–24.

Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa J, Hasegawa M, et al. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol. Dis*. 2012 Mar;45(3):862–70.

Ikawa M, Okazawa H, Tsujikawa T, Matsunaga A, Yamamura O, Mori T, et al. Increased oxidative stress is related to disease severity in the ALS motor cortex: A PET study. *Neurology*. 2015 May 19;84(20):2033–9.

Ilieva E V, Ayala V, Jové M, Dalfó E, Cacabelos D, Povedano M, et al. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2007 Dec;130(Pt 12):3111–23.

Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Epidemiol*. Dove Press; 2015;7:181–93.

Ito Y, Yamada M, Tanaka H, Aida K, Tsuruma K, Shimazawa M, et al. Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiol. Dis*. 2009;36(3):470–6.

Jiang Z, Wang W, Perry G, Zhu X, Wang X. Mitochondrial dynamic abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Transl. Neurodegener. BioMed Central*; 2015 Dec 5;4(23):14.

de Jong SW, Huisman MHB, Sutedja NA, van der Kooij AJ, de Visser M, Schelhaas HJ, et al. Smoking, Alcohol Consumption, and the Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Population-based Study. *Am. J. Epidemiol*. 2012 Aug 1;176(3):233–9.

Josephs KA, Whitwell JL, Weigand SD, Murray ME, Tosakulwong N, Liesinger AM, et al. TDP-43 is a key player in the clinical features associated with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2014 Jun 23;127(6):811–24.

Jovičić A, Paul JW, Gitler AD. Nuclear transport dysfunction: a common theme in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *J. Neurochem*. 2016;138:134–44.

Ju JS, Fuentealba RA, Miller SE, Jackson E, Piwnica-Worms D, Baloh RH, et al. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J. Cell Biol.* 2009;187(6):875–88.

Kabeya Y. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19(21):5720–8.

Kabuta T, Suzuki Y, Wada K. Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 2006 Oct 13;281(41):30524–33.

Kamel F, Umbach DM, Bedlack RS, Richards M, Watson M, Alavanja MCRR, et al. Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology.* 2012 Jun;33(3):457–62.

Kamel F, Umbach DM, Munsat TL, Shefner JM, Hu H, Sandler DP. Lead exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Epidemiology.* 2002;13:311–9.

Kamentsky L, Jones TR, Fraser A, Bray M-A, Logan DJ, Madden KL, et al. Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics.* 2011 Apr 15;27(8):1179–80.

Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev.* 2015 May;21:16–29.

Kandola K, Bowman A, Birch-Machin MA. Oxidative stress - a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2015 Dec;37:1–8.

Kaneb HM, Folkmann AW, Belzil V V, Jao L-E, Leblond CS, Girard SL, et al. Deleterious mutations in the essential mRNA metabolism factor, hGle1, in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* Oxford University Press; 2015 Mar 1;24(5):1363–73.

Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene.* 2016. p. 109–18.

Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 2012 Aug;22(8):407–17.

Kawahara Y, Mieda-Sato A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012 Feb 28;109(9):3347–52.

Kedersha N, Anderson P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):963–9.

Khosravi B, Hartmann H, May S, Möhl C, Ederle H, Michaelson M, et al. Cytoplasmic poly-GA aggregates impair nuclear import of TDP-43 in *C9orf72* ALS/FTLD. *Hum. Mol. Genet.* 2016 Dec 30;3:ddw432.

Kinoshita Y, Ito H, Hirano A, Fujita K, Wate R, Nakamura M, et al. Nuclear

Contour Irregularity and Abnormal Transporter Protein Distribution in Anterior Horn Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2009 Nov;68(11):1184–92.

Kirby J, Al Sultan A, Waller R, Heath P. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degener. Neurol. Neuromuscul. Dis.* Dove Press; 2016 May 13;Volume 6:49.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin J, Abeliovich H, Bartolom A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy ( 3rd edition ). 2016;12(1):1–222.

Klionsky DJ, Elazar Z, Seglen PO, Rubinsztein DC. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy.* 2008;4(7):849–50.

Kodiha M, Tran D, Qian C, Morogan A, Presley JF, Brown CM, et al. Oxidative stress mislocalizes and retains transport factor importin- $\alpha$  and nucleoporins Nup153 and Nup88 in nuclei where they generate high molecular mass complexes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2008;1783(3):405–18.

Köhler A, Hurt E. Gene Regulation by Nucleoporins and Links to Cancer. *Mol. Cell.* 2010;38(1):6–15.

Koppers M, Blokhuis AM, Westeneng H-J, Terpstra ML, Zundel CAC, Vieira de Sá R, et al. C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann. Neurol.* 2015 Sep;78(3):426–38.

Kosako H, Yamaguchi N, Aranami C, Ushiyama M, Kose S, Imamoto N, et al. Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009;16(10):1026–35.

Krishna A, Biryukov M, Trefois C, Antony PM, Hussong R, Lin J, et al. Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease.

Kruger NJ. The Bradford Method for Protein Quantitation. *Basic Protein Pept. Protoc.* New Jersey: Humana Press; 1994. p. 9–16.

Kuo PH, Doudeva LG, Wang YT, Shen CKJ, Yuan HS. Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(6):1799–808.

Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Görlich D. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell.* 1997 Sep 19;90(6):1061–71.

Kwan JY, Jeong SY, van Gelderen P, Deng HX, Quezado MM, Danielian LE, et al. Iron accumulation in deep cortical layers accounts for MRI signal abnormalities in ALS: Correlating 7 tesla MRI and pathology. *PLoS One.* 2012;7(4).

Kwon I, Xiang S, Kato M, Wu L, Theodoropoulos P, Wang T, et al. Poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeats bind nucleoli, impede RNA

biogenesis, and kill cells. *Science* (80-. ). 2014;345(6201):1139–45.

Lacorte E, Ferrigno L, Leoncini E, Corbo M, Boccia S, Vanacore N. Physical activity, and physical activity related to sports, leisure and occupational activity as risk factors for ALS: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2016 Jul;66:61–79.

Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 2010 Apr 15;19(R1):R46–64.

Lammoglia MF, Lozano R, García C, Avilez C, Trejo V, Muñoz R, et al. La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investig. en discapacidad.* 2016;5(2):116–28.

Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin. *J. Biol. Chem.* 2007 Feb 23;282(8):5101–5.

Lattante S, Rouleau GA, Kabashi E. TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. *Hum. Mutat.* 2013 Jun;34(6):812–26.

Leary S, Anthony R, Cartner S, Grandin T, Ann McCrackin M, Meyer R, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition Members of the Panel on Euthanasia.

Lee EB, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011 Nov 30;13(1):38–50.

Lee JK, Shin JH, Lee JE, Choi E-J. Role of autophagy in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2015 Nov;1852(11):2517–24.

Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2002 Feb 15;16(4):452–66.

Lehman EJ, Hein MJ, Baron SL, Gersic CM. Neurodegenerative causes of death among retired national football league players. *Neurology.* 2012;79(19):1970–4.

Leigh PN, Anderton BH, Dodson A, Gallo JM, Swash M, Power DM. Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neurosci. Lett.* 1988 Nov 11;93(2–3):197–203.

Levine TP, Daniels RD, Gatta AT, Wong LH, Hayes MJ. The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics.* 2013 Feb 15;29(4):499–503.

Li A, Zhang X, Le W. Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy.* 2008;4(3):290–3.

Li W, Li J, Bao J. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012 Apr 12;69(7):1125–36.

Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J. Cell Biol.* 2013. p. 361–72.

Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2013. p. 1–26.

Lin Y-C, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat. Commun. Nature Publishing Group*; 2014 Sep 3;5(11):4767.

Ling JP, Pletnikova O, Troncoso JC, Wong PC. TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science.* 2015 Aug 7;349(6248):650–5.

Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang Y-J, Vanderwyde T, Citro A, Mehta T, et al. Tar DNA Binding Protein-43 (TDP-43) Associates with Stress Granules: Analysis of Cultured Cells and Pathological Brain Tissue. Bush AI, editor. *PLoS One.* 2010 Oct 11;5(10):e13250.

Liu MS, Cui LY, Fan DS, Chinese ALS Association. Age at onset of amyotrophic lateral sclerosis in China. *Acta Neurol. Scand.* 2014 Mar;129(3):163–7.

Liu Y-J, Ju T-C, Chen H-M, Jang Y-S, Lee L-M, Lai H-L, et al. Activation of AMP-activated protein kinase 1 mediates mislocalization of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet. Oxford University Press*; 2015 Feb 1;24(3):787–801.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell.* 2013 Jun;153(6):1194–217.

Lowe J, Lennox G, Jefferson D, Morrell K, McQuire D, Gray T, et al. A filamentous inclusion body within anterior horn neurones in motor neurone disease defined by immunocytochemical localisation of ubiquitin. *Neurosci. Lett.* 1988 Nov 22;94(1–2):203–10.

Mackenzie IRA, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann. Neurol.* 2007;61(5):427–34.

Mackenzie IRA, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol. Elsevier Ltd*; 2010;9(10):995–1007.

MacLeod RAF, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H, Drexler HG. Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int. J. Cancer.* 1999;83(4):555–63.

Maekawa S, Leigh PN, King A, Jones E, Steele JC, Bodi I, et al. TDP-43 is consistently co-localized with ubiquitinated inclusions in sporadic and Guam

amyotrophic lateral sclerosis but not in familial amyotrophic lateral sclerosis with and without SOD1 mutations. *Neuropathology*. 2009 Dec;29(6):672–83.

Magrane J, Cortez C, Gan W-B, Manfredi G. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum. Mol. Genet.* 2014 Mar 15;23(6):1413–24.

Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EGP, Waite A, Rollinson S, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: A cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 2012;11(4):323–30.

Majumder P, Chu J-F, Chatterjee B, Swamy KBS, Shen C-KJ. Co-regulation of mRNA translation by TDP-43 and Fragile X Syndrome protein FMRP. *Acta Neuropathol.* 2016 Nov 12;132(5):721–38.

Malek AM, Barchowsky A, Bowser R, Youk A, Talbott EO. Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis of epidemiological studies. *Environ. Res.* 2012 Aug;117:112–9.

Manjaly ZR, Scott KM, Abhinav K, Wijesekera L, Ganesalingam J, Goldstein LH, et al. The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Amyotroph Lateral Scler.* 2010;11(5):439–42.

Marangi G, Traynor BJ. Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: New genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges. *Brain Res.* 2015. p. 75–93.

Martin LJ. p53 Is Abnormally Elevated and Active in the CNS of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 2000 Dec;7(6):613–22.

Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, et al. Mutated Human SOD1 Causes Dysfunction of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria of Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* 2002 Aug 9;277(33):29626–33.

Matus S, Valenzuela V, Medinas DB, Hetz C. ER dysfunction and protein folding stress in ALS. *Int. J. Cell Biol.* Hindawi Publishing Corporation; 2013 p. 674751.

McDonald KK, Aulas A, Destroismaisons L, Pickles S, Beleac E, Camu W, et al. TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum. Mol. Genet.* Oxford University Press; 2011 Apr 1;20(7):1400–10.

McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EMC, Greensmith L. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2013 Sep;1832(9):1421–36.

Meyerowitz J, Parker SJ, Vella LJ, Ng DC, Price KA, Liddell JR, et al. C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. *Mol. Neurodegener.* 2011 Aug 8;6(1):57.

Michal Freedman D, Kuncl RW, Weinstein SJ, Malila N, Virtamo J, Albanes D. Vitamin E serum levels and controlled supplementation and risk of amyotrophic

lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 2013;14(4):246–51.

Mizielinska S, Gronke S, Niccoli T, Ridler CE, Clayton EL, Devoy A, et al. C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in *Drosophila* through arginine-rich proteins. *Science* (80-. ). 2014;345(6201):1192–4.

Mizielinska S, Isaacs AM. C9orf72 amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: gain or loss of function? *Curr. Opin. Neurol.* Wolters Kluwer Health; 2014 Oct;27(5):515–23.

Moore CB, Allen IC. Primary ear fibroblast derivation from mice. *Methods Mol. Biol.* 2013;1031:65–70.

Mor A, White MA, Fontoura BM. Nuclear Trafficking in Health and Disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2014 Jun;28:28–35.

Morgan S, Orrell RW. Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Br. Med. Bull.* Oxford University Press; 2016 Sep;119(July):1–11.

Mori K, Arzberger T, Grässer FA, Gijssels I, May S, Rentzsch K, et al. Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathol.* 2013a;126(6):881–93.

Mori K, Weng S-M, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, et al. The C9orf72 GGGGCC Repeat Is Translated into Aggregating Dipeptide-Repeat Proteins in FTL/ALS. *Science* (80-. ). 2013b Mar 15;339(6125):1335–8.

Morris J. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Related Motor Neuron Diseases: An Overview. *Neurodiagn. J.* Routledge; 2015 Sep 11;55(3):180–94.

Mosammaparast N, Pemberton LF. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol.* 2004 Oct;14(10):547–56.

Motulsky HJ. Common misconceptions about data analysis and statistics. *Br. J. Pharmacol.* 2015;172(8):2126–32.

Nardo G, Pozzi S, Pignataro M, Lauranzano E, Spano G, Garbelli S, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis Multiprotein Biomarkers in Peripheral Blood Mononuclear Cells. Pant H, editor. *PLoS One.* Public Library of Science; 2011 Oct 5;6(10):e25545.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* (80-. ). 2006a Oct 6;314(5796):130–3.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2006b Oct 6;314(5796):130–3.

Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* 2016 Aug

22;53(6):4094–125.

Nieves JW, Gennings C, Factor-Litvak P, Hupf J, Singleton J, Sharf V, et al. Association Between Dietary Intake and Function in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* American Medical Association; 2016 Dec 1;73(12):1425.

Nishimura AL, Zupunski V, Troakes C, Kathe C, Fratta P, Howell M, et al. Nuclear import impairment causes cytoplasmic trans-activation response DNA-binding protein accumulation and is associated with frontotemporal lobar degeneration. *Brain.* 2010 Jun 1;133(6):1763–71.

Nofrini V, Di Giacomo D, Mecucci C. Nucleoporin genes in human diseases. *Eur. J. Hum. Genet.* 2016 Apr 13;(February):1–7.

Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum. Mol. Genet.* 2009 Sep 15;18(18):3353–64.

Okamoto K, Kihira T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, et al. Fruit and vegetable intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Neuroepidemiology.* 2009a;32(4):251–6.

Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, et al. Lifestyle Factors and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case-Control Study in Japan. *Ann. Epidemiol.* 2009b;19(6):359–64.

Otten EG, Manni D, Korolchuk VI. Mitochondrial Degradation, Autophagy and Neurodegenerative Disease. *Mitochondrial Dysfunct. Neurodegener. Disord.* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 255–78.

Ou SH, Wu F, Harrich D, García-Martínez LF, Gaynor RB. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J. Virol.* 1995 Jun;69(6):3584–96.

Parakh S, Spencer DM, Halloran MA, Soo KY, Atkin JD. Redox Regulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013;2013:1–12.

Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Crouch PJ, Kanninen KM, et al. Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates. *Neurochem. Int.* 2012 Mar;60(4):415–24.

Peters TL, Kamel F, Lundholm C, Feychting M, Weibull CE, Sandler DP, et al. Occupational exposures and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Occup. Environ. Med.* 2016;117(9):1387–92.

Prpar Mihevc S, Darovic S, Kovanda A, Bajc Česnik A, Župunski V, Rogelj B. Nuclear trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Brain.* 2017 Jan;140(Pt 1):13–26.

Pujol G, Söderqvist H, Radu A. Age-associated reduction of nuclear protein import in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;294(2):354–8.

Pupillo E, Messina P, Giussani G, Logroscino G, Zoccolella S, Chiò A, et al. Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: A European population-based case-control study. *Ann. Neurol.* 2014 May;75(5):708–16.

Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques.* 2009 Apr;46(4):277–84.

Raices M, D'Angelo MA. Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012 Oct 23;13(11):687–99.

Raices M, D'Angelo MA. Nuclear pore complexes and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2017 Jun;46:26–32.

Ravikumar B, Futter M, Jahreiss L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, et al. Mammalian macroautophagy at a glance. *J. Cell Sci.* 2009 Jun 1;122(Pt 11):1707–11.

Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* 2004 Jun 16;36(6):585–95.

Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* NIH Public Access; 2014 Jan;17(1):17–23.

Riancho J, Gonzalo I, Ruiz-Soto M, Berciano J. ¿Por qué degeneran las motoneuronas? Actualización en la patogenia de la esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología.* 2016;

Riku Y, Atsuta N, Yoshida M, Tatsumi S, Iwasaki Y, Mimuro M, et al. Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy: a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open.* 2014;4(5):e005213.

Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* Nature Publishing Group; 2013 Mar 6;14(4):1–17.

Romano V, Quadri Z, Baralle FE, Buratti E. The structural integrity of TDP-43 N-terminus is required for efficient aggregate entrapment and consequent loss of protein function. *Prion.* 2015 Jan 2;9(1):1–9.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):519–29.

Roos PM, Lierhagen S, Flaten TP, Syversen T, Vesterberg O, Nordberg M. Manganese in cerebrospinal fluid and blood plasma of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2012;237(7):803–10.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993 Mar 4;362(6415):59–62.

Rowland LP. How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-

- pathologic genius of Jean-Martin Charcot. *Arch. Neurol.* 2001 Mar;58(3):512–5.
- Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2001 May 31;344(22):1688–700.
- Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature.* Nature Publishing Group; 2006 Oct 19;443(7113):780–6.
- Ruckenstuhl C, Netzberger C, Entfellner I, Carmona-Gutierrez D, Kickenweiz T, Stekovic S, et al. Lifespan Extension by Methionine Restriction Requires Autophagy-Dependent Vacuolar Acidification. Kim SK, editor. *PLoS Genet.* 2014 May 1;10(5):e1004347.
- Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J. Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurol. Clin. NIH Public Access;* 2015 Nov;33(4):855–76.
- Sasaki S. Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2011 May 1;70(5):349–59.
- Sasaki S, Maruyama S. Synapse loss in anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 1994;88(3):222–7.
- Savas JN, Toyama BH, Xu T, Yates JR, Hetzer MW. Extremely Long-Lived Nuclear Pore Proteins in the Rat Brain. *Science (80-. ).* 2012 Feb 24;335(6071):942–942.
- Saxena S, Caroni P. Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron.* 2011 Jul 14;71(1):35–48.
- SC Y, Muralidhara. Beneficial Role of Coffee and Caffeine in Neurodegenerative Diseases: A Minireview. *AIMS Public Heal.* 2016;3(2):407–22.
- Schwartz TU. Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005 Apr;15(2):221–6.
- Scotter EL, Chen H-J, Shaw CE. TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics.* Springer US; 2015 Apr 5;12(2):352–63.
- Scotter EL, Vance C, Nishimura AL, Lee Y-B, Chen H-J, Urwin H, et al. Differential roles of the ubiquitin proteasome system and autophagy in the clearance of soluble and aggregated TDP-43 species. *J. Cell Sci.* 2014 Mar 15;127(Pt 6):1263–78.
- Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences;* 1982 Mar;79(6):1889–92.
- Shahrizaila N, Sobue G, Kuwabara S, Kim SH, Birks C, Fan DS, et al.

Amyotrophic lateral sclerosis and motor neuron syndromes in Asia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(8):821–30.

Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. NIH Public Access; 2014 Jan 3;343(6166):84–7.

Shang J, Yamashita T, Nakano Y, Morihara R, Li X, Feng T, et al. Aberrant distributions of nuclear pore complex proteins in ALS mice and ALS patients. *Neuroscience*. 2017 Mar 24;350:158–68.

Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2005 Aug 1;76(8):1046–57.

Shibata N. Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathology*. Blackwell Science Pty; 2008 Jul 7;21(1):82–92.

Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano a, et al. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res*. 2001;917(1):97–104.

Song C, Guo J, Liu Y, Tang B. Autophagy and Its Comprehensive Impact on ALS. *Int. J. Neurosci*. 2012;122(12):695–703.

Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci*. 2003;4(1):49–60.

Spilman P, Podlitskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, et al. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-b levels in a mouse model of alzheimer's disease. *PLoS One*. 2010;5(4):1–8.

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* (80-.). 2008 Mar 21;319(5870):1668–72.

Stewart M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(3):195–208.

Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat. Cell Biol*. 2014 May 30;16(6):495–501.

Strong MJ, Grace GM, Freedman M, Lomen-Hoerth C, Woolley S, Goldstein LH, et al. Consensus criteria for the diagnosis of frontotemporal cognitive and behavioural syndromes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler*. 2009;10(3):131–46.

Sullivan PM, Zhou X, Robins AM, Paushter DH, Kim D, Smolka MB, et al. The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway. *Acta Neuropathol. Commun*. BioMed Central; 2016 May 18;4(1):51.

- Suzuki N, Maroof AM, Merkle FT, Koszka K, Intoh A, Armstrong I, et al. The mouse C9ORF72 ortholog is enriched in neurons known to degenerate in ALS and FTD. *Nat. Neurosci.* 2013 Dec 3;16(12):1725–7.
- Syslová K, Böhmová A, Mikoška M, Kuzma M, Pelclová D, Kačer P. Multimarker Screening of Oxidative Stress in Aging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014;2014:1–14.
- Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 2011;13(3):184–90.
- Talbot K. Motor neuron disease: THE BARE ESSENTIALS. *Pract. Neurol.* 2009 Oct 1;9(5):303–9.
- Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handb. Clin. Neurol.* 2016b;138:225–38.
- Tavernarakis N, Pasparaki A, Tasdemir E, Maiuri MC, Kroemer G. The effects of p53 on whole organism longevity are mediated by autophagy. *Autophagy.* 2008;4(7):870–3.
- Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature.* 2016;539(7628):197–206.
- Therrien M, Rouleau GA, Dion PA, Parker JA. Deletion of C9ORF72 results in motor neuron degeneration and stress sensitivity in *C. elegans*. *PLoS One.* 2013;8(12).
- Tremblay RG, Sikorska M, Sandhu JK, Lanthier P, Ribocco-Lutkiewicz M, Bani-Yaghoob M. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *J. Neurosci. Methods.* 2010 Jan 30;186(1):60–7.
- Valastyan JS, Lindquist S. Mechanisms of protein-folding diseases at a glance. *Dis. Model. Mech.* 2014;7(1):9–14.
- Vanderweyde T, Youmans K, Liu-Yesucevitz L, Wolozin B. Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: A mini-review. *Gerontology.* 2013. p. 524–33.
- Vasu S, Shah S, Orjalo A, Park M, Fischer WH, Forbes DJ. Novel vertebrate nucleoporins Nup133 and Nup160 play a role in mRNA export. *J. Cell Biol.* 2001 Oct 29;155(3):339–54.
- Vijayalakshmi K, Alladi PA, Ghosh S, Prasanna VK, Sagar BC, Nalini A, et al. Evidence of endoplasmic reticular stress in the spinal motor neurons exposed to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol. Dis.* 2011 Mar;41(3):695–705.
- Visser AE, Seelen M, Hulsbergen A, de Graaf J, van der Kooi AJ, Raaphorst J, et al. Exploring the fitness hypothesis in ALS: a population-based case-control study of parental cause of death and lifespan. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2017;(May 2010):jnnp-2016-315071.
- Vollmer B, Antonin W. The diverse roles of the Nup93/Nic96 complex proteins -

structural scaffolds of the nuclear pore complex with additional cellular functions. *Biol. Chem.* 2014 May;395(5):515–28.

Walter P, Ron D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* (80-. ). 2011 Nov 25;334(6059):1081–6.

Walther TC, Alves A, Pickersgill H, Loiodice I, Hetzer M, Galy V, et al. The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell.* 2003 Apr 18;113(2):195–206.

Wang H, O'Reilly ÉJ, Weisskopf MG, Logroscino G, McCullough ML, Thun MJ, et al. Smoking and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a pooled analysis of 5 prospective cohorts. *Arch. Neurol.* 2011 Feb 1;68(2):207–13.

Wang I-F, Guo B-S, Liu Y-C, Wu C-C, Yang C-H, Tsai K-J, et al. Autophagy activators rescue and alleviate pathogenesis of a mouse model with proteinopathies of the TAR DNA-binding protein 43. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012 Sep 11;109(37):15024–9.

Wang M-D, Little J, Gomes J, Cashman NR, Krewski D. Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology.* Elsevier B.V.; 2016a Jul;

Wang W, Li L, Lin W-L, Dickson DW, Petrucelli L, Zhang T, et al. The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Hum. Mol. Genet.* 2013 Dec 1;22(23):4706–19.

Wang W, Wang L, Lu J, Siedlak SL, Fujioka H, Liang J, et al. The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. 2016b.

Wang X, Fan H, Ying Z, Li B, Wang H, Wang G. Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neurosci. Lett.* 2010 Jan 18;469(1):112–6.

Wang X, Ma M, Teng J, Che X, Zhang W, Feng S, et al. Valproate Attenuates 25-kDa C-Terminal Fragment of TDP-43-Induced Neuronal Toxicity via Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress and Activating Autophagy. *Int. J. Biol. Sci.* Ivyspring International Publisher; 2015;11(7):752–61.

Webster CP, Smith EF, Bauer CS, Moller A, Hautbergue GM, Ferraiuolo L, et al. The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy. *EMBO J.* European Molecular Biology Organization; 2016 Aug 1;35(15):1656–76.

Weiduschat N, Mao X, Hupf J, Armstrong N, Kang G, Lange DJ, et al. Motor cortex glutathione deficit in ALS measured in vivo with the J-editing technique. *Neurosci. Lett.* 2014 Jun;570:102–7.

Weisskopf MG, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Cudkovicz M, Ascherio a. Prospective study of cigarette smoking and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Epidemiol.* 2004;160(1):26–33.

Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA. Mitochondrial DNA

- and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J. Neurochem.* 2002 Feb;80(4):616–25.
- Wong E, Cuervo AM. Integration of Clearance Mechanisms: The Proteasome and Autophagy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010 Dec 1;2(12):a006734–a006734.
- Wooley CM, Sher RB, Kale A, Frankel WN, Cox GA, Seburn KL. Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve.* 2005 Jul;32(1):43–50.
- Wu L-S, Cheng W-C, Hou S-C, Yan Y-T, Jiang S-T, Shen C-KJ. TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *genesis.* 2009 Jan;48(1):n/a-n/a.
- Xu Y-F, Gendron TF, Zhang Y-J, Lin W-L, D'Alton S, Sheng H, et al. Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J. Neurosci.* NIH Public Access; 2010 Aug 11;30(32):10851–9.
- Yamashita T, Aizawa H, Teramoto S, Akamatsu M, Kwak S. Calpain-dependent disruption of nucleo-cytoplasmic transport in ALS motor neurons. *Sci. Rep.* Nature Publishing Group; 2017 Jan 3;7:39994.
- Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Takano J, Iwata N, et al. A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. *Nat. Commun.* 2012 Dec 18;3:1307.
- Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010. p. 124–31.
- Yoshimura SH, Otsuka S, Kumeta M, Taga M, Takeyasu K. Intermolecular disulfide bonds between nucleoporins regulate karyopherin-dependent nuclear transport. *J. Cell Sci.* 2013a Jul 15;126(14):3141–50.
- Yoshimura SH, Otsuka S, Kumeta M, Taga M, Takeyasu K. Intermolecular disulfide bonds between nucleoporins regulate karyopherin-dependent nuclear transport. *J. Cell Sci.* 2013b Jul 15;126(14):3141–50.
- Zaldivar T, Gutierrez J, Lara G, Carbonara M, Logroscino G, Hardiman O. Reduced frequency of ALS in an ethnically mixed population: A population-based mortality study. *Neurology.* 2009;72(19):1640–5.
- Zapata-Zapata C, Franco-Dáger E, Solano-Atehortúa J, Ahunca-Velásquez L. Esclerosis lateral amiotrófica: actualización. *IATREIA.* Universidad de Antioquia; 2016 Apr 1;29(2):194–205.
- Zhan L, Xie Q, Tibbetts RS. Opposing roles of p38 and JNK in a *Drosophila* model of TDP-43 proteinopathy reveal oxidative stress and innate immunity as pathogenic components of neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 2015 Feb 1;24(3):757–72.
- Zhang J, Ito H, Wate R, Ohnishi S, Nakano S, Kusaka H. Altered distributions of nucleocytoplasmic transport-related proteins in the spinal cord of a mouse

model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2006 Oct 24;112(6):673–80.

Zhang K, Donnelly CJ, Haeusler AR, Grima JC, Machamer JB, Steinwald P, et al. The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature.* 2015 Sep 3;525(7567):56–61.

Zhang K, Grima JC, Rothstein JD, Lloyd TE. Nucleocytoplasmic transport in C9orf72-mediated ALS/FTD. *Nucleus.* 2016a Apr 26;1–6.

Zhang X, Chen S, Song L, Tang Y, Shen Y, Jia L, et al. MTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy.* 2014;10(4):588–602.

Zhang X, Li L, Chen S, Yang D, Wang Y, Zhang X, et al. Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy.* 2011;7(4):412–25.

Zhang Y-J, Gendron TF, Grima JC, Sasaguri H, Jansen-West K, Xu Y-F, et al. C9ORF72 poly(GA) aggregates sequester and impair HR23 and nucleocytoplasmic transport proteins. *Nat. Neurosci.* 2016b Mar 21;19(5):668–77.

Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD, et al. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011 Jan 4;108(1):260–5.

Zu T, Liu Y, Banez-Coronel M, Reid T, Pletnikova O, Lewis J, et al. RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013 Dec 17;110(51):E4968-7.

**ANEXOS**



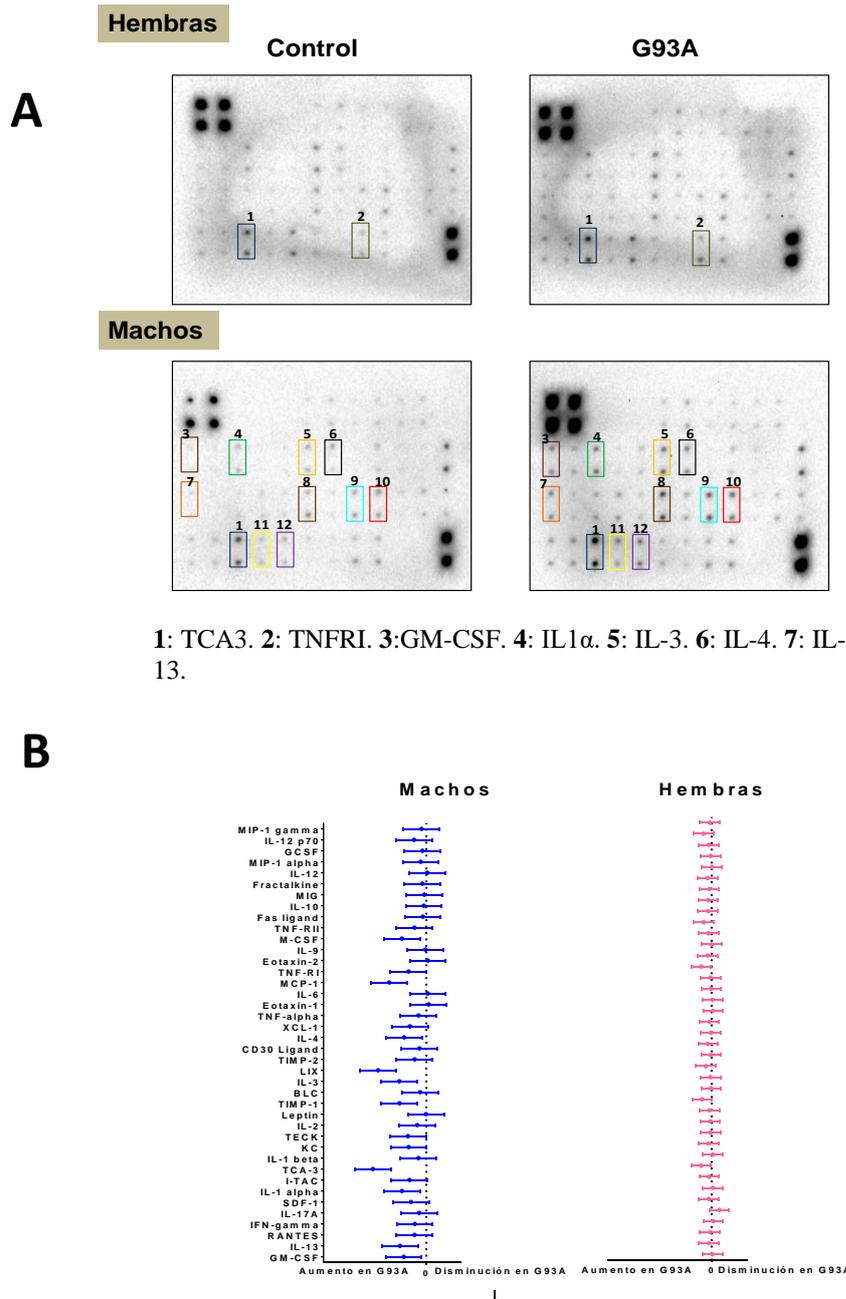


Figura 41. El género influye sobre el estado neuroinflamatorio de ratones G93A. A: Homogenados de médula espinal de ratones hSODG93A y controles de 100 días de edad, se analizaron mediante un ensayo de detección de citoquinas (RayBio AAM-INF-1-4). Las citoquinas diferenciales se muestran encuadradas y numeradas. B: Cuantificación de los valores promedios de inmunoreactividad de las citoquinas normalizadas con el estándar interno, representándose el intervalo de confianza al 95% según el estadístico de Sidak (prueba post-hoc en ANOVA). El punto central representa la media de dos valores, tras ANOVA de dos vías, considerando proteína y presencia de transgén como variables independientes, siendo ambos factores significativos tanto en machos ( $p < 0.01$  para la interacción,  $p < 0.0001$  para el tipo de proteína y  $p < 0.0001$  para el transgén; 10.5% varianza para interacción, 74% varianza para el tipo de proteína y 11.8% varianza por transgén) como en hembras ( $p = 0.08$  para la interacción,  $p < 0.0001$  para el tipo de proteína y  $p < 0.0001$  para el transgén; 4% varianza explicada por la interacción, 88% de varianza por el tipo de proteína y un 1.7% explicado por la presencia del transgén).

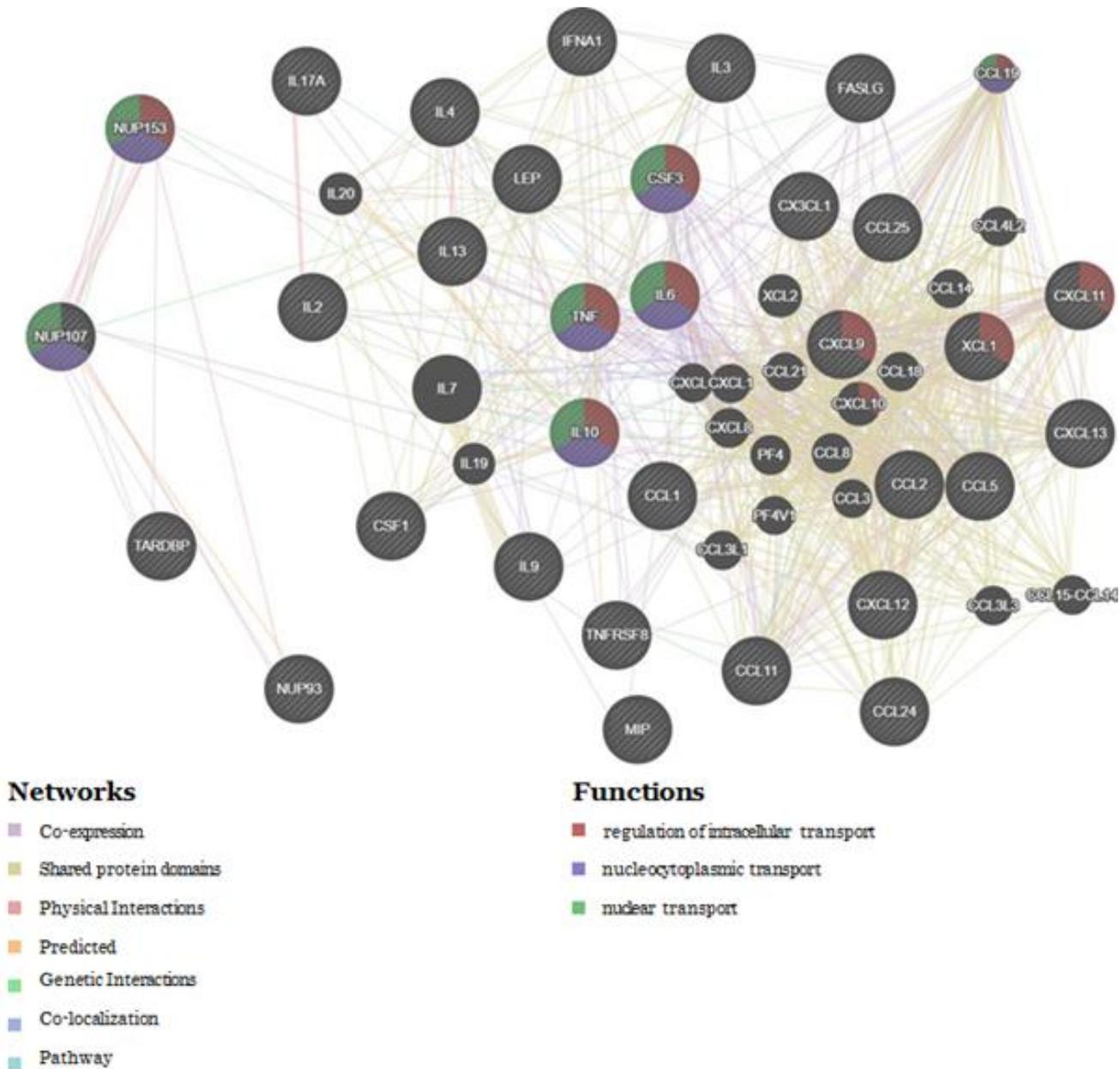


Figura 42. Análisis en red de la interacción de NUPs con genes involucrados en inflamación. Genes de NUPs y de citoquinas se analizaron mediante un Algoritmo de Integración de Red de Asociación Múltiple de Genes (GeneMania). En colores se representa los genes que comparten funciones relacionadas con el transporte intracelular. Las líneas de unión representan las interacciones entre genes (ver Networks). Nótese que NUP107 y NUP153 se relacionan con varias citoquinas como TNF, IL-6, IL-10 y CSF 3 a través de líneas de coexpresión y colocalización, además de compartir funciones relacionadas con el transporte nucleocitoplasmático.

## Specific Lipidome Signatures in Central Nervous System from Methionine-Restricted Mice

Mariona Jové,<sup>†,‡</sup> Victòria Ayala,<sup>†,‡</sup> Omar Ramírez-Núñez,<sup>†</sup> Alba Naudí,<sup>†</sup> Rosanna Cabré,<sup>†</sup> Corinne M. Spickett,<sup>§</sup> Manuel Portero-Otín,<sup>†</sup> and Reinald Pamplona<sup>\*,†</sup>

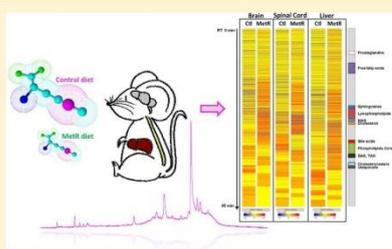
<sup>†</sup>Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, University of Lleida-IRBLleida, Lleida, Spain

<sup>§</sup>School of Life and Health Sciences, Aston University, Birmingham, United Kingdom

Supporting Information

**ABSTRACT:** Membrane lipid composition is an important correlate of the rate of aging of animals. Dietary methionine restriction (MetR) increases lifespan in rodents. The underlying mechanisms have not been elucidated but could include changes in tissue lipidomes. In this work, we demonstrate that 80% MetR in mice induces marked changes in the brain, spinal cord, and liver lipidomes. Further, at least 50% of the lipids changed are common in the brain and spinal cord but not in the liver, suggesting a nervous system-specific lipidomic profile of MetR. The differentially expressed lipids includes (a) specific phospholipid species, which could reflect adaptive membrane responses, (b) sphingolipids, which could lead to changes in ceramide signaling pathways, and (c) the physiologically redox-relevant ubiquinone 9, indicating adaptations in phase II antioxidant response metabolism. In addition, specific oxidation products derived from cholesterol, phosphatidylcholine, and phosphatidylethanolamine were significantly decreased in the brain, spinal cord, and liver from MetR mice. These results demonstrate the importance of adaptive responses of membrane lipids leading to increased stress resistance as a major mechanistic contributor to the lowered rate of aging in MetR mice.

**KEYWORDS:** membrane unsaturation, phospholipids oxidation, rate of aging, mitochondria, free radicals, phase-II antioxidants



### INTRODUCTION

Membrane lipid composition is an important correlate of the rate of aging of animals.<sup>1–3</sup> A low degree of unsaturation of cellular membranes is a characteristic of long-lived animal species, both vertebrates and invertebrates.<sup>2</sup> Besides fatty acid unsaturation, lipid classes also change with aging: it is known that both human serum<sup>4</sup> and cellular<sup>5</sup> metabolome/lipidome changes with age. In rodents, aging affects brain phospholipids classes,<sup>6</sup> and this relationship extends to mitochondrial lipids where it is particularly apparent in phosphatidylcholines (PC) and phosphatidylethanolamines (PE).<sup>7,8</sup>

Among the cellular constituents, lipids (cholesterol, phospholipids and others) are relevant targets of oxidative attack leading to the formation and accumulation of lipid peroxidation (LPO) products, such as oxysterols, hydroperoxides and endoperoxides.<sup>9</sup> The fragmentation of these LPO products produces a wide range of reactive carbonyl intermediates which can, finally, react and damage cellular proteins, aminophospholipids and DNA.<sup>2,3,10</sup> Although these molecules play a role as physiological mediators of cellular antioxidant signaling pathways,<sup>2</sup> progressive accumulation of their modifications on target molecules results in tissue and cell dysfunction, a typical feature of aging and oxidative-stress related diseases.<sup>11</sup> In this sense, it has been known for many

years that fatty acids differ dramatically in their susceptibility to peroxidation. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are the most susceptible, and the greater the degree of unsaturation of a PUFA molecule the greater its susceptibility to peroxidation, while both saturated fatty acids (SFAs) and monounsaturated fatty acids (MUFAs) are almost incapable of being peroxidized by physiological oxidants.<sup>3,12</sup> In long-lived animal species, including birds and mammals, a low degree of membrane fatty acid unsaturation is associated with a low sensitivity to LPO *in vivo* and *in vitro* and, consequently, a low steady-state level of lipoxidation-derived adducts in both tissue and mitochondrial proteins of skeletal muscle, heart, liver, and brain.<sup>2</sup>

In this scenario, tissues with postmitotic cells (like brain, heart or skeletal tissues) tend to accumulate high quantities of LPO products with aging.<sup>2,3</sup> Indeed, lipofuscin accumulation (basically derived from LPO reactions) is a cellular hallmark of aging.<sup>13</sup> In particular, the central nervous system (CNS) is a very sensitive target for LPO damage because of the high level of polyunsaturated lipids in neuronal cell membranes, high metabolic rate and relatively poor antioxidant defense.<sup>14,15</sup> Accordingly, oxidative stress is very pronounced in a number of

Received: January 22, 2013

Published: April 16, 2013



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbadis](http://www.elsevier.com/locate/bbadis)

## Oral intake of genetically engineered high-carotenoid corn ameliorates hepatomegaly and hepatic steatosis in PTEN haploinsufficient mice



Nuria Eritja<sup>a,\*</sup>, Gemma Arjó<sup>b,1</sup>, Maria Santacana<sup>a</sup>, Sònia Gatius<sup>a</sup>, Omar Ramírez-Núñez<sup>c</sup>, Laura Arcal<sup>b</sup>, José C.E. Serrano<sup>c</sup>, Reinald Pamplona<sup>c</sup>, Xavi Dolcet<sup>a</sup>, Carme Piñol<sup>b</sup>, Paul Christou<sup>d,e</sup>, Xavier Matias-Guiu<sup>a,2</sup>, Manuel Portero-Otin<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Oncologic Pathology Group, Dept. de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), Lleida, Spain

<sup>b</sup> Departament de Medicina, Universitat de Lleida-Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), Lleida, Spain

<sup>c</sup> Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, University of Lleida-IRBLleida, Av. Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain

<sup>d</sup> Department of Plant Production and Forestry Science, School of Agrifood and Forestry Science and Engineering (ETSEA), University of Lleida-Agrotecnio Center, Lleida, Spain

<sup>e</sup> Institut Català de Recerca i Estudis Avançats, Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 October 2015

Received in revised form 19 January 2016

Accepted 24 January 2016

Available online 26 January 2016

#### Keywords:

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

Genetically engineered high-carotenoid corn

PTEN

Retinoic acid

### ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common form of chronic liver disease. Here we show that a mouse model of haploinsufficiency in the lipid and protein phosphatase and tensin homolog protein (PTEN<sup>+/-</sup>) exhibits hepatomegaly, increased liver lipogenic gene expression (*SREBP-1C* and *PPAR $\gamma$* ) and hepatic lesions analogous to human NAFLD. The livers of PTEN<sup>+/-</sup> mice also contained lower levels of retinoic acid (RA) than normal, similarly to human NAFLD patients. The RA signaling pathway thus offers a novel therapeutic target for the treatment of NAFLD although the impact of nutrition in this context is unclear. We therefore fed PTEN<sup>+/-</sup> mice for 36 weeks a diet containing genetically engineered high-carotenoid corn (HCAR) to investigate its potential beneficial effects on the hepatic symptoms of NAFLD. The HCAR diet reduced hepatomegaly and promoted the repartitioning of fatty acids in the liver, away from triacylglycerol storage. At the molecular level, the HCAR diet clearly reduced lipogenic gene expression, boosted catabolism, and increased hepatic RA levels. These results set the stage for human trials to evaluate the use of high-carotenoid foods for the reduction or prevention of steatosis in NAFLD.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is viewed as the most common form of chronic liver disease. NAFLD pathology involves hepatic macrovesicular steatosis with inflammation. In the past, these symptoms were considered benign, but NAFLD is a progressive disease that ultimately leads to cirrhosis and eventually hepatocellular carcinoma [1]. The precise molecular pathophysiology of NAFLD remains unclear, but the widely favored two-hit theory involves an initial increase in triglyceride accumulation due to a discrepancy between the influx, synthesis and export of hepatic lipids, followed by a

second hit comprising the integration of multiple cellular responses including oxidative stress, lipid peroxidation, the production of pro-inflammatory cytokines and mitochondrial dysfunction [2].

The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway regulates processes such as cell migration, apoptosis, cell cycle progression, transcription and translation. The pathway is activated by the binding of growth factors to a receptor tyrosine kinase, whereupon PI3K is recruited to the receptor complex. Activated PI3K converts phosphatidylinositol biphosphate PI(4,5)P2 to phosphatidylinositol triphosphate PI(3,4,5)P3, which subsequently phosphorylates Akt via phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1). The lipid and protein phosphatase and tensin homolog protein (PTEN) is a phosphoinositide phosphatase that competes with phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activity by dephosphorylating PI(3,4,5)P3 to produce PI(4,5)P2 [3]. Homozygous gene deletions, somatic mutations, or the loss of PTEN expression cause hyperactive PI3K signaling that triggers many sporadic cancers in humans, as well as tumorigenic hereditary disorders such as Cowden disease. Abnormal PTEN activity is also associated with the development of hepatic diseases related to obesity, including diabetes, hepatitis B and C, and hepatocellular carcinoma [4]. Insulin promotes glycogen synthesis, glycolysis, and fatty acid synthesis and accumulation in the liver

\* Corresponding author at: Department of Basic Medical Sciences, Biomedical Research Institute (IRB) of Lleida-UdL, Biomedicine I Building, Office 2.4, Av. Alcalde Rovira Roure, 80, 25198 Lleida-Spain.

\*\* Corresponding author at: Department of Experimental Medicine, Biomedical Research Institute (IRB) of Lleida-UdL, Biomedicine I Building, Office 3.13, Av. Alcalde Rovira Roure, 80, 25198 Lleida-Spain.

E-mail addresses: [nerija@irblleida.cat](mailto:nerija@irblleida.cat) (N. Eritja), [manuel.portero@mex.udl.cat](mailto:manuel.portero@mex.udl.cat)

(M. Portero-Otin).

<sup>1</sup> These two authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Senior co-authors.



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ynbdi](http://www.elsevier.com/locate/ynbdi)

## Interplay between TDP-43 and docosahexaenoic acid-related processes in amyotrophic lateral sclerosis



Daniel Cacabelos<sup>a,1</sup>, Victòria Ayala<sup>a,1</sup>, Ana Belén Granado-Serrano<sup>a,1</sup>, Mariona Jové<sup>a,1</sup>, Pascual Torres<sup>a</sup>, Jordi Boada<sup>a</sup>, Rosanna Cabré<sup>a</sup>, Omar Ramírez-Núñez<sup>a</sup>, Hugo Gonzalo<sup>a</sup>, Aranzazu Soler-Cantero<sup>b</sup>, José Carlos Enrique Serrano<sup>a</sup>, Maria Josep Bellmunt<sup>a</sup>, María Paz Romero<sup>b</sup>, María José Motilva<sup>b</sup>, Takashi Nonaka<sup>c</sup>, Masato Hasegawa<sup>b</sup>, Isidre Ferrer<sup>d,e</sup>, Reinald Pamplona<sup>a,\*</sup>, Manuel Portero-Otín<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departament de Medicina Experimental, Facultat de Medicina, IRBLLIDA-UDL, Avda Rovira Roure, 44, 25008 Lleida, Spain

<sup>b</sup> Departament de Tecnologia d'Aliments, XaRTA-TPV, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària, Udl, Avda Rovira Roure, 85, 25008 Lleida, Spain

<sup>c</sup> Department of Neuropathology and Cell Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan

<sup>d</sup> Institut de Neuropatologia, Hospital Universitari de Bellvitge - IDIBELL, Universitat de Barcelona, Spain

<sup>e</sup> CIBERNED (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas), Instituto Carlos III, Spanish Ministry of Health, Spain. L'Hospitalet de Llobregat, c/ La Feixa Llarga, S/N 08908 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 June 2015

Revised 9 December 2015

Accepted 9 January 2016

Available online 12 January 2016

#### Keywords:

Motor neuron

Lipidomic

Oxidative stress

TDP-43

Polysaturated fatty acids

Mitochondria

### ABSTRACT

**Background:** Docosahexaenoic acid (DHA), a key lipid in nervous system homeostasis, is depleted in the spinal cord of sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS) patients. However, the basis for such loss was unknown.

**Methods:** DHA synthetic machinery was evaluated in spinal cord samples from ALS patients and controls by immunohistochemistry and western blot. Further, lipid composition was measured in organotypic spinal cord cultures by gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. In these samples, mitochondrial respiratory functions were measured by high resolution respirometry. Finally, Neuro2-A and stem cell-derived human neurons were used for evaluating mechanistic relationships between TDP-43 aggregation, oxidative stress and cellular changes in DHA-related proteins.

**Results:** ALS is associated to changes in the spinal cord distribution of DHA synthesis enzymatic machinery comparing ten ALS cases and eight controls. We found increased levels of desaturases (ca 95% increase,  $p < 0.001$ ), but decreased amounts of DHA-related  $\beta$ -oxidation enzymes in ALS samples (40% decrease,  $p < 0.05$ ). Further, drebrin, a DHA-dependent synaptic protein, is depleted in spinal cord samples from ALS patients (around 40% loss,  $p < 0.05$ ). In contrast, chronic excitotoxicity in spinal cord increases DHA acid amount, with both enhanced concentrations of neuroprotective docosahexaenoic acid-derived resolvin D, and higher lipid peroxidation-derived molecules such as 8-iso-prostaglandin-F<sub>2</sub>- $\alpha$  (8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) levels. Since  $\alpha$ -tocopherol improved mitochondrial respiratory function and motor neuron survival in these conditions, it is suggested that oxidative stress could boost motor neuron loss. Cell culture and metabolic flux experiments, showing enhanced expression of desaturases (FADS2) and  $\beta$ -oxidation enzymes after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge suggest that DHA production can be an initial response to oxidative stress, driven by TDP-43 aggregation and drebrin loss. Interestingly, these changes were dependent on cell type used, since human neurons exhibited losses of FADS2 and drebrin after oxidative stress. These features (drebrin loss and FADS2 alterations) were also produced by transfection by aggregation prone C-terminal fragments of TDP-43.

**Conclusions:** sALS is associated with tissue-specific DHA-dependent synthetic machinery alteration. Furthermore, excitotoxicity synergizes with oxidative stress to increase DHA levels, which could act as a response over stress, involving the expression of DHA synthetic enzymes. Later on, this allostatic overload

#### \* Corresponding authors.

E-mail addresses: [dcacabelos@mex.udl.cat](mailto:dcacabelos@mex.udl.cat) (D. Cacabelos), [victoria.ayala@mex.udl.cat](mailto:victoria.ayala@mex.udl.cat) (V. Ayala), [anabgs@mex.udl.cat](mailto:anabgs@mex.udl.cat) (A.B. Granado-Serrano), [mariona.jove@udl.cat](mailto:mariona.jove@udl.cat) (M. Jové), [pascualt92@gmail.com](mailto:pascualt92@gmail.com) (P. Torres), [jboada@mex.udl.cat](mailto:jboada@mex.udl.cat) (J. Boada), [rosanna.cabre@mex.udl.cat](mailto:rosanna.cabre@mex.udl.cat) (R. Cabré), [omar.ramirez78@mex.udl.cat](mailto:omar.ramirez78@mex.udl.cat) (O. Ramírez-Núñez), [hugonzalo@gmail.com](mailto:hugonzalo@gmail.com) (H. Gonzalo), [asocan@hotmail.com](mailto:asocan@hotmail.com) (A. Soler-Cantero), [jcserrano@mex.udl.cat](mailto:jcserrano@mex.udl.cat) (J.C.E. Serrano), [mjosep.bellmunt@cmb.udl.cat](mailto:mjosep.bellmunt@cmb.udl.cat) (M.J. Bellmunt), [maripaz@tecal.udl.cat](mailto:maripaz@tecal.udl.cat) (M.P. Romero), [motilva@tecal.udl.cat](mailto:motilva@tecal.udl.cat) (M.J. Motilva), [nonaka-tk@igakuken.or.jp](mailto:nonaka-tk@igakuken.or.jp) (T. Nonaka), [hasegawa-ms@igakuken.or.jp](mailto:hasegawa-ms@igakuken.or.jp) (M. Hasegawa), [8082ifa@gmail.com](mailto:8082ifa@gmail.com) (I. Ferrer), [reinald.pamplona@mex.udl.cat](mailto:reinald.pamplona@mex.udl.cat) (R. Pamplona), [manuel.portero@mex.udl.cat](mailto:manuel.portero@mex.udl.cat) (M. Portero-Otín).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

Available online on ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).

## Resveratrol Improves Motoneuron Function and Extends Survival in SOD1<sup>G93A</sup> ALS Mice

Renzo Mancuso · Jaime del Valle · Laura Modol · Anna Martínez · Ana B Granado-Serrano · Omar Ramirez-Núñez · Mercé Pallás · Manel Portero-Otin · Rosario Osta · Xavier Navarro

Published online: 11 January 2014  
 © The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc. 2014

**Abstract** Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult onset neurodegenerative disease that causes progressive paralysis and death due to degeneration of motoneurons in spinal cord, brainstem and motor cortex. Nowadays, there is no effective therapy and patients die 2–5 years after diagnosis. Resveratrol (trans-3,4',5-trihydroxystilbene) is a natural polyphenol found in grapes, with promising neuroprotective effects since it induces expression and activation of several neuroprotective pathways involving Sirtuin1 and AMPK. The objective of this work was to assess the effect of resveratrol administration on SOD1<sup>G93A</sup> ALS mice. We determined the onset of symptoms by rotarod test and evaluated upper and lower motoneuron function using electrophysiological tests.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s13311-013-0253-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Mancuso · J. del Valle · L. Modol · A. Martínez · X. Navarro  
 Institute of Neurosciences and Department of Cell Biology,  
 Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona,  
 and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades  
 Neurodegenerativas (CIBERNED), Bellaterra, Spain

A. B. Granado-Serrano · O. Ramirez-Núñez · M. Portero-Otin  
 Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine,  
 Universitat de Lleida-IRBLleida, Lleida, Spain

M. Pallás  
 Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia,  
 Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, and  
 CIBERNED, Barcelona, Spain

R. Osta  
 Laboratory of Genetic Biochemistry (LAGENBIO-I3A), Aragon  
 Institute of Health Sciences, Universidad de Zaragoza, Zaragoza,  
 Spain

X. Navarro (✉)  
 Unitat de Fisiologia Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat  
 Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain  
 e-mail: xavier.navarro@uab.cat

We assessed the survival of the animals and determined the number of spinal motoneurons. Finally, we further investigated resveratrol mechanism of action by means of western blot and immunohistochemical analysis. Resveratrol treatment from 8 weeks of age significantly delayed disease onset and preserved lower and upper motoneuron function in female and male animals. Moreover, resveratrol significantly extended SOD1<sup>G93A</sup> mice lifespan and promoted survival of spinal motoneurons. Delayed resveratrol administration from 12 weeks of age also improved spinal motoneuron function preservation and survival. Further experiments revealed that resveratrol protective effects were associated with increased expression and activation of Sirtuin 1 and AMPK in the ventral spinal cord. Both mediators promoted normalization of the autophagic flux and, more importantly, increased mitochondrial biogenesis in the SOD1<sup>G93A</sup> spinal cord. Taken together, our findings suggest that resveratrol may represent a promising therapy for ALS.

**Keywords** Motoneuron disease · Amyotrophic lateral sclerosis · Resveratrol · Sirtuin 1 · AMPK · SOD1<sup>G93A</sup> mice

### Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the death of upper and lower motoneurons (MN) that clinically manifests by progressive muscle atrophy and paralysis [1]. Although the majority of ALS cases are sporadic with unknown etiology, 10 % of them are inherited forms, caused by genetic mutations. Among these, mutations in the gene encoding for the enzyme Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) are observed in about 20 % of the patients [2]. The study of these genetic mutations led to the development of several transgenic animal models of ALS. The most widely used is a transgenic mouse that over-

## RESEARCH

## Open Access



# Early and gender-specific differences in spinal cord mitochondrial function and oxidative stress markers in a mouse model of ALS

Daniel Cacabelos<sup>1</sup>, Omar Ramírez-Núñez<sup>1</sup>, Ana Belén Granado-Serrano<sup>1</sup>, Pascual Torres<sup>1</sup>, Victòria Ayala<sup>1</sup>, Victoria Moiseeva<sup>1</sup>, Mònica Povedano<sup>2</sup>, Isidre Ferrer<sup>3</sup>, Reinald Pamplona<sup>1</sup>, Manuel Portero-Otin<sup>1\*</sup> and Jordi Boada<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Introduction:** Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a motor neuron disease with a gender bias towards major prevalence in male individuals. Several data suggest the involvement of oxidative stress and mitochondrial dysfunction in its pathogenesis, though differences between genders have not been evaluated. For this reason, we analysed features of mitochondrial oxidative metabolism, as well as mitochondrial chain complex enzyme activities and protein expression, lipid profile, and protein oxidative stress markers, in the Cu,Zn superoxide dismutase with the G93A mutation (hSOD1-G93A)- transgenic mice and Neuro2A(N2A) cells overexpressing hSOD1-G93A.

**Results and Conclusions:** Our results show that overexpression of hSOD1-G93A in transgenic mice decreased efficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation, located at complex I, revealing a temporal delay in females with respect to males associated with a parallel increase in selected markers of protein oxidative damage. Further, females exhibit a fatty acid profile with higher levels of docosahexaenoic acid at 30 days. Mechanistic studies showed that hSOD1-G93A overexpression in N2A cells reduced complex I function, a defect prevented by 17 $\beta$ -estradiol pretreatment. In conclusion, ALS-associated SOD1 mutation leads to delayed mitochondrial dysfunction in female mice in comparison with males, in part attributable to the higher oestrogen levels of the former. This study is important in the effort to further understanding of whether different degrees of spinal cord mitochondrial dysfunction could be disease modifiers in ALS.

**Keywords:** Motor neuron, Complex I, Respirometry, Fatty acid composition, Oxidative damage, Estrogens

## Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS, OMIM #105400), the motor neuron disorder with the highest level of occurrence in adult humans, is characterized by a progressive loss of upper and lower motor neurons that leads to muscular atrophy, paralysis, and death after an average disease duration of 3 years [1]. The most common form of ALS is sporadic, having no apparent inheritability, whereas the dominantly inherited familial ALS accounts

for only about 5–10 % of all ALS patients [2, 3]. Among the genetic causes of ALS, 15–20 % of familial ALS cases and about 5 % of sporadic ALS cases are associated with multiple mutations in the gene for Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1), which imparts an increase in a novel toxic function to this otherwise superoxide radical scavenging enzyme in normal conditions [4]. Mutated SOD1 forms misfold, aggregate, and accumulate primarily in spinal cord motor neurons and glial cells of ALS patients [5]. Furthermore, transgenic mice overexpressing mutant forms of the human *sod1* gene develop a progressive motor neuron syndrome similar to the human ALS phenotype [6, 7] and they have been extensively used as

\* Correspondence: manuel.portero@mex.udl.cat; jboada@mex.udl.cat  
<sup>1</sup>The Metabolic Pathophysiology Research Group, Department Experimental Medicine, University of Lleida-Institute for Research in Biomedicine of Lleida (UdL-IRBLleida), Avda Rovira Roure, 80, E-25198 Lleida, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Cacabelos et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



## Caloric restriction reveals a metabolomic and lipidomic signature in liver of male mice

Mariona Jové,<sup>1</sup> Alba Naudí,<sup>1</sup> Omar Ramírez-Núñez,<sup>1</sup> Manuel Portero-Otín,<sup>1</sup> Colin Selman,<sup>2</sup> Dominic J. Withers<sup>3</sup> and Reinald Pamplona<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Medicine, University of Lleida-Biomedical Research Institute of Lleida, Lleida 25198, Spain

<sup>2</sup>Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, University of Glasgow, Graham Kerr Building, Glasgow G12 8QQ, UK

<sup>3</sup>Metabolic Signaling Group, Medical Research Council Clinical Sciences Centre, Imperial College London, London W12 0NN, UK

### Summary

**Lipid composition, particularly membrane unsaturation, has been proposed as being a lifespan determinant, but it is currently unknown whether caloric restriction (CR), an accepted life-extending intervention, affects cellular lipid profiles. In this study, we employ a liquid chromatography quadrupole time-of-flight-based methodology to demonstrate that CR in the liver of male C57BL/6 mice: (i) induces marked changes in the cellular lipidome, (ii) specifically reduces levels of a phospholipid peroxidation product, 1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine, (iii) alters cellular phosphoethanolamine and triglyceride distributional profiles, (iv) affects mitochondrial electron transport chain complexes, increasing complex II and decreasing complex III and (v) is associated with specific changes in liver metabolic pathways. These data demonstrate that CR induces a specific lipidome and metabolome reprogramming event in mouse liver which is associated with lower protein oxidative damage, as assessed by mass spectrometry-based measurements. Such changes may be critical to the increased lifespan and healthspan observed in C57BL/6 mice following CR.**

**Key words:** caloric restriction; glycolytic pathway; phospholipids oxidation; protein oxidative damage; tryptophan pathway.

### Introduction

Membrane fatty acid composition appears to play an important role in the aging process and in the determination of interspecies longevity (Pamplona *et al.*, 2002; Hulbert *et al.*, 2007; Pamplona, 2008). Likewise, mitochondrial lipids, including phosphatidylcholines (PC) and

phosphatidylethanolamines (PE), show a similar relationship, with longer life being correlated with a lower incidence of fatty acid double bonds (Mitchell *et al.*, 2007). Fatty acids differ dramatically in their susceptibility to peroxidation. Saturated fatty acids (SFAs) and mono-unsaturated fatty acids (MUFAs) are highly resistant to peroxidation by physiological oxidants. In contrast, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are particularly susceptible, with the higher the unsaturation index of a fatty acid molecule the higher its susceptibility to peroxidation (Hulbert *et al.*, 2007). Several studies also report that the level of unsaturation in membrane phospholipids increases in an age-dependent manner (Lambert *et al.*, 2004; Laganier & Yu, 1993; see review Naudí *et al.*, 2013). Furthermore, longer lived animals (both vertebrates and invertebrates) exhibit a lower degree of membrane fatty acid unsaturation and are relatively resistant to *in vivo* and *in vitro* lipid peroxidation (LPO) (Pamplona *et al.*, 1996, 1998; Hulbert *et al.*, 2006; see review Naudí *et al.*, 2013). This LPO resistance in tissues and mitochondrial proteins from long-lived animals leads to a lower steady-state level of lipoxidation-derived adducts formed by the interaction of proteins and DNA with LPO-derived soluble intermediates, e.g. oxysterols, hydroperoxides, endoperoxides and reactive carbonyl components (Zimniak, 2011; Naudí *et al.*, 2013). While these species could act as physiological mediators, the progressive accumulation of their derived modifications is associated with tissue and cellular dysfunction, and are a typical feature of aging and of various pathologies (Pamplona, 2011).

Caloric restriction (CR) has been shown to increase both median and maximum lifespan in many organisms (Minor *et al.*, 2010; Selman, 2014) although the positive effects of CR on lifespan do not appear to be universal (Cooper *et al.*, 2004; Swindell, 2012; Selman, 2014). CR also induces a range of beneficial health benefits in many organisms including humans (Mercken *et al.*, 2013), and it would appear, in some instances, that significant health benefits can exist without lifespan extension (Selman, 2014). While the effects of CR on lifespan and healthspan have been known for nearly a century, the precise molecular mechanisms underlying these effects remain unknown, although a whole range of putative mechanisms have been proposed (Anderson & Weindruch, 2010; Xiang & He, 2011). For example, oxidative damage to biomolecules has been suggested as being a key mechanism underlying aging (Gredilla & Barja, 2005; Naudí *et al.*, 2013), and that CR may act by directly reducing molecular oxidative damage. Taking into account the role of lipids in membrane characteristics and in aging (see above), CR seems to trigger an adaptive response protecting membrane integrity (Naudí *et al.*, 2013). Thus, CR might delay aging and extend longevity through mechanisms that involve changes in the lipoxidative status (Gredilla & Barja, 2005; Yang & Hekimi, 2010; Kowaltowski, 2011; Ristow & Schmeisser, 2011).

Due to the relationship of lipids with aging (e.g. changes in membrane fatty acid composition and membrane order parameters, increased levels of membrane LPO and lipoxidative products accumulation) (Hulbert *et al.*, 2007; Naudí *et al.*, 2013), it is feasible to postulate that some of the life and health extending effects of CR would lead to age-resistant profiles in lipid composition. Given that currently little is known on how CR impacts on the lipidome, we characterized the impact of CR on the liver lipidome in male C57BL/6 mice by performing mass

### Correspondence

Professor Dominic J. Withers, Metabolic Signaling Group, Medical Research Council Clinical Sciences Centre, Imperial College, London W12 0NN, UK.  
Tel.: +44 2083833014; fax: +44 2083838303; e-mail: d.withers@imperial.ac.uk and

Professor Reinald Pamplona, Department of Experimental Medicine, University of Lleida-Biomedical Research Institute of Lleida (IRBLleida), Av. Alcalde Rovira Roure-80, 25198 Lleida, Spain. Tel.: +34 973702442; fax: +34 973702426; e-mail: reinald.pamplona@mex.udl.cat

Accepted for publication 18 May 2014

Neuromol Med (2014) 16:669–685  
 DOI 10.1007/s12017-014-8317-7

ORIGINAL PAPER

## Dietary Lipid Unsaturation Influences Survival and Oxidative Modifications of an Amyotrophic Lateral Sclerosis Model in a Gender-Specific Manner

Daniel Cacabelos · Victoria Ayala · Omar Ramírez-Núñez · Ana Belen Granado-Serrano · Jordi Boada · Jose C. E. Serrano · Rosanna Cabré · Gisela Nadal-Rey · Maria Josep Bellmunt · Isidro Ferrer · Reinald Pamplona · Manuel Portero-Otin

Received: 1 January 2014 / Accepted: 20 June 2014 / Published online: 1 July 2014  
 © Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** The implication of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS) derive from high abundance of peroxidation-prone polyunsaturated fatty acids in central nervous system and its relatively low antioxidant content. In the present work, we evaluated the effect of dietary changes aimed to modify fatty acid tissular composition in survival, disease onset, protein, and DNA oxidative modifications in the hSODG93A transgenic mice, a model of this motor neuron disease. Both survival and clinical evolution is dependent on dietary fatty acid unsaturation and gender, with high unsaturated diet, leading to loss of the disease-sparing effect of feminine gender. This was associated with significant increases in protein carbonyl and glycoxidative

modifications as well as non-nuclear 8-oxo-dG, a marker of mitochondrial DNA oxidation. Comparison of these data with  $\gamma$ H2AX immunostaining, a marker of DNA damage response, suggests that the highly unsaturated diet-blunted mitochondrial–nuclear free radical dependent crosstalk, since increased 8-oxo-dG was not correlated with increased DNA damage response. Paradoxically, the highly unsaturated diet led to lower peroxidizability but higher anti-inflammatory indexes. To sum up, our results demonstrate that high polyunsaturated fatty acid content in diets may accelerate the disease in this model. Further, these results reinforce the need for adequately defining gender as a relevant factor in ALS models, as well as to use structurally characterized markers for oxidative damage assessment in neurodegeneration.

**Keywords** Oxidative stress · Polyunsaturated fatty acid · DNA repair response · Gender dimorphism · Lipid peroxidation

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s12017-014-8317-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Cacabelos · V. Ayala · O. Ramírez-Núñez · A. B. Granado-Serrano · J. Boada · J. C. E. Serrano · R. Cabré · G. Nadal-Rey · M. J. Bellmunt · R. Pamplona · M. Portero-Otin (✉)  
 NUTREN-Nutrigenomics, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida-Universitat de Lleida, Av. Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain  
 e-mail: manuel.portero@mex.udl.cat

I. Ferrer  
 Institut de Neuropatologia, Hospital Universitari de Bellvitge - IDIBELL, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

I. Ferrer  
 CIBERNED (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas), Instituto Carlos III, Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain

### Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS, OMIM #105400) is a neurodegenerative, motor neuron-specific disease that causes death within 2–5 years after diagnosis. ALS sporadic forms account for most of the cases and despite much effort have been done, their causes remain unclear. However, familial forms of the disease (fALS) provide a valuable tool for the development of animal models to gain insight into disease mechanisms and therapy design, especially at preclinical stages. A breakthrough point in this line was the discovery by Rosen (1993), showing that mutations in Cu/ZnSOD were a primary cause for ALS. Since then, multiple mutations on Cu/ZnSOD (more than



Cardiovascular Research (2013) 97, 642–652  
doi:10.1093/cvr/cvs368

## Lipidomic and metabolomic analyses reveal potential plasma biomarkers of early atheromatous plaque formation in hamsters

Mariona Jové<sup>1</sup>, Victòria Ayala<sup>1</sup>, Omar Ramírez-Núñez<sup>1</sup>, José C. E. Serrano<sup>1</sup>, Anna Cassanyé<sup>1</sup>, Lluís Arola<sup>2,3</sup>, Antoni Caimari<sup>3</sup>, Josep M. del Bas<sup>3</sup>, Anna Crescenti<sup>3</sup>, Reinald Pamplona<sup>1</sup>, and Manuel Portero-Otín<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, Universitat de Lleida-IRBLleida, 25198 Lleida, Spain; <sup>2</sup>Nutrigenomics Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; and <sup>3</sup>Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (CTNS), TECNIO, CEICS, Reus, Spain

Received 2 July 2012; revised 29 October 2012; accepted 10 December 2012; online publish ahead-of-print 12 December 2012

Time for primary review: 85 days

### Aims

Atherosclerosis is the main pathological process contributing to cardiovascular disease, with diet being the most important factor involved. Although the lipidome of atheromatous plaque has been studied previously, the use of comparative lipidomics and metabolomics in plasma in early atherogenesis could lead to the discovery of plasma biomarkers that allow not only disease prediction but also measurement of disease progression.

### Methods and results

High-throughput techniques, such as liquid chromatography/mass spectrometry, allowed us to compare the circulating and aortic lipidome and plasma metabolome in order to look for new molecular targets involved in atherogenesis. To achieve this objective, we chose the hamster (*Mesocricetus auratus*) as the best small animal model for diet-induced early atherosclerosis, because its lipoprotein metabolism is similar to that of humans. The results revealed the existence of several, previously unreported, changes in lipid and amino-acid metabolism, the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  pathway, and oxidative and endoplasmic reticulum stress, also involving cell senescence. Furthermore, as a proof of concept in the modelling of dietary influences in atherogenesis, we have measured the effect of a potential anti-atherogenic polyphenol extract on the reported pathways. Our results support a previously unknown role for taurocholic acid as a potential plasma biomarker of early atheromatous plaque formation.

### Conclusion

The use of comparative liquid chromatography/mass spectrometry-based lipidomics and metabolomics allows the discovery of novel pathways in atherogenesis, as well as new potential plasma biomarkers, which could allow us to predict disease in its early stages and measure its progression.

### Keywords

Sphingolipids • Free cholesterol • Taurocholic acid • Cell senescence • Phospholipid oxidation

## 1. Introduction

Atherogenesis, a major contributor to cardiovascular diseases (CVDs), is a pathophysiological process with a multifactorial nature. Its diverse causal factors include age, sex, inflammation, oxidative stress, dyslipidaemia, changes in vascular flux, and diabetes, among many others.<sup>1</sup> Despite this knowledge of general factors, one of the major challenges remains the assessment of the risk factors for atherogenesis at a clinical level, besides those validated epidemiologically, such as low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, lack of

healthy exercise, dietary factors, and others.<sup>1,2</sup> Although *in situ* morphological tests, such as imaging of vascular walls at selected locations, have a great potential, they are not easily undertaken in large population studies. Furthermore, most of these measurements detect only established plaques, so their usefulness in preventive approaches is still limited. It is therefore desirable to establish circulating biomarkers for the formation and progression of atheroma at earlier stages. As a local vascular tissue-based event, the markers of its progression from normal vascular cell homeostasis to plaque development and potential disruption need to be distinguished from normal variations of

\*Corresponding author. Facultat de Medicina, NUTREN (TECNIO), IRBLLEIDA-UdL, Edifici Biomedicina I, Av. Alcalde Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, España. Tel: +34 973 702408, Fax: +34 973 702426. E-mail: manuel.portero@mex.udl.cat

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2012. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.