



Factors sèrics en l'Esclerosi Lateral Amiotròfica. Modulació del receptor de glutamat de tipus NMDA GluN1/GluN2A

Laura Texidó Viyuela

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

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

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



**Factors sèrics en l'Esclerosi Lateral
Amiotròfica. Modulació del receptor
de glutamat de tipus NMDA
GluN1/GluN2A**

Laura Texidó Viyuela

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Facultat de Medicina-Campus Bellvitge

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

Barcelona, 2011



Programa de doctorat de Neurociències

Bienni 2002-2004

**Factors sèrics en l'Esclerosi Lateral
Amiotròfica. Modulació del receptor de
glutamat de tipus NMDA GluN1/GluN2A**

Tesi doctoral

Laura Texidó Viyuela

Directors de tesi

Dr. Carles Solsona Sancho Dr. Jordi Marsal Tebé

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental
Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge

*Per als de casa,
Per la meva mare i la meva germana,
I per als que ja no hi són*

AGRAÏMENTS

Després de tots aquests anys, primer amb el màster experimental i, més tard, amb la tesi, m'he adonat que aquesta experiència no hauria estat la mateixa sense vosaltres, totes les persones que heu estat a prop meu, en algun o altre moment, fent-me costat i ajudant-me a tirar endavant. Hi ha molt a agrair, moltes experiències viscudes i bons moments a recordar. Aquest projecte, i tot el què n'he obtingut, tan dins com fora del món de la ciència, ha estat gràcies a vosaltres.

En primer lloc vull donar les gràcies a en Carles Solsona i en Jordi Marsal, directors d'aquesta tesi. A en Carles, per ensenyar-me de primera mà el món de la electrofisiologia, des de el muntatge del set-up fins a la soldadura dels elèctrodes, per passar llargues hores de registre al meu costat en les primeres etapes d'aquest treball, per la teva fe i el teu optimisme, perquè la teva frase "els resultats surten els divendres a última hora de la tarda", que tantes vegades es va acomplir, no la oblidaré mai, moltes gràcies. I a en Jordi, per oferir-me la oportunitat de participar en aquest projecte i iniciar-me en el món de la ciència, per les teves inestimables aportacions en aquesta tesi i per fer-ho tot més fàcil.

A en Joan Blasi, gràcies pels teus consells i la teva ajuda, per donar-me ànims en els nostres moments foscos amb la Semaforina i per les nadales de Frank Sinatra, part d'aquesta tesi ha estat gràcies a tu.

A la Mireia Martin, per tot el que m'has arribat a ensenyar i per la teva santa paciència al fer-ho, pels moments de confidències i pels riures, per la teva confiança i per sempre poder comptar amb tu, moltes gràcies.

A la Inma, la pedra angular del laboratori, per tot el que après de tu, per ensenyar-me com es treballa al laboratori, per donar-me canya quan calia, per la teva alegria, i per amenitzar-nos amb els teus moments musicals.

A tots els meus companys de laboratori, als que encara hi són i als que ja han marxat, amb qui he viscut aquesta experiència inoblidable: Jordi, gràcies per compartir set-up amb mi i guiar-me en els meus inicis en l'electrofisiologia. Piedad, gracias por introducirme en el mundo de los *Xenopus*. Teresa, heredé tu mesa y las fotos de tu niña así que te he tenido presente muchas veces durante esta tesis, gracias por los buenos momentos. Ashraf, el único capaz de enfrentarse a una paella en llamas con una calma envidiable, gracias por tu sentido del humor. Sol, vam compartir poc temps però en tinc un bon record. Neus, tot i que ara estàs lluny, els retrobaments nadalencs amb la gent del laboratori només fan que recordar-me el bon rotllo que sempre hi ha hagut. Alex, gràcies per la teva ajuda, tan amb els experiments com amb la informàtica que tan hem portava de cap al principi, i per les tardes de *worms* amb en Benja. Adriana, ets un sol, sempre disposada a ajudar-me quan ho he necessitat, gràcies per escoltar-me quan m'ha fet falta i pels nostres moments "poli bueno-poli malo" a les vigilàncies. Benja, somric mentre escric això perquè és el que hem provoques, no hem puc recordar de tots els moments però han estat molts i molt bons, gràcies per la teva ajuda amb la real-time i per tots els riures, gràcies per ser com ets. Jonatan, el meu "fill" fictici, encara guardo la carta als reis mags i el bon record dels viatges, gràcies per la teva ajuda amb el westerns però, sobretot, gràcies per la teva alegria. Alba, vas passar poc temps pel laboratori però no en va caldre més, gràcies per la teva amistat, pels pitis psicològics que vam compartir (sinó de fet, de paraula) i pels teus "ajas" que m'encanten i m'arrenquen sempre un somriure. Eli, ets un tros de pa amb un punt de mala llet amagat, gràcies per les hores compartides, tan al laboratori com a fora, guardo bons records dels nostres viatges, que espero no siguin els últims. A la Carme, amb qui he compartit hores de tren i xerrera, gràcies pel teus consells.

A la gent del laboratori de "Genètica": Artur, gràcies pels teus suggeriments i per ajudar-me quan ho he necessitat. Anna i David, el

tàndem de Patch-Clamp, hem compartit congressos, hores a la sala de cultius, alumnes dels cursos d'electrofisiologia i alguna que altre birra, gràcies per tot. I a les noves generacions, l'Helena i en Fran, espero que tot us vagi molt bé.

Finalment, als meus companys Solsonites (els que van donar lloc a aquest nom i ja no hi són, i també les noves incorporacions) amb qui he passat la major part del temps que he dedicat a aquesta tesi i m'han aportat tantes coses: en Marc, la Laia i l'Artur, els que hem van acollir en un primer moment. Marc, vaig haver d'esperar una setmana a que tornessis de Nova York però va valdre la pena. Gràcies per tots els bons moments que hem passat, les discussions, les menjades d'olla, els intents d'abandonament, els balnearis, les birres, els Ikkius, els viatges, els pitis als ascensors (quan encara es podia) i tota la resta, el que més valoro és la teva amistat. Laia, la meva Greca morena preferida, molts dels moments compartits amb en Marc també ho van ser amb tu, hem rigut molt i hem plorat alguna vegada, ets de les persones més transparents que conec, no canviïs mai. Artur, el mestre Yoda del Patch-Clamp, l'home del "m'ànim?" al telèfon i un gran amic, t'haig d'agrair moltes coses i espero que tornis aviat cap a terres catalanes, et trobem a faltar. Xènia, gràcies pels bons moments del principi, les nostres excursions a l'FNAC amb l'Artur i les nostres xocolates al carrer Petritxol. Gemma, la visita que va venir de l'altre banda de la Gran Via per quedar-se i la meva Greca rossa preferida. Molts cops he trobat a faltar al laboratori el teu Triki-triki-tri però tinc la sort de poder-lo sentir en persona sempre que vulgui, un petó Flipy. Saki, ets com un aire fresc de Tramuntana que va anar a parar a un laboratori de bojós, així que fer bones migues amb tu va ser inevitable. Hem passat bons moments i altres de no tan bons, però sempre ho hem intentat superar amb uns riures (i alguna que altra birra/vi/ el què caigui, si vam superar les muletes, podem amb tot). Sempre disposat a donar un cop de mà amb el que faci falta, tens un gran cor, gràcies. Anna, sembla mentida i ja han passat més de dos anys des de que vas

arribar, ets un solete, gràcies per les nostres xerrades a peu de set-up i els moments compartits, sempre tindrem Istanbul. I a la Cris, la nova incorporació del laboratori i el meu relleu en el món de la ELA, hem tingut moments molt surrealistes i els hem disfrutat, sempre guardaré l'ós de perrol (dóna-li les gràcies a la poligonera també).

A les "nenes de l'Isidre", la Rosi, la Marga, la Berta, l'Esther, la Marta, la Beatrice, les Annes i la Sandra. I també als "nens", l'Agustí, en Gabriel, en Gerard, i tota la resta. Els veïns del laboratori 4141, a qui sempre podem acudir en busca de neu carbònica o algun que altre consell.

Als amics de la quarta planta: Gema, esta experiencia no habría sido la misma sin ti, sin duda. Me llevo muy buenos recuerdos de nuestra vida en Bellvitge pero muchos más de nuestros momentos fuera, eres todo corazón, un beso (y para Charlie también). Carmen, con nuestros inicios y mis comentarios sobre el botox quien habría dicho que acabaríamos así. Gracias por todos nuestros buenos momentos en el Drapaire y los que hemos ido acumulando durante todo este tiempo, gracias por tu amistad. Marisol, potser hem vas enganyar al principi però ets un tros de pa, amb tu hem rigut molt i la teva força ens ha donat ànims a totes, no canviïs. Marteta, et vam tenir poc temps per la planta però això no ha evitat que féssim una bona amiatat, els moments en que ens reunim les quatre no els canvio per res.

També als electrofisiòlegs (i amics) de la cinquena planta, amb qui hem compartit més d'una vegada experiments, puller i confidències: Marcel, Mercè i Maria Isabel, hem tingut molts bons moments, gràcies per tot.

A la Mariví, la Mari Carmen i la Toni, gràcies per la vostra eficiència i per ajudar-me i encarregar-vos de tots els tràmits burocràtics.

Al Dr. Celestino Barastegui, qui hem va presentar a en Carles per al màster en Ciències Experimentals Biomèdiques.

A l'Antonio Felipe i la gent del seu grup, les Nuries, la Meritxell, en Ramon, i la resta, amb qui he compartit experiments i reunions al balneari de Caldes de Malavella.

A la gent de la UAB, la Pepi Sabrià i la Noemí, amb qui vaig connectar durant els nostres experiments amb les rates alcoholitzades.

A tota la gent que vam formar el grup de la Marató de TV3: la gent de l'IDIBAPS, en Joan, en Josep, la Carme i l'Aroa. El grup de la Universitat de les Illes Balears, la Jerònia, en Gabriel, en Francesc Xavier, en Victor, la Laia i la Margalida. I la gent de Lleida, en Josep, en Jordi, la Celia, l'Anna, la Dolors, la Olga, la Nuria, en Rafael i per últim, la Sara, la meva companya d'experiments, congressos, penes i alegries. Des de el primer moment vam connectar, potser perquè a totes dues en falta un bull o potser perquè compartim el mateix tipus d'humor i de manera de veure la vida. Sempre he pogut comptar amb tu, tan per la feina com per tota la resta, m'alegro d'haver-te conegut, gràcies per tot.

A la Dra. Mònica Povedano i al Dr. Jordi Montero de l'Hospital de Bellvitge, per la seva ajuda inestimable en aquest projecte i per haver-nos ensenyat tant sobre la ELA. I al Dr. Josep Gámez, de l'Hospital de la Vall d'Hebron, gràcies per la teva col·laboració en aquest treball i pels teus comentaris i suggeriments.

A la Maribel de Miguel, gràcies pel teu suport i per estar pendent d'aquesta tesi.

Al Jose Antonio "el mañico" i la Gema, els meus companys de les reunions del GEN, estamos lejos pero mantenemos el contacto, un beso a los dos.

Agraïments

A les meves amigues de facultat, l'Anna i la Bel, per tots aquells moments que vam passar entre aquelles parets (entre xantofilas y carotenos) i per tot el que hem viscut a fora, pel vostre suport.

A tota la Colla de Sitges, amb qui he compartit totes les estones d'oci i han estat sempre a prop meu, gràcies per preocupar-vos. I no, un biòleg no és un metge, així que no sabem què pot ser això que t'ha sortit al braç, i no, tampoc no coneixem totes les respostes del "quesito" verd del Trivial.

I finalment, als de casa, els que han viscut de primera mà totes les experiències i sentiments que aquesta tesi ha provocat i sempre m'han fet costat i donat ànims. Als meus pares, la meva germana, els meus tiets i els meus avis, gràcies per ser-hi.

ÍNDEX

ÍNDEX

ABREVIATURES	1
RESUM	7
INTRODUCCIÓ	13
1. L'Esclerosi Lateral Amiotròfica	15
1.1 Manifestacions clíniques de la ELA	15
1.2 Malalties de la motoneurona	18
1.3 Degeneració selectiva de les MN en la ELA	20
1.3.1 Factors determinants de la vulnerabilitat de les MN	20
1.3.2 Patrons de mort de les MN en la ELA	22
1.4 Genètica de la ELA	24
1.4.1 Mutacions de la SOD1	24
1.4.2 Mutacions de ALS2	28
1.4.3 Mutacions de la ANG	30
1.4.4 Mutacions de la VAPB	31
1.4.5 Mutacions de TDP-43	32
1.4.6 Mutacions de FUS/TLS	33
1.5 Mecanismes etiopatogènics en el procés degeneratiu de la ELA	35
1.5.1 Excitotoxicitat per glutamat	37
1.5.2 Estrés oxidatiu	45
1.5.3 Alteracions mitocondrials	48
1.5.4 Agregats proteics intracel·lulars	51
1.5.5 Transport axonal alterat	54
1.5.6 Neuroinflamació	55
1.5.7 Autoimmunitat	58
1.6 Diagnòstic de la malaltia	60
1.7 Tractament de la ELA i estratègies terapèutiques	61
2. El receptor de glutamat de tipus NMDA	62

2.1	Receptors ionotròpics de glutamat	63
2.2	Estructura del receptor de NMDA	64
2.3	Activació del receptor de NMDA	66
2.4	Funcions del receptor de NMDA	67
2.4.1	Vies de senyalització de les MAPKs	68
2.4.2	Via de senyalització de l'òxid nítric	69
3.	Les semaforines	71
OBJECTIUS		75
MATERIALS I MÈTODES		79
1.	Obtenció i preparació de les mostres de sèrum	81
1.1	Mostres de sèrum humà control i patològic	81
1.2	Mostres de sèrum del model de rata transgènica mSOD1 G93A	83
1.3	Obtenció de la fracció d'Immunoglobulines G dels sèrums	83
2.	Obtenció i preparació del material d'injecció	84
2.1	Obtenció dels plasmidis	84
2.2	Transformació de bacteris	86
2.3	Purificació del DNA plasmídic recombinant (MiniPREP)	86
2.4	Purificació del DNA plasmídic recombinant (MidiPREP)	87
2.5	Generació dels stocks de glicerol	88
2.6	Producció de cRNA	88
3.	Model experimental d'oòcit de <i>Xenopus laevis</i>	89
3.1	Obtenció i manteniment dels oòcits de <i>Xenopus laevis</i>	89
3.2	Injecció de cRNA en els oòcits de <i>Xenopus laevis</i>	91
3.3	Tractament amb col·lagenasa	92
4.	Registre de la fixació de voltatge amb dos elèctrodes (Two Electrode Voltage Clamp)	92
4.1	Tècnica de la fixació de voltatge amb dos elèctrodes	92

4.2	Components del <i>set-up</i> de <i>Voltatge Clamp</i>	93
4.3	Preparació del material i registre de fixació de voltatge amb dos elèctrodes	95
4.4	Registre de l'activitat generada per sèrums i immunoglobulines G	96
5.	Producció de Semaforina 3A recombinant	97
5.1	Obtenció dels plasmidis	97
5.2	Transformació de bacteris i purificació de DNA plasmídic recombinant (MiniPREP, MidiPREP)	98
5.3	Transfecció de cèl·lules COS-7	98
5.4	Obtenció de la mostra i concentració	99
5.5	Identificació per Western-Blot	101
6.	Assaigs d'ELISA	101
7.	Anticossos i pèptids	103
8.	Composició de les solucions	104
9.	Anàlisi estadística	105
RESULTATS		107

1.	Efecte dels sèrums patològics ELA sobre el receptor de glutamat de tipus NMDA GluN1/GluN2A expressat en oòcits de <i>Xenopus laevis</i>	109
1.1	Obtenció del cRNA de les subunitats GluN1 i GluN2A	111
1.2	Anàlisi del contingut d'aminoàcids dels sèrums humans control i ELA	112
1.3	Efecte dels sèrums humans control i patològics en oòcits de <i>Xenopus</i> injectats amb aigua DEPC	113
1.4	Efecte dels sèrums humans control i patològics en oòcits de <i>Xenopus</i> que expressen el NMDAR	117
1.5	Potenciació dels corrents oscil·latoris de membrana per acció del sèrum ELA en presència del NMDAR	121
1.6	Especificitat del sèrum ELA pel NMDAR	122

1.7	Efecte de les Immunoglobulines G de sèrums humans control i patològics en oòcits de <i>Xenopus</i> que expressen el NMDAR	126
1.8	Efecte del sèrum de rates transgèniques mSOD1 G93A en oòcits de <i>Xenopus</i> que expressen el NMDAR	128
1.9	Facilitació de la resposta glutamatèrgica per acció del sèrum	130
2.	Detecció d'autoanticossos circulants en sèrums patològics ELA	133
2.1	Unió d'anticossos circulants en sèrums patològics a pèptids de Sema3A. Assaigs d'ELISA	137
2.2	Producció de proteïna recombinant Sema3A en cèl·lules COS-7	141
2.3	Unió d'anticossos circulants en sèrums patològics a proteïna Sema3A recombinant. Assaigs d'ELISA	142
2.4	Unió d'anticossos circulants en sèrums patològics a proteïna Sema3A recombinat purificada. Assaigs d'ELISA	145
	DISCUSSIÓ	147
1.	Efecte dels sèrums patològics ELA sobre el receptor de glutamat de tipus NMDA GluN1/GluN2A expressat en oòcits de <i>Xenopus laevis</i>	152
2.	Detecció d'autoanticossos circulants en sèrums patològics ELA	160
3.	Consideracions finals	165
	CONCLUSIONS	167
	BIBLIOGRAFIA	171
	ANNEX	203

ABREVIATURES

ALS	<i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>
ALS-IgG	IgG de pacients amb ALS
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
ANG	<i>Angiogenin</i>
AP	<i>Alkaline phosphatase</i>
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
BaCl₂	Clorur de Bari
BSA	<i>Bovine serum Albumin</i>
Ca²⁺	Calci
CaCl₂	Clorur de calci
CaMKII	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
Ca(NO₃)₂	Nitrat de calci
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari
Cl⁻	Clorur
cRNA	Àcid ribonucleic complementari
Da	Dalton
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietil pirocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DO	Densitat òptica
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
dUTP	<i>deoxyuridine-triphosphate</i>
E	Dia embrionari
EAAT	<i>Excitatory amino acid transporter</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ELA	Esclerosi Lateral Amiotròfica
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FTLD	<i>Frontotemporal Lobar Dementia</i>
FUS/TLS	<i>Fused in sarcoma/Translocated in liposarcoma</i>

GAP	<i>GTPase activating protein</i>
HCl	Àcid clorhídric
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
Hz	Hertz
H₂O₂	Peròxid d'hidrogen
H₂SO₄	Àcid sulfúric
IgG	Immunoglobulina G
Im	Intensitat del corrent de membrana
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfat
KCl	Clorur de potassi
LB	Medi Luria-Bertani
LCR	Líquid cefaloraquidi
LMND	<i>Lower Motoneuron Disease</i>
LPA	Àcid lisofosfatídic
mA	Mili Amper
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MG	Miastènia Gravis
MgSO₄	Sulfat de magnesi
MK-801	<i>(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate</i>
MN	Motoneurona
MND	<i>Motor Neuron Disease</i>
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
mSOD1	SOD1 mutada
mV	Mili Volt
MΩ	Mega Ohm
nA	Nano Amper
NaCl	Clorur sòdic

NaHCO₃	Bicarbonat sòdic
NaH₂PO₄	Dihidrogenfosfat de sodi
Na₂HPO₄	Fosfat disòdic
NF	Neurofilaments
nl	Nano litre
nm	Nanòmetre
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
NMDAR	Receptor de NMDA
NO	<i>Nitric oxide</i>
NR	<i>Normal Ringer</i>
NT	Neurotransmissor
O₂^{•-}	Anió superòxid
OH⁻	Anió hidroxil
ONOO⁻	Peroxinitrit
OPD	<i>O-phenylenediamine dihydrochloride</i>
P	Post natal
pb	Parells de bases
PBP	Paràlisi Bulbar Progressiva
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCD	<i>Programmed cell death</i>
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PIP₂	Fosfoinositol bifosfat
PLC	Fosfolipasa C
PLS	<i>Primary Lateral Sclerosis</i>
PMA	<i>Progressive Muscular Atrophy</i>
RE	Reticle endoplasmàtic
RNA	Àcid ribonucleic
RNAse	<i>Ribonuclease</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
s	Segons
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	Error estàndard de la mitjana

Sema3A	Semaforina 3A
SNC	Sistema nerviós central
SOD1	Cu/Zn superòxid dismutasa-1
TARDBP	<i>Trans active response DNA binding-protein</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TDP-43	<i>TAR DNA binding-protein 43</i>
Tris	<i>trihydroxymethylaminomethane</i>
UNG	<i>Uracil-N-glycosylase</i>
UPR	Unfolded Protein Response/Resposta a estrès del RE
V	Volts
VAPB	<i>Vesicle-associated membrane protein-associated protein B</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial Growth Factor</i>
VGCC	<i>Voltage-gated calcium channel</i>
V_m	Voltatge de membrana
WB	<i>Western-blot</i>
WT	<i>Wild-type</i>
μA	Micro Amper
μC	Micro Coulomb
μl	Micro litre

RESUM

L'Esclerosi Lateral Amiotròfica (ELA o ALS) és una malaltia neuromuscular caracteritzada per la degeneració selectiva de les motoneurons (MN) superiors del còrtex motor i les MN inferiors, del tronc de l'encèfal i la medulla espinal, que es resol en una debilitat, espasticitat i atrofia progressives de la musculatura esquelètica. El curs de la ELA està acompanyat d'alteracions de la parla, la deglució i la respiració, que evolucionen en una fallida respiratòria provocant la mort, normalment cap als 3-5 anys després de l'aparició dels primers símptomes. Menys del 10% dels casos corresponen a la forma familiar de la malaltia, i un 20% d'aquests estan relacionats amb mutacions en el gen de l'enzim superòxid dismutasa 1 (mSOD1). La resta de casos, més del 90%, corresponen a la forma esporàdica. Fins avui, no existeix, però, cap tractament que aconseguixi una millora significativa de la progressió de la malaltia i les causes implicades en la degeneració selectiva de les MN en la ELA són encara desconegudes.

En els últims anys, la patogènesi de la ELA s'ha atribuït a diversos mecanismes cel·lulars i moleculars entre els quals destacarien l'estrès oxidatiu, l'agregació proteica anormal, la disfunció mitocondrial, el transport axonal aberrant, la neuroinflamació, l'autoimmunitat o l'excitotoxicitat per glutamat.

En el present estudi hem treballat amb dues d'aquestes hipòtesis en avaluar l'efecte dels sèrums de pacients amb ELA i altres malalties de la MN sobre l'activitat del receptor ionotròpic de glutamat de tipus N-metil-D-Aspartat (NMDAR), expressat en el model d'oòcit de *Xenopus laevis*. Alhora, mitjançant assaigs de ELISA, hem analitzat la presència d'autoanticossos associats a ELA en el sèrum de pacients.

L'acció dels sèrums control i patològics en els oòcits de *Xenopus* produïa la generació de corrents oscil·latoris de clorur (Cl⁻). Aquests corrents havien estat prèviament descrits en aquestes cèl·lules i són deguts a l'activació dels canals de Cl⁻ dependents de calci (Ca²⁺), endògens en els oòcits de *Xenopus*, a causa de la mobilització de

Ca^{2+} intracel·lular. L'alliberació de Ca^{2+} dels compartiments intracel·lulars es activada per l'acció d'un factor sèric, anomenat àcid lisofosfatídic o lisofosfatidat (LPA), sobre el seu receptor, present en la membrana dels oòcits, i a través d'una via de senyalització de segons missatgers. Així doncs, en aquest model, la generació de corrents oscil·latoris de Cl^- és una mesura indirecta de la mobilització intracel·lular de Ca^{2+} . Vàrem observar que, en presència del NMDAR, les respostes generades pel sèrum ELA eren significativament superiors a les activades pel sèrum d'individus sans i d'altres malalties de la MN. Vam descartar que aquest efecte es degués a l'activació directa del NMDAR ja que les mostres de sèrum havien estat tractades per tal d'eliminar el seu contingut en aminoàcids excitatòris. La resposta generada pel sèrum ELA presentava una dependència respecte de la presència de les dues subunitats del NMDAR i era sensible al bloqueig del receptor amb MK-801, un antagonista no competitiu.

Per tal de trobar similituds entre les formes esporàdiques i familiars de la malaltia, vàrem reproduir els experiments amb sèrums del model de rata transgènica mSOD1 G93A. Aquests animals sobreexpressen formes mutades de SOD1 i desenvolupen una degeneració similar a la observada en la ELA humana, tot i això, es consideren un model de la forma familiar de la malaltia. Vàrem observar, que tal com en el cas dels sèrums humans de ELA, les mostres de sèrum mSOD1 G93A generaven, en presència del NMDAR, respostes significativament superiors a les activades pel sèrum de rata WT. Aquest efecte, però, tan sols era observable en estadis inicials de la malaltia, a P30.

Diversos estudis han aportat dades que recolzen la citotoxicitat de les immunoglobulines G (IgG) de pacients amb ELA sobre les MN. A l'analitzar l'acció de la fracció de IgG purificada dels sèrums control i patològics en el model d'oòcit de *Xenopus*, vàrem observar que es generaven corrents transitoris d'entrada de tipus no oscil·latori, els quals diferien dels generats en el cas del sèrum complet. La resposta

activada per IgG de pacients amb ELA en presència del NMDAR era també significativament superior a la generada per les IgG d'individus sans.

En aquest treball, hem proposat que, l'increment en la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular observada com a resposta a l'acció dels sèrums ELA, en els oòcits de *Xenopus* que expressen el NMDAR, es deguda a la presència de factors sèrics associats a la malaltia, els quals actuarien a través de vies de senyalització no canòniques del receptor.

En la segona part d'aquest estudi s'ha comprovat la presència d'anticossos contra la proteïna Semaforina 3A (Sema3A) en alguns sèrums de ELA i Lower Motor Neuron Disease (LMND), una altra forma comuna de malaltia de la MN. La Sema3A és una molècula quimiotàctica de guia axonal que forma part de la classe 3 de la família de les Semaforines. Ha estat associada a l'emissió de senyals quimiorepel·lents i al col·lapse del conus de creixement de l'axó. En un treball recent, s'ha relacionat la Sema3A amb la patologia de la ELA en detectar-se una sobreexpressió d'aquesta proteïna en cèl·lules de Schwann terminals del model de ratolí mSOD1 G93A. En aquests animals, l'expressió de Sema3A no només inhibeix la plasticitat a nivell del terminal nerviós d'aquestes sinapsis sinó que afavoreix la denervació axonal i la degeneració de les MN en estadis primerencs de la malaltia.

Tot i descartar-se que els anticossos contra Sema3A siguin un marcador específic de la ELA, al no detectar-se en tots el sèrums de pacients, i alhora, al estar presents també en algunes mostres LMND, aquests autoanticossos podrien tenir un efecte defensiu contra els senyals nocius exercits per Sema3A sobre els axons de les MN.

INTRODUCCIÓ

1. L'Esclerosi Lateral Amiotròfica

L'Esclerosi Lateral Amiotròfica (ELA o ALS, *Amyotrophic Lateral Sclerosis*) és una malaltia degenerativa que afecta selectivament les motoneurons (MN) superiors del còrtex motor i les MN inferiors del tronc de l'encèfal i la medul·la espinal. La disminució continua del nombre de MN provoca una atrofia i debilitat progressiva dels músculs esquelètics, espinals i bulbars, instaurant una paràlisi cada cop més extensa, de pronòstic letal. S'acompanya d'alteracions de la parla, dificultats per a la deglució i una exaltació dels reflexes tendinosos, tot i que es mantenen inalterades les funcions cerebrals no vinculades a l'activitat motora. En les etapes finals de la malaltia, apareix la incapacitat de respirar per un mateix i la mort es produeix, generalment, per una fallada respiratòria.

1.1 Manifestacions clíniques de la ELA

L'ELA va ser descrita l'any 1869 pel neuròleg francès Jean-Martin Charcot (Charcot i Joffroy, 1869) i, per això, anomenada inicialment Esclerosi de Charcot. El nom complet de la malaltia fa referència a dos aspectes clínico-patològics característics. Per una banda, "esclerosi lateral", indica la pèrdua de fibres nervioses, acompanyada d'una esclerosi o cicatrització glial, a la zona lateral de la medul·la espinal. Aquesta regió està ocupada per fibres o axons motors que connecten amb les MN del corn anterior de la medul·la, les quals envien els seus axons als músculs. Els axons del cordó lateral formen part de la denominada via corticoespinal o piramidal, que controla els moviments voluntaris. Per altra banda, el terme "amiotròfica" fa referència a l'atrofia muscular que es produeix a causa de la inactivitat crònica dels músculs al deixar de rebre senyals nervioses. La degeneració de la via piramidal interromp les connexions entre la primera MN del còrtex cerebral i la segona MN situada al corn anterior

de la medulla espinal (Figura I-1). Aquest fet condueix a una pèrdua dels controls inhibitoris de la primera neurona sobre la segona i es tradueix en l'espasticitat (contracció permanent de la musculatura) i la hiperreflèxia (excés de reflexes tendinosos) pròpies de la ELA.

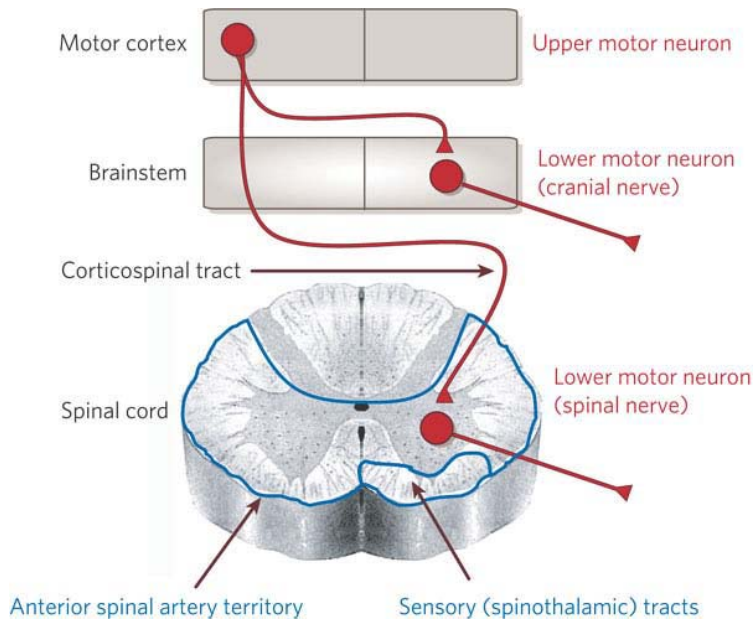


Figura I-1. Àrees del sistema motor humà afectades selectivament en el procés neurodegeneratiu de la ELA. Les MN superiors de l'escorça motora emeten els seus axons cap a la medulla constituint el tracte corticoespinal, i acaben establint sinapsis amb les MN inferiors del corn anterior, les quals, a través dels nervis perifèrics, s'encarreguen d'innervar la musculatura. Les MN bulbars (cranials), que controlen la parla i la deglució, i les MN espinals, que controlen les extremitats i la musculatura respiratòria, es veuen afectades en la ELA, així com les MN superiors de l'escorça motora (Greenberg i Jin, 2005).

En referència a aquests canvis patològics, Charcot va reanomenar la malaltia com Esclerosi Lateral Amiotròfica, tot i que 20 anys abans, un altre neuròleg francès, François A. Aran, ja havia atribuït 11 casos de ELA a una Atròfia Muscular Progressiva (Aran, 1850).

Amb una supervivència d'entre 1 i 5 anys després del diagnòstic, la ELA té una incidència de 2-3 casos per cada 100,000 habitants/any, augmentant fins a 15 casos/100,000 passat el rang d'edat en el que se sol presentar, entre els 50 i els 60 anys (Yoshida et al., 1986). La ELA es pot subdividir en formes d'inici bulbar o d'inici espinal, segons el lloc d'afectació dels primers símptomes, sent les formes d'inici bulbar un 25% dels casos totals. Tot i que no existeix cap component de tipus genètic en el 90-95% dels casos de ELA, coneguts com ELA de tipus esporàdica, el 5-10% restant dels pacients hereten la malaltia (ELA de tipus familiar) habitualment de forma autosòmica dominant. S'han descrit, però, alguns casos de ELA d'inici infantil o juvenil amb herència autosòmica recessiva (Hadano et al., 2001). El 20% dels casos de ELA familiar son provocats per mutacions en el gen que codifica l'enzim Cu/Zn superòxid dismutasa-1 (SOD1) (Rosen et al., 1993).

Als Estats Units d'Amèrica la ELA s'anomena sovint malaltia de Lou Gehrig, en honor al famós jugador de beisbol que va morir de ELA l'any 1939. Altres víctimes conegudes de la malaltia van ser l'actor David Niven, el compositor Dimitri Shostakovich o el dirigent polític xinès Mao Tsetung. El famós astrofísic, guanyador del premi Nobel, Stephen Hawking, pateix encara avui dia una forma insòlitàment llarga de la malaltia.

Actualment, cada cop més autors consideren que la ELA forma part d'un grup heterogeni d'alteracions anomenades Malalties de la Motoneurona, on s'inclourien altres afectacions de les neurones motores.

Tot i ser descrita fa més de 135 anys, segueixen sense identificar-se els mecanismes patològics que provoquen la degeneració selectiva de les MN en la ELA, i el que és encara més greu, avui en dia encara no es disposa de cap tractament per aturar el seu curs.

1.2 Malalties de la Motoneurona

Les Malalties de la Motoneurona (MND, *Motor Neuron Disease*) són un grup heterogeni de malalties, algunes d'elles amb caràcter hereditari, que presenten una afectació exclusiva o predominant de les neurones motores de l'escorça cerebral, i/o dels nuclis motors del tronc de l'encèfal (preservant-ne normalment els nuclis oculomotors) i/o del corn anterior de la medulla espinal.

El gran espectre de malalties motores que existeixen avui dia i els problemes de diagnòstic que sorgeixen degut a la similitud de símptomes entre elles fan que la classificació de les MND no estigui clarament establerta. La Taula I-1 mostra la última classificació de MND que s'ha dut a terme al Regne Unit i el conjunt de síndromes motores amb les quals es poden confondre. En alguns països, algunes d'aquestes síndromes també son classificades com MND.

Taula I-1 Classificació de les Malalties de la Motoneurona (MND).

Form of MND	Mimic syndromes
Progressive muscular atrophy	Multifocal motor neuropathy*
	Kennedy's disease
	Spinal muscular atrophy (SMA)
	Chronic idiopathic demyelinating polyneuropathy*
	Benign cramp fasciculation syndrome
	Post-polio syndrome
	Lead poisoning*
	Acute motor axonal neuropathy* (AMAN – a Guillain Barre variant)
	Hereditary motor neuropathies
	Porphyria*
Amyotrophic lateral sclerosis	Compressive focal neuropathies especially pure motor*
	Multi-level spinal cord and root compression by discs, osteophytes or tumour*
	Thyrotoxicosis*
	Combined peripheral neuropathy and cervical myelopathy
	Inclusion body myositis
	Paraneoplastic syndromes especially lymphoma
	Sjogren's syndrome
	Radiation myelopathy
	Structural lesions of the bulbar region
	Primary lateral sclerosis
Multiple sclerosis*	
Spinal cord compression by disc or tumour*	

* = potencialment tractable (Wood-Allum i Shaw, 2010)

Les MND es classifiquen en tres grans grups principals, depenent del patró d'afectació de les MN i de la part del cos on s'inicien els primers símptomes (Wood-Allum i Shaw, 2010). La **ELA** és la forma de MND més comuna entre la població adulta i afecta les MN superiors i inferiors de l'escorça cerebral, el tronc de l'encèfal i la medul·la espinal. **L'Atròfia Muscular Progressiva** (o *Progressive Muscular Atrophy, PMA*), afecta principalment les MN inferiors i es caracteritza per una debilitat i pèrdua progressiva de la massa muscular, acompanyada d'espasmes i pèrdua de pes. La tercera forma de MND, **l'Esclerosi Lateral Primària** (o *Primary Lateral Sclerosis, PLS*) afecta les MN superiors i produeix rigidesa i paràlisi de les extremitats, però té un pronòstic més benigne que la resta. Poc freqüentment les MND també poden associar-se a alteracions extra-motors. S'ha descrit que el 10% dels casos de ELA clàssica es troben associats a una demència frontotemporal (Murakami i Yoshida, 1995).

La **Paràlisi Bulbar Progressiva** (o *Progressive Bulbar Palsy, PBP*) es considera una forma primerenca de ELA que afecta predominantment les MN dels nuclis bulbars, mentre que la **Lower Motoneuron Disease** (LMND), que afecta els músculs d'extremitats superiors i inferiors també seria reconeguda com una variant de la ELA que podria desembocar en la forma completa de la malaltia .

1.3 Degeneració selectiva de les MN en la ELA

1.3.1 Factors determinants de la vulnerabilitat de les MN

Un dels trets més significatius en la patogènia de la ELA que encara no té una explicació clara és la vulnerabilitat selectiva que pateixen les MN, a nivell del cervell i del corn anterior de la medul·la espinal. Aquest fet podria estar relacionat amb les característiques específiques d'aquest subtipus cel·lular: gran activitat metabòlica,

contingut de receptors, gran volum del soma i longitud extrema de l'axó, particular organització del citoesquelet, sensibilitat elevada al dany mitocondrial o escassa capacitat per suportar alteracions en la concentració de calci intracel·lular.

Les MN són riques en receptors de glutamat, en particular, en una forma del subtipus AMPA que no conté la subunitat GluR2, fet que els confereix una major permeabilitat al calci i, per tant, una major vulnerabilitat als estímuls excitotòxics (Calderó et al., 1997; Vandenberghe et al. 2000). Per altra banda, el fet més distintiu que diferencia les MN dels altres tipus cel·lulars és la seva gran mida. El soma cel·lular és l'encarregat de sintetitzar una gran quantitat de molècules, entre elles els factors neurotròfics, que han de ser transportades per tota la longitud de l'axó. S'ha observat que la disrupció del complex dineïna-dinactina, encarregat del transport axonal retrògrad, en ratolins transgènics que sobre-expressen dinamitina (p50), molècula amb capacitat per desacoblar el complex, produeix una degeneració lenta de les MN i la denervació de la musculatura (LaMonte et al., 2002). Una altra característica que fa més sensibles les MN a patir neurodegeneració respecte d'altres tipus cel·lulars és el seu gran contingut en neurofilaments (NF). Els NF són el component majoritari del citoesquelet neuronal i juguen un paper important, tan en l'estructura i diferenciació de la cèl·lula, com en la formació i manteniment de la mida de l'axó. Diferents treballs han detectat la presència de dipòsits de NF en MN en degeneració en varies malalties de tipus neurodegeneratiu, incloent-hi la ELA (Lee i Cleveland, 1996; Tsang et al., 2000). Aquesta acumulació de NF, apareixeria en les primeres etapes de la malaltia, específicament en el soma i axó de les MN del corn anterior de la medul·la espinal (Carpenter, 1968). Finalment, també s'ha observat que les MN són més vulnerables a les sobrecàrregues de calci intracel·lular que altres tipus neuronals. Això es degut a les baixes concentracions de proteïnes

fixadores de calci, com són la parvalbúmina o la calbindina, que trobem en la població motoneuronal (Alexianu et al., 1994; Krieger et al., 1996).

Cal esmentar que determinades poblacions de MN presenten major resistència al procés degeneratiu de la ELA. Les MN que controlen els moviments extrínsecs de l'ull quasi no estan afectades. Aquest subtipus de MN es diferencien de les MN espinals per uns nivells d'expressió de calbindina D28K i parvalbúmina més elevats (Ince et al., 1993). Alhora, el subtipus de MN que constitueix el nucli de Onuf, situat a la regió més caudal de la medulla espinal, tampoc es troba afectat per la malaltia (Carvalho et al., 1995). Aquest nucli està constituït per un petit grup de MN que innerven els músculs dels esfínters que controlen la micció i defecació. Aquesta és la raó per la qual la incontinència no és un trastorn propi de la ELA.

1.3.2 Patrons de mort de les MN en la ELA

La ELA es caracteritza perquè les MN en degeneració presenten un grau d'atròfia molt evident. En estadis terminals de la malaltia, les cèl·lules presenten el citoplasma ple de vacúols procedents de la dilatació del reticle endoplasmàtic, l'aparell de Golgi i els mitocondris (Dal Canto i Gurney, 1995). També apareixen inflamats els axons proximals i els somes de les MN, presentant-se dipòsits de NF fosforilats, cossos de Bunina (inclusions citoplasmàtiques eosinòfiles constituïdes per material amorf electrodens, amb immunoreactivitat per Cistatina-C, i considerades específiques de la neurodegeneració associada a la ELA) i inclusions esferoïdals plenes de material ubiqüitinitzat a nivell dels axons (Wood et al., 2003). A més, la pèrdua de MN cursa amb l'aparició d'una gliosi reactiva (tan d'astroglia com de microglia), i, en estadis finals de la malaltia, amb una disminució aguda de les fibres mielinitzades del tracte corticoespinal i de les arrels ventrals del corn

anterior de la medulla espinal (Bruijn et al., 2004; Pasinelli i Brown, 2006).

Els estudis de MN en mostres *post mortem* de pacients amb ELA, han proposat tres estadis diferenciats en el procés de degeneració, en base a criteris morfològics com són la mida, la forma i la presència d'agregats de Nissl positius (Figura I-2): *estadi cromatolític*, on les MN tenen una aparença sana però es troben lleugerament inflades i arrodonides, amb el marcatge de Nissl dispers i el nucli en posició excèntrica; *estadi de desgast involutiu*, on les MN presenten una incipient condensació citoplasmàtica i nuclear i, per últim, *estadi apoptòtic*, caracteritzat per la reducció de la mida de les MN fins a 1/5 part de la mida original i presentant una aparença fusiforme o arrodonida, amb el citoplasma i el nucli prominentment condensats i amb la regressió, quasi bé total, de les projeccions neurítiques. En aquest últim estadi es detecta l'activació de la caspasa-3 i la fragmentació del DNA (Martin, 1999).

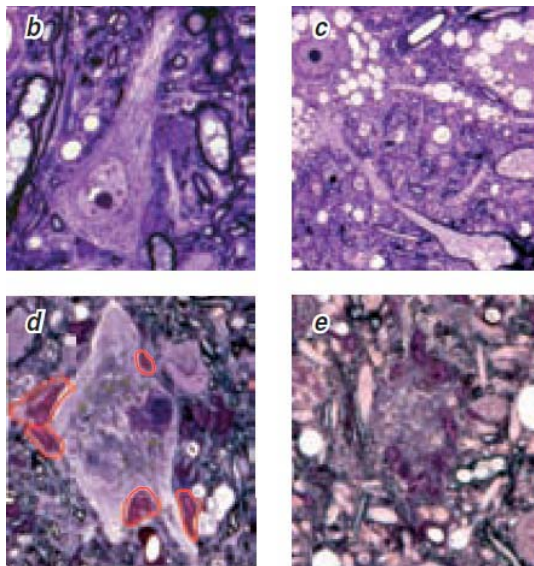


Figura I-2. Evolució del procés neurodegeneratiu de MN de la banya anterior de la medulla espinal de ratolins SOD1^{G93A}. (b) MN en estadis inicials de la malaltia, on no apareixen lesions visibles en el soma. (c) Vacuolització massiva en el citoplasma de la MN. (d) Involució nucli-citoplasma, acompanyada d'interacció amb cèl·lules microgials (delimitades per franges vermelles). (e) Desintegració cel·lular de la MN amb infiltració microglial (Esquerda, 2006).

1.4 Genètica de la ELA

1.4.1 Mutacions de la SOD1

L'any 1993, Rosen i col·laboradors van demostrar que un 20% dels casos de ELA familiar eren deguts a mutacions presents en el gen que codifica per la SOD1. La SOD1 és una proteïna homodimèrica de 32 KDa amb funció antioxidant. Cadascuna de les seves subunitats consta d'un àtom de coure i un altre de zinc. Actualment, més de 120 mutacions *missense* (de sentit erroni) diferents, distribuïdes per la seqüència de 153 aminoàcids del polipèptid de SOD1, han estat associades a la ELA (Boillee et al., 2006a; Pasinelli i Brown, 2006) (Figura I-3). La llista de mutacions s'actualitza contínuament en una base de dades *online* (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>).

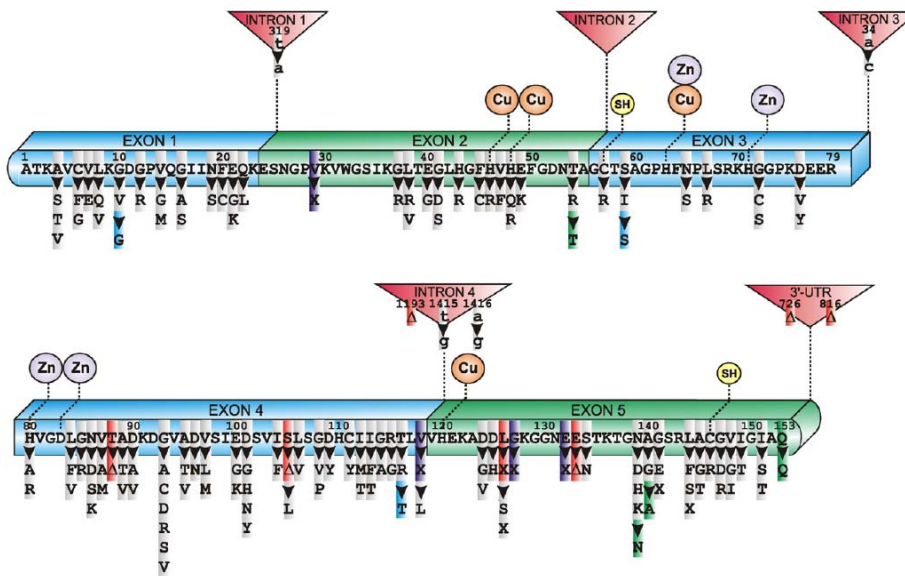


Figura I-3. Esquema de la seqüència primària de la SOD1 humana on s'indica la posició dels introns, exons, llocs d'unió a metalls (Cu,Zn), ponts disulfur (SH) i mutacions lligades a la ELA. Les mutacions es troben distribuïdes per tota la seqüència amb una prevalença superior en els exons 4 i 5. Llegenda de les mutacions: gris, *missense*; morat, inserció; vermell, deleció; blau/verd, silenciosa (Turner i Talbot, 2008).

Una de les conseqüències d'aquests descobriments va ser el poder disposar d'animals modificats genèticament, en els quals es va introduir el gen humà SOD1 mutat (mSOD1) (Gurney, 1997). Els models transgènics s'han convertit en una de les eines més importants en la investigació de la ELA ja que permeten assajar *in vivo* i *in vitro* diversos agents potencialment terapèutics (Turner i Talbot, 2008). Les mutacions més utilitzades són la SOD1^{G93A}, SOD1^{G85R}, SOD1^{G37R} i SOD1^{A4V} (Bruijn i Cleveland, 1996). Aquest animals pateixen una malaltia neuromuscular totalment comparable a la ELA humana. S'ha de tenir en compte, però, que els animals transgènics són models d'una forma particular de ELA, la familiar, que constitueix una minoria dels casos totals. No obstant, és probable que les formes esporàdiques i familiars comparteixin mecanismes patogènics comuns.

El fet que SOD1 sigui un enzim citoplasmàtic ubiqüitinitzat encarregat de transformar els anions superòxid en peròxid d'hidrogen i oxigen no duia a pensar que pogués tractar-se d'un mitjancer de la degeneració de les MN. Una de les hipòtesis inicials suggeria que les mutacions disminuïen l'activitat enzimàtica de SOD1, promovent l'acumulació de radicals superòxid tòxics en les cèl·lules. Això va ser descartat amb els estudis amb ratolins transgènics SOD1^{G93A} (on la glicina es substituïda per una alanina en la posició 93), SOD1^{G37R} i SOD1^{G85R}, els quals mostraven una pèrdua progressiva de les MN tot i no presentar modificacions en l'activitat enzimàtica de SOD1 o inclús, incrementant-la (Bruijn et al., 1997a; Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995). Tanmateix, l'eliminació o sobreexpressió de SOD1 WT en els ratolins transgènics no afectava a la progressió de la malaltia (Bruijn et al., 1998). Aquestes i altres observacions indiquen que probablement l'efecte nociu de mSOD1 radiqui en l'adquisició d'una propietat tòxica, i no en l'alteració de l'activitat enzimàtica de la molècula.

Tan en la ELA familiar com en els models de ratolins transgènics, mSOD1 s'expressa en totes les cèl·lules de l'organisme encara que

només estarien afectades les MN. L'expressió selectiva i exclusiva de mSOD1 en astròcits (Gong et al., 2002) o en MN (Pramatarova et al., 2001) no provoca la malaltia. Els estudis *in vitro* realitzats amb cultius mixtes de cèl·lules provinents de ratolins quimèrics que presentaven, alhora, cèl·lules WT i mSOD1, mostraven alteracions morfològiques i neurodegeneració en MN WT adjacents a cèl·lules no neuronals expressores de mSOD1 (Julien, 2007; Clement et al., 2003). A més, mSOD1 pot ser secretada extracel·lularment per acció de les cromogranines (Urushitani et al., 2006). Les cromogranines (Cg A i B) són glicofosfoproteïnes solubles acídiques, components majoritaris de les vesícules de nucli dens, que s'ha vist que interactuen amb mSOD1 però no amb SOD1 WT. Aquests resultats suggerien que mSOD1 extracel·lular podia produir microgliosi i mort de MN, transferint toxicitat d'una cèl·lula a una altra. Per tant, la vulnerabilitat de les MN a la toxicitat mitjançada per SOD1 sembla estar influenciada per l'entorn cel·lular en general, i per l'acció astrocitària en particular, indicant que la malaltia no és un problema estrictament motoneuronal.

Una de les característiques més importants de mSOD1 és la tendència a l'agregació de la proteïna en el citoplasma, la qual provoca toxicitat en les cèl·lules (Durham et al., 1997; Johnston et al., 2000). Els agregats de mSOD1 es formen també a l'interior dels mitocondris (Vande Velde et al., 2008) i a l'aparell de Golgi (Fujita et al., 2005) on provoquen la disfunció de l'òrganul i unes alteracions morfològiques que son observables en els models animals mSOD1 en estadis inicials, i presimptomàtics, de la malaltia. Apareixen tan en neurones com en astròcits i poden estar associats a altres components, com xaperones o ubiquitina (Figura I-4).

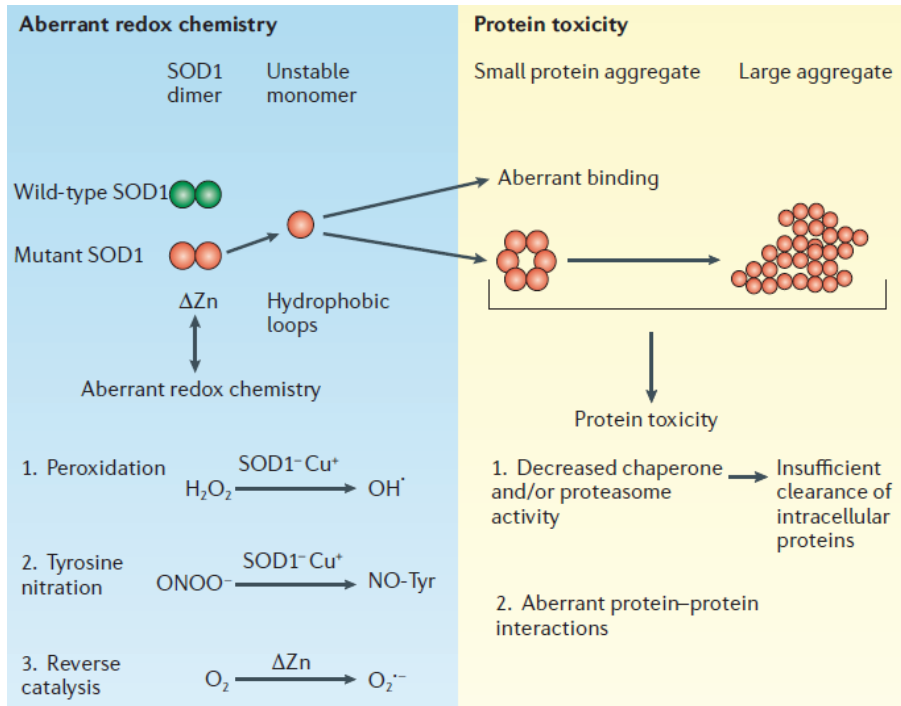


Figura I-4. Models de toxicitat de mSOD1. En el model d'activitat redox aberrant, la inestabilitat de mSOD1 permet que aquesta interacció amb substrats no convencionals, com l' H_2O_2 o l' $ONOO^-$, produint espècies reactives de l'oxigen. L'oxigen molecular pot interaccionar de forma inusual amb formes de SOD1 deficientes en zinc formant $O_2^{\cdot-}$. En el model de toxicitat proteica, mSOD1, conformacionalment alterada i inestable, pot formar depòsits proteics tòxics. Els agregats tenen la capacitat d'inhibir l'activitat xaperona i/o proteasoma, amb el conseqüent plegament incorrecte i dèficit en l'eliminació d'un gran nombre de proteïnes. A més, aquests agregats poden segrestar, inactivar o afavorir la toxicitat d'altres proteïnes crucials en els processos cel·lulars (Pasinelli i Brown, 2006).

En cultius primaris de MN que expressen mSOD1, la sobreexpressió de xaperones (Hsp40, Hsp70 i Hsp105) induïx la neuroprotecció de les cèl·lules, afavoreix el creixement neurític i disminueix els agregats proteics (Batulan et al., 2006; Takeuchi et al., 2002; Yamashita et al., 2007). La injecció de la xaperona Hsp70 en ratolins transgènics mSOD1 provoca un augment de la seva esperança de vida (Gifondorwa et al., 2007). Sembla ser que la formació d'agregats proteics en el

citoplasma despertaria processos en la cèl·lula destinats a la seva dissolució, com l'activació del sistema proteasoma-ubiquítina i la mobilització de proteïnes amb activitat restauradora de la estructura proteica com són les xaperones (Houenou et al., 1996; Fujihara i Nadler, 1999; Tidwell et al., 2004). El fet que les MN no tinguin una gran capacitat per mobilitzar xaperones (Robinson et al., 2005), i donada la tendència a la formació d'agregats de mSOD1, provocaria que els sistemes de dissolució quedessin saturats. Els agregats actuarien com una trampa en la que les proteïnes reparadores quedarien segrestades i, per tant, desviades de la seva funció normal, generant estrés i toxicitat a la cèl·lula. Això es donaria tan en neurones com en astròcits. Cal esmentar que els agregats de mSOD1 tan sols es troben en els teixits afectats per la ELA i en els casos de ELA familiar (Liu et al., 2004). Enguany, però, s'han detectat formes malplegades de SOD1 WT, en un subgrup de pacients amb ELA esporàdica, que provoquen alteracions en el transport axonal similars a les detectades en els casos de ELA familiar associats a mSOD1 (Bosco et al., 2010), el que suggeriria un mecanisme patogènic associat a SOD1 comú entre les formes esporàdiques i les familiars.

1.4.2 Mutacions de ALS2

Tot i que les mutacions de la SOD1 han estat les més estudiades i utilitzades en els models animals de ELA, des de la seva identificació, s'han detectat mutacions en altres gens que també predisposen a patir la malaltia. Les mutacions trobades en el gen ALS2, que codifica per la proteïna alsina, són responsables d'una forma juvenil de ELA amb herència autosòmica recessiva (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001). La malaltia, anomenada subtipus genètic 2 de ELA o ELA2, es manifesta al voltant del 12 anys i té una progressió lenta. Fins avui s'han detectat almenys 12 mutacions diferents en el gen ALS2 (Figura I-5).

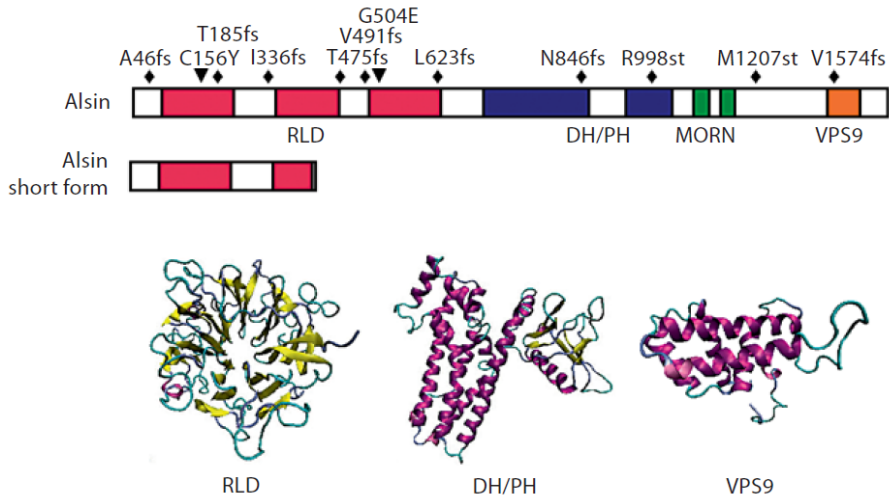


Figura I-5. Estructura dels dominis i mutacions lligades a malaltia en el gen de l'alsina. Representació esquemàtica de la seqüència de l'alsina, on s'indiquen les diferents mutacions lligades a ELA, i estructures 3D dels seus dominis funcionals. Llegenda de les mutacions: fs, mutacions *frame-shift* (canvi de pauta de lectura) i st, mutacions *non sense* (sense sentit), que provoquen la creació d'un codó stop. Llegenda dels dominis funcionals: RLD, *RCC1-like domain*; DH/PH, *Diffuse B-cell lymphoma (Dbl) homology/Plekstrin homology domain*; VPS9, *Vacuolar protein sorting 9 domain* (Cai et al., 2008).

Amb l'excepció de dues mutacions *missense* detectades recentment a l'extrem N-terminal de la seqüència del gen (Panzeri et al., 2006; Eymard-Pierre et al., 2006), la resta de mutacions provoquen la creació d'un codó stop prematur, que duu a la inestabilitat de la proteïna i a la pèrdua de funció de l'alsina.

L'alsina és una proteïna de 184 kDa que actua com a factor intercanviador de nucleòtids de guanina i que està implicada en el manteniment i el recanvi dels elements que conformen el citoesquelet (Pasinelli i Brown, 2006; Hadano et al., 2007). El gen ALS2 consta de 3 dominis homòlegs GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*), que activen una guanosina trifosfatasa (GTPasa) pertanyent a la família Ras.

La forma llarga de l'alsina WT es capaç d'unir-se a la proteïna mSOD1, però no a la forma WT d'aquesta, via domini RhoGEF, i produir neuroprotecció en cultius de MN davant la neurotoxicitat induïda per mSOD1 (Kanekura et al., 2004). Recentment, s'ha descrit que l'alsina està involucrada en un mecanisme endocític anomenat macropinocitosi (mecanisme d'endocitosi que involucra la formació de projeccions membranoses o lamelipodis, sostingudes per una xarxa de filaments d'actina) via Rac1. La pèrdua de funció de la proteïna, a causa de les diferents mutacions trobades, ocasionaria una pertorbació en els mecanismes cel·lulars i moleculars, com el tràfic vesicular, donant lloc a una disfunció generalitzada i la mort de la cèl·lula (Kunita et al., 2004). Els ratolins transgènics deficientes en alsina presenten pèrdua progressiva de cèl·lules de Purkinje, alteracions en les MN espinals associades a astrocitosi, activació microglial i tràfic endosomal alterat (Hadano et al., 2006). A més a més, la pèrdua de funció de l'alsina no afecta la progressió de la malaltia en ratolins SOD1^{G93A}, però predisposa les MN a patir estrès oxidatiu i excitotoxicitat (Cai et al., 2005; Cai et al., 2008; Lai et al., 2006).

1.4.3 Mutacions de la ANG

L'Angiogenina (ANG) és una ribonucleasa angiogènica de 14 KDa que es va considerar un possible candidat en l'estudi de la genètica de la ELA al tenir similituds funcionals amb VEGF (*Vascular endothelial Growth Factor*), inicialment relacionat amb la malaltia. S'han trobat 7 mutacions sense sentit en 15 pacients de ELA familiar i en 11 pacients de ELA esporàdica (Greenway et al., 2006.), restringides a les poblacions d'Irlanda, Itàlia i Escòcia, suggerint que aquestes mutacions lligades a la malaltia serien poc comunes.

La ANG s'expressa en tot el SNC i té activitat RNAsa intranuclear, regulant la transcripció del RNA ribosomal. La majoria de les mutacions han estat trobades en el seu nucli catalític, portant a deficiències en la

seva funció ribonucleolítica i en la seva capacitat de translocació a nucli (Wu et al., 2007; Crabtree et al., 2007). Aquestes alteracions comportarien també la pèrdua funcional de l'activitat angiogènica (generació de nous vasos sanguinis) de la proteïna. La sobreexpressió de ANG en ratolins SOD1^{G93A} promou la supervivència de MN, alhora que l'adició exògena de la proteïna en cultius de MN espinals, protegeix les cèl·lules de la mort per apoptosi induïda per dèficit de factors tròfics (deprivació de sèrum), de l'excitotoxicitat (tractament amb AMPA) i de l'estrès de reticle endoplasmàtic (tractament amb tunicamicina) (Kieran et al., 2008). Aquesta acció protectora de ANG es veuria afectada en el cas dels pacients que presenten mutacions en el gen que codifica per la proteïna.

1.4.4 Mutacions de la VAPB

L'any 2004 es va descriure una mutació sense sentit en el gen de la *vesicle-associated membrane protein-associated protein B* (VAMP-associated protein B o VAPB), també anomenada sinaptobrevina associada a proteïna B, situada en el cromosoma 20, la qual estava lligada a formes atípiques de ELA (Nishimura et al., 2004). Aquesta proteïna està implicada en el transport de vesícules del reticle endoplasmàtic al complex de Golgi, incloent el transport axonal de components de la membrana. La mutació produeix el canvi d'una prolina per una serina en la posició 56, però es desconeix actualment com afecta aquesta mutació a les propietats funcionals de la proteïna. Enguany, en un estudi fet a la població de França, s'ha descrit un altre cas de la mateixa mutació en una família on 3 dels seus membres presenten ELA amb una herència autosòmica dominant (Millecamps et al., 2010).

1.4.5 Mutacions de TDP-43

L'any 2006 es va descriure per primer cop la formació d'agregats proteics ubiquïtinitzats formats per TDP-43 en el citoplasma de MN de pacients amb ELA esporàdica (Neumann et al., 2006) i en pacients amb FTLD (*Frontotemporal Lobar Dementia*), una malaltia neurodegenerativa caracteritzada per alteracions del comportament i el llenguatge (Arai et al., 2006). La TDP-43 (*TAR DNA binding-protein*) és una proteïna nuclear de 43 KDa, de la família de les proteïnes TARDBP (*Trans active response DNA binding-protein*), repressora de la transcripció i reguladora del procés d'*empalmament (splicing)*. Des de la seva identificació s'han publicat 4 treballs que descriuen mutacions en el gen que codifica per la proteïna en casos atípics de ELA familiar i, alhora, polimorfismes de la proteïna en casos de ELA esporàdica (Gitcho et al., 2008; Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Van Deerlin et al., 2008). Actualment, s'han trobat fins a un total de 38 mutacions (Figura I-6) en pacients amb ELA, amb o sense història familiar, que correspondrien a prop del 4% dels casos de ELA familiar i a < 1% dels casos de ELA esporàdica.

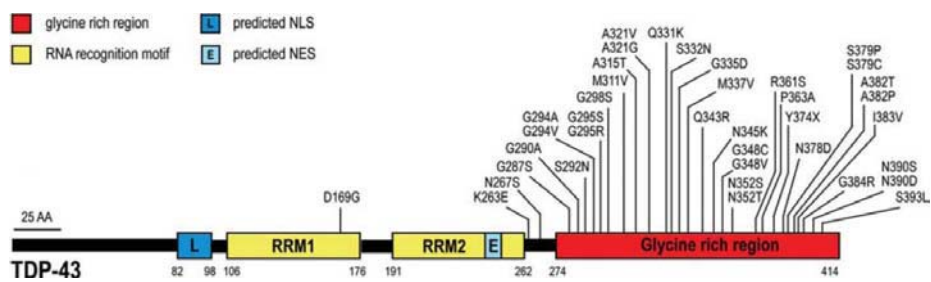


Figura I-6. Localització de les mutacions associades a ELA en TDP-43. La gran majoria de les mutacions descrites es troben al domini ric en glicines de l'extrem C-terminal. Totes són mutacions de sentit erroni excepte TDP-43 ^{Y374X}, una mutació sense sentit. NLS, *nuclear localization signal*; NES, *nuclear export signal* (Lagier-Tourenne et al., 2010).

TDP-43 és una proteïna de 414 aminoàcids codificada per 6 exons, on hi trobem 2 motius de reconeixement de RNA (RRM1 i RRM2) i una regió C-terminal rica en glicines. La majoria de les mutacions es troben situades al domini d'unió a ribonucleoproteïnes nuclears (domini ric en glicines) de l'extrem C-terminal de la seqüència i són mutacions dominants de sentit erroni. L'anàlisi *post mortem* de pacients que presentaven mutacions de TDP-43 mostrava un patró similar a la patologia de TDP-43 observada en pacients amb ELA esporàdica i pacients amb FTLN: distribució alterada de la proteïna, normalment localitzada a nucli, plegament incorrecte i formació d'inclusions proteïques tan en nucli com en citoplasma de MN i cèl·lules glials (Dickson et al., 2007; Neumann et al., 2007; Mackenzie et al., 2007). Aquesta redistribució anormal de TDP-43 en citoplasma es observable en les primeres etapes de la malaltia (Giordana et al., 2009). S'ha detectat també una hiperfosforilació i ubiqüitinització de TDP-43, així com la producció de molts fragments C-terminal (CTFs) amb un pes d'uns 25 KDa (Neumann et al., 2006; Arai et al., 2006). Sembla ser que les mutacions també comportarien una pèrdua de funció de la proteïna, provocant un metabolisme anormal del RNA (Buratti et al., 2008; Winton et al., 2008).

1.4.6 Mutacions de FUS/TLS

La identificació de mutacions en TDP-43 lligades a ELA va precedir el descobriment de mutacions en una altra proteïna de la família TARDBP, FUS/TLS (*Fused in sarcoma/Translocated in liposarcoma*), també relacionada recentment a la forma familiar de la malaltia (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Actualment s'han descrit fins a 30 mutacions en prop del 4% de casos de ELA familiar i en algunes ELA esporàdiques atípiques sense història familiar relacionada (Corrado et al., 2009; Blair et al., 2009; Belzil et al., 2009).

FUS/TLS és una proteïna de 526 aminoàcids codificada per 15 exons i caracteritzada per un domini N-terminal ric en residus de serina, tirosina, glutamina i glicina (regió SYQG), dues regions riques en glicines, un motiu de reconeixement d'RNA, un motiu de dits de zinc (ZnF) i un domini de repeticions múltiples arginina/glicina/glicina (RGG) en l'extrem C-terminal (Figura I-7). La majoria de les mutacions es troben en el domini ric en glicines i en l'extrem C-terminal de la proteïna.

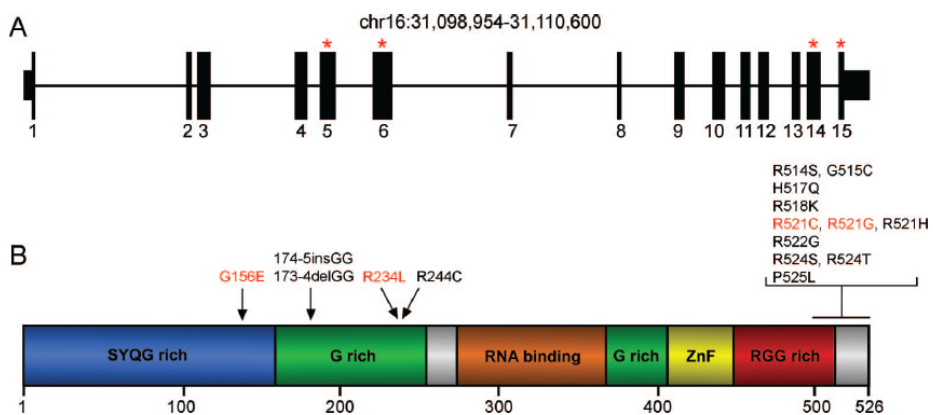


Figura I-7. Mutacions en FUS/TLS lligades a ELA. (A) Esquema de la seqüència de FUS/TLS on s'indiquen els exons (barres negres) i les regions no codificants. Els asteriscs vermells indiquen els exons on s'han trobat mutacions. **(B)** Estructura lineal de la proteïna FUS/TLS indicant els diferents dominis i algunes de les mutacions descrites. En vermell les mutacions trobades a la població d'Itàlia (Ticozzi et al., 2009).

La majoria de les mutacions són de sentit erroni i herència dominant. Gairebé tots els pacients que presenten mutacions en FUS/TLS desenvolupen un fenotip de ELA clàssica, sense símptomes cognitius. S'ha descrit, però, el cas d'un pacient que alhora presentava ELA i FTLN (Ticozzi et al., 2009), i dos casos de pacients amb mutacions en FUS/TLS que van desenvolupar FTLN però no presentaven alteracions motores (Blair et al., 2009; Van Langenhove et al., 2010). Els últims

treballs publicats en l'estudi de TDP-43 i FUS/TLS han trobat proves que recolzen l'existència de coincidències clíniques, genètiques i patològiques entre la ELA i la FTLD. Així com TDP-43, FUS/TLS té una localització predominantment nuclear, amb baixos nivells d'acumulació en citoplasma (Andersson et al., 2008). L'anàlisi de fraccions d'escorça i medul·la espinal de pacients amb mutacions en FUS/TLS va detectar la presència d'inclusions citoplasmàtiques de la proteïna en neurones i cèl·lules glials (Tateishi et al., 2009; Vance et al., 2009). Alhora, també es van descriure agregats intranuclears i citoplasmàtics de FUS/TLS en cervell i medul·la espinal de pacients que presentaven un subtipus de FTLD, sense inclusions de TDP-43 (Munoz et al., 2009; Woulfe et al., 2009). En aquest cas, però, i a diferència de TDP-43, les inclusions de FUS/TLS no presentaven hiperfosforilació i ubiquitinització anòmales (Neumann et al., 2009).

1.5 Mecanismes etiopatogènics en el procés degeneratiu de la ELA

Tot i ser descrita fa més de 135 anys, les causes que determinen la degeneració progressiva de les MN en la ELA segueixen essent desconegudes, tret de les mutacions de la SOD1 trobades en alguns dels casos de ELA familiar. En base als estudis realitzats amb mostres de teixit humà *post mortem*, la recerca en els models animals i els treballs amb cultius *in vitro*, s'han proposat diferents mecanismes que intervindrien en la etiopatogènia de la ELA. Entre tots els mecanismes proposats destaquen l'excitotoxicitat per glutamat, l'estrès oxidatiu, la disfunció mitocondrial, la neuroinflamació, les alteracions en el transport axonal, la toxicitat causada per agregats proteics intracel·lulars i l'autoimmunitat.

Avui dia es considera que la patologia de la ELA és un fenomen multifactorial i multisistèmic, on intervindrien els diferents mecanismes proposats, promovent l'inici i propagació de la malaltia, afectant tan

les MN com les cèl·lules veïnes no neuronals (Figura I-8). Les últimes proves donarien suport a una disfunció mitocondrial, que actuaria conjuntament amb l'excitotoxicitat, donant lloc a una agregació proteica anormal i convergint, finalment, en una via comú de neurodegeneració a través de mecanismes apoptòtics (Goodall i Morrison, 2006).

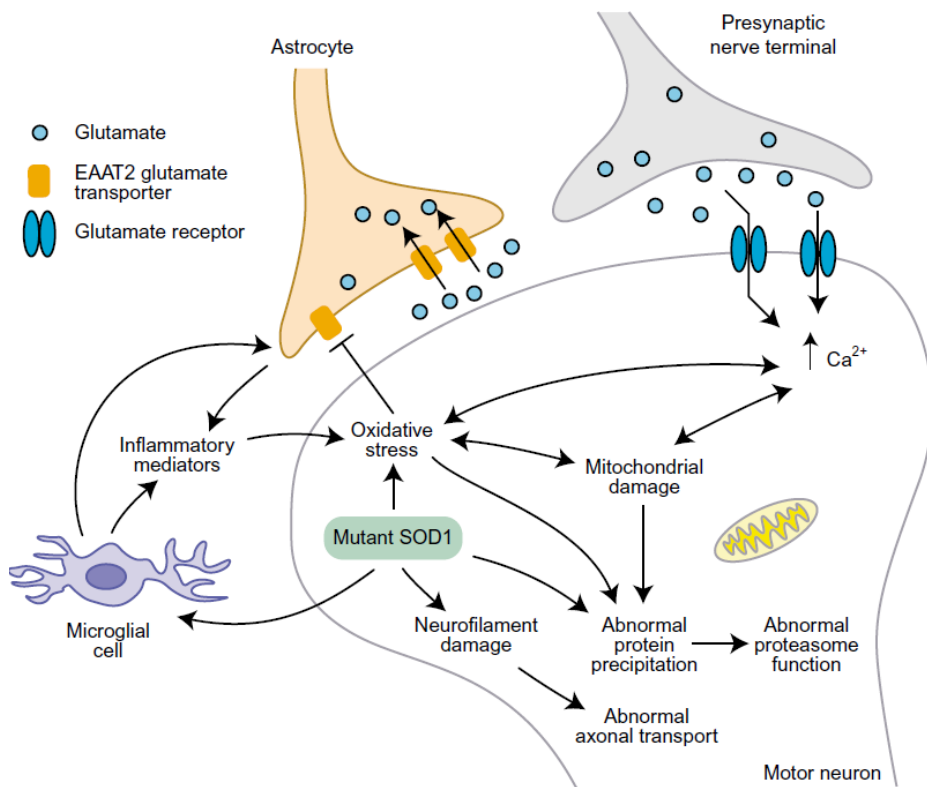


Figura I-8. Interacció hipotètica dels mecanismes patològics proposats en la ELA. L'estrès oxidatiu afectaria la funció dels mitocondris i inhibiria el transportador astrogliar de glutamat EAAT2. L'excés de glutamat provocaria neurotoxicitat per increment de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular, generant així estrès oxidatiu i dany mitocondrial. L'alteració de la funció mitocondrial produiria també estrès oxidatiu, reforçant la cascada patològica. Els factors inflamatoris alliberats per la microglia activada provocarien la secreció addicional de proteïnes proinflamatòries dels astròcits, incrementant l'estrès inflamatori i oxidatiu. mSOD1, trobada en alguns casos de ELA familiar, tòxica i inestable, formaria agregats en el citoplasma de les MN, l'axoplasma i els mitocondris. Aquests agregats interferirien en la funció del proteasoma i els NF, provocant un transport axonal deficient i potenciant

l'agregació proteica. mSOD1, alhora, afavoriria la creació d'espècies reactives de l'oxigen incrementant l'estrès oxidatiu (Goodall i Morrison, 2006).

La idea del caràcter multisistèmic de la ELA estaria recolzada per les alteracions cognitives, similars a les observades en pacients de FTLD, trobades en gairebé un terç dels pacients amb ELA (Rippon et al., 2006).

Com en altres malalties complexes, en la etiologia de la ELA poden intervenir-hi factors de tipus ambiental. Els factors de risc que s'han associat a la malaltia són l'edat avançada, ser de sexe masculí i l'hàbit de fumar (Armon, 2003). Altres factors implicats en alguns estudis epidemiològics inclouen el treball agrari, l'exposició a plom o mercuri, l'activitat esportiva intensa, el treball en indústries tèxtils o de materials plàstics i l'exposició a treballs de soldadura (Strong, 2000). Recentment s'ha investigat també l'augment de casos de ELA en soldats americans que van participar en la guerra del Golf (Armon, 2004) i en jugadors professionals de futbol de la lliga italiana (Chio et al., 2005).

Una variant poc freqüent de la malaltia, delimitada geogràficament, és el cas de la illa de Guam, al pacífic oest. En aquesta població, un factor ambiental com és una neurotoxina present en unes llavors que es consumeixen en la dieta habitual provoca un síndrome complex amb símptomes de ELA, demència i Parkinson (Koerner, 1952; Schmidt et al., 2001).

1.5.1 Excitotoxicitat per glutamat

El glutamat és el principal neurotransmissor (NT) excitador del SNC. La seva concentració en l'espai extracel·lular del cervell està subjecta a un control molt acurat, ja que la sobreexposició a glutamat té efectes letals sobre les neurones. Excitotoxicitat és el terme que s'utilitza per

indicar el dany neuronal induït per la sobre-estimulació dels receptors de glutamat, provocant l'alteració de l'homeòstasi intracel·lular del Ca^{2+} i la producció de radicals lliures (Olney, 1969). Aquest fenomen està implicat en la patogènia de processos neurològics molt diversos com són l'infart cerebral, el trauma neuronal, l'epilèpsia i, probablement també, en malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer.

El glutamat exerceix la seva funció a través de receptors de tipus metabotròpic, acoblats a proteïnes G i a l'activació de segons missatgers intracel·lulars, i a través de receptors de tipus ionotròpic, canals iònics modulats per lligand. Són aquests últims els que han estat directament relacionats amb els fenòmens d'excitotoxicitat (Van den Bosch et al., 2000). Dintre dels receptors ionotròpics de glutamat hi podem distingir tres tipus, depenent de la molècula agonista que els activa: AMPA, NMDA i Kainat. Quan aquests receptors s'activen per l'alliberació presinàptica de glutamat es converteixen en porus o canals que faciliten l'entrada de Na^{2+} i Ca^{2+} a la neurona postsinàptica. El Na^{2+} té fonamentalment un efecte despolaritzant, provocant un canvi elèctric postsinàptic, mentre que el Ca^{2+} determina l'activació de diverses vies de senyalització intracel·lular (Figura I-9).

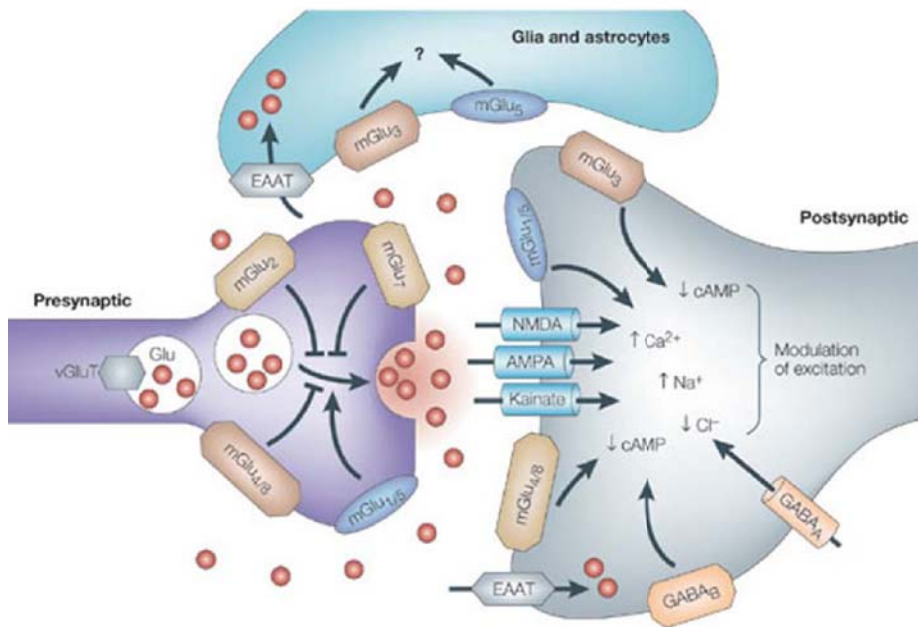


Figura 1-9. Representació esquemàtica de la localització dels receptors i transportadors de glutamat en la sinapsi. Els transportadors vesiculars de glutamat (vGLUT) carreguen el NT a les vesícules del terminal presinàptic. Els receptors metabotròpics de glutamat (mGLU), situats pre i postsinàpticament regulen la secreció del NT i l'excitabilitat postsinàptica, mentre que els receptors postsinàptics de glutamat (AMPA, Kainat i NMDA) regulen la transmissió excitadora ràpida i els fenòmens de plasticitat neuronal. Els transportadors gials i neuronals de glutamat (EAAT) recapten el NT de l'espai intersinàptic i faciliten la terminació de la transmissió glutamatèrgica (Swanson et al., 2005).

L'acció del glutamat sobre els seus receptors és ràpida i transitòria. S'allibera a l'espai extracel·lular des de els terminals presinàptics però es retirat immediatament per l'acció de transportadors específics (EAAT, o *excitatory amino acid transporter*), presents tan a neurones com a cèl·lules de la glia. S'han identificat molecularment 5 transportadors de glutamat: EAAT1-5. El transportador EAAT3, també anomenat EAAC1, es troba a les neurones i els transportadors EAAT2, també anomenat GLT1, i EAAT1, també anomenat GLEST, es troben a la glia astrocitària.

En una situació d'excitotoxicitat, els nivells de glutamat extracel·lular persisteixen suficientment elevats com per activar de forma permanent els receptors de glutamat, produint-se una entrada massiva de Na^{2+} i Ca^{2+} a l'interior de la neurona. Els mecanismes interns de tamponament de Ca^{2+} es saturen i no es pot mantenir la concentració de l'ió dintre del rang fisiològic. Degut a la seva naturalesa de segons missatger, el Ca^{2+} activa diverses proteases, lipases, i altres enzims que tenen conseqüències letals per a la neurona. També malmet els mitocondris, ja que aquests òrgans tenen la capacitat de capturar el Ca^{2+} citosòlic quan la seva concentració es més elevada del normal. La disfunció mitocondrial afavoreix la producció exagerada de radicals lliures, provocant estrès oxidatiu, i agreujant encara més la situació (Van den Bosch et al., 2006) .

Les primeres proves d'alteracions excitotòxiques en la ELA van ser conseqüència del descobriment de nivells elevats de glutamat en sèrum i líquid cefaloraquídi (LCR) de pacients (Patten et al., 1978; Rothstein et al., 1990; Rothstein et al., 1991). L'increment dels nivells de glutamat en LCR estava relacionat amb la severitat de la malaltia (Spreux-Varoquaux et al., 2002). Aquest fet, es va relacionar, també, amb el dèficit en l'eliminació del glutamat de l'espai intersinàptic que s'havia detectat en preparacions de sinaptosomes procedents de cervell i de medul·la espinal de pacients amb ELA esporàdica (Rothstein et al., 1992, Rothstein et al., 1995). Es va observar que aquesta deficiència era deguda a la pèrdua selectiva del transportador EAAT2, tan en pacients amb ELA esporàdica com familiar (Rothstein et al., 1995; Sasaki et al., 2000). La depleció de EAAT2 en ratolins transgènics provocava la degeneració de les MN (Rothstein et al., 1996). Ratolins $\text{SOD1}^{\text{G85R}}$, en estadis finals de la malaltia, presentaven una disminució dels nivells de proteïna EAAT2 del 50%, respecte dels ratolins control, a nivell de medul·la espinal (Bruijn et

al., 1997a) i, en el model de rates i ratolins transgènics SOD1^{G93A}, l'expressió de EAAT2 estava també disminuïda en estadis presintomàtics de la malaltia i, completament abolida en estadis terminals (Bendotti et al., 2001; Howland et al., 2002). Aquest descobriments suggereixen que l'excitotoxicitat és un mecanisme patològic comú que estableix un nexa entre les formes familiars, associades a mutacions de SOD1, i les formes esporàdiques de ELA.

Es va estudiar la funció del transportador astroglial EAAT2 en oòcits de *Xenopus* que, alhora, coexpressaven SOD1, i es va observar que mSOD1, però no la forma WT, inactivava el transportador en presència de peròxid d'hidrogen (Trotti et al., 1999), suggerint que EAAT2 és una de les dianes de la toxicitat de mSOD1. Així mateix, la sobreexpressió de EAAT2 en ratolins SOD1^{G93A} retardava l'inici de les alteracions motores, disminuïa l'activació de caspasa-3 i reduïa la formació d'agregats (Guo et al., 2003).

No està clara, però, la causa per la qual EAAT2 es troba alterat. S'han detectat múltiples formes d'*empalmaments* aberrants o alternatius per aquesta proteïna en àrees afectades del cervell de pacients amb ELA i també en el seu LCR (Lin et al., 1998). Malgrat això, les variants d'empalmament alternatiu de EAAT2 s'han trobat també en mostres *post mortem* de pacients amb la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de cossos de Lewy i, inclús, en individus control (Flowers et al., 2001; Honig et al., 2000) indicant que les variants de EAAT2 no estarien lligades selectivament a la ELA.

Les MN són extremadament vulnerables al dany excitotòxic al tractar-se d'un subtipus cel·lular que expressa, en grans quantitats, receptors de glutamat de tipus AMPA (AMPA receptors) que contenen una baixa proporció de subunitat GluR2 (subunitat reguladora), presentant una permeabilitat molt elevada al Ca²⁺ (Williams i Ince, 1997). S'ha observat que el contingut de mRNA de GluR2 és significativament inferior en MN que en altres tipus neuronals, el que indica una

regulació transcripcional (Van Damme et al., 2002). La depleció de la subunitat GluR2 accelera la degeneració de les MN i escurça la vida mitja dels ratolins SOD1^{G93A} (Van Damme et al., 2005). Alhora, s'ha detectat que l'edició del mRNA de GluR2 es deficient en les MN espinals de pacients amb ELA (Kawahara et al., 2004). Estudis posteriors, però, han determinat que no existeixen aquestes alteracions en els models de rates transgèniques mSOD1 en estadis simptomàtics de la malaltia (Kawahara et al., 2006) indicant que les deficiències transcripcionals de GluR2 no intervindrien en la patologia de la forma familiar de la malaltia.

En uns estudis recents s'ha observat que alguns factors solubles secretats pels astròcits son capaços de regular la transcripció del gen GluR2, produint MN amb una baixa concentració de AMPARs permeables a Ca²⁺, i disminuint així la vulnerabilitat excitotòxica d'aquests cèl·lules. VEGF, secretat pels astròcits, es capaç de regular a l'alça l'expressió transcripcional de GluR2 (Bogaert et al., 2009), de la mateixa manera que ho fan BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) i GDNF (*Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor*) (Brene et al., 2000). Curiosament, la presència de mSOD1 interfereix en la producció i/o secreció d'aquests factors (Van Damme et al., 2007).

El reticle endoplasmàtic (RE), degut a la seva funció de processament i tràfic de proteïnes dependent de Ca²⁺, i, al ser un dels orgànuls citoplasmàtics amb major reservori de l'ió, constitueix una de les dianes importants del dany excitotòxic. El RE i els mitocondris interactuen intercanviant Ca²⁺ de forma cíclica. Les disfuncions en aquesta interacció indueixen l'alliberació del Ca²⁺ del RE cap al citoplasma, l'acumulació de proteïnes malplegades al seu interior i l'activació de la Resposta a estrès del RE (UPR o *Unfolded Protein Response*). Quan no és possible restaurar la funció de l'orgànu, mitjançant l'activació del procés d'autofàgia, els dominis del RE que contenen agregats proteics son envoltats per membranes cel·lulars

que seran fusionades amb el compartiment lisosomal. Si el fenomen autofàgic és molt extens, s'indueix la degeneració i la mort neuronal.

Els nivells de proteïnes associades a estrès del RE estan regulades a l'alça en les MN espinals de pacients amb ELA esporàdica. Alhora, la translocació de mSOD1 al RE provoca l'estrès de l'orgànul en les MN espinals dels models animals de ELA (Atkin et al., 2006). En un treball recent, s'ha observat també la inducció de quinases sensores d'estrès, xaperones i mediadors d'apoptosi, senyals inequívocs de l'activació de la UPR, en medul·la espinal de pacients amb ELA esporàdica (Atkin et al., 2008).

Els mitocondris, degut a la seva funció reguladora de la concentració citosòlica de Ca^{2+} , actuant com el principal mecanisme de depuració de les sobrecàrregues intracel·lulars de l'ió, són també una diana important del dany excitotòxic que es dona en la ELA. En un treball que monitoritzava la recaptació de Ca^{2+} en els mitocondris, per l'observació de la despolarització del potencial de membrana de l'orgànul deguda a l'entrada de l'ió, es va observar que, en el model de ratolí mSOD1, les despolaritzacions induïdes per Ca^{2+} eren significativament superiors a les observades en animals controls (Nguyen et al., 2009). De la mateixa manera, s'ha descrit una sobrecàrrega de Ca^{2+} crònica en els mitocondris de terminals nerviosos de pacients amb ELA (Siklos et al., 1996), i, en estudis posteriors, s'ha observat un increment en la producció d'espècies reactives de l'oxigen en els mitocondris de MN espinals en cultiu, degut a una sobrecàrrega de Ca^{2+} mitocondrial després de l'estimulació excitotòxica dels receptors AMPA/Kainat (Carriedo et al., 2000).

Sembla ser doncs, que un efecte excitotòxic local podria iniciar un cicle patològic complex que afectaria diferents estructures i duria cap a la degeneració cel·lular. Les alteracions en els diferents orgànuls i tipus cel·lulars, relacionades a fenòmens d'excitotoxicitat que s'han

descriu en pacients amb ELA i en els models animals de la malaltia, estan resumides a la figura I-10.

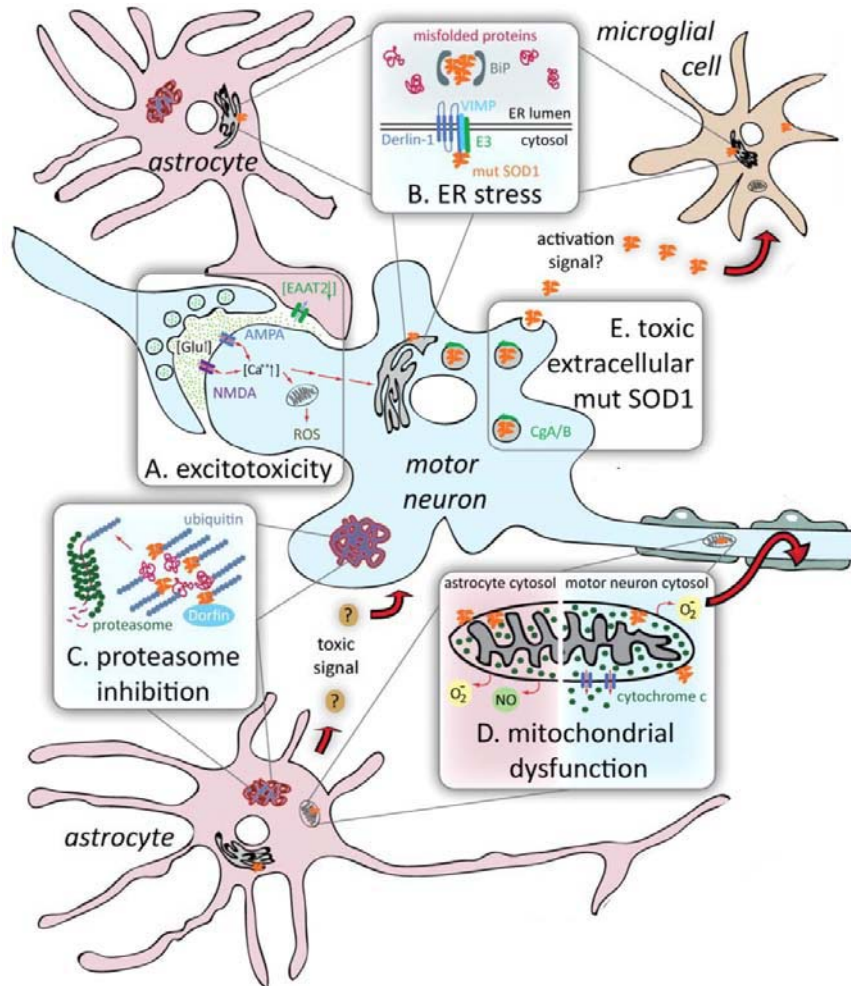


Figura I-10. Esquema de les alteracions observades en situació d'excitotoxicitat i en presència de mSOD1. (A) L'excitotoxicitat es produeix per la sobre-estimulació dels receptors postsinàptics de glutamat, donada per una recaptació fallida del NT de l'espai intersinàptic a causa d'una pèrdua/disfunció del transportador astroglial EAAT2. (B) L'excés de Ca^{2+} actua sobre el RE provocant estrès en l'òrganul, alhora que s'hi dipositen agregats de mSOD1, tan en MN com en astròcits i cèl·lules microglials, agreujant la situació. (C) La disfunció del proteasoma es dona per una sobrecàrrega de la via de degradació de l'òrganul a causa de l'acumulació d'agregats proteics malplegats i ubiquitinitzats, tan en MN com en astròcits. (D) Els mitocondris actuen recaptant la sobrecàrrega de Ca^{2+} intracel·lular que es dona per la

sobreactivació dels receptors de glutamat, generant radicals lliures en resposta. L'acumulació de mSOD1 al seu interior provoca també estrès oxidatiu en neurones i cèl·lules glials. **(E)** mSOD1 extracel·lular es secretada des de les MN després d'interaccionar amb components de les vesícules sinàptiques i exerceix la seva toxicitat sobre les cèl·lules de la microglia (modificat de l'lieva et al., 2009).

Fins ara, però, l'argument més important a favor del paper que juga l'excitotoxicitat en la patologia de la ELA és que el Riluzol, l'únic fàrmac que retarda la progressió de la malaltia en humans, té propietats anti-excitotòxiques. Aquest fàrmac inhibeix l'alliberació de glutamat a través de la inactivació dels canals de Na^{2+} dependents de voltatge en els terminals nerviosos glutamatèrgics (Doble, 1996), bloqueja els receptors AMPA i NMDA (Debono et al., 1993; Hubert et al., 1994; Lamanauskas i Nistri, 2008), i té un efecte neuroprotector en el model de ratolí mSOD1 (Gurney et al., 1996), on, a través de diferents mecanismes que duen al bloqueig dels AMPARs, incrementa significativament la supervivència.

1.5.2 Estrès oxidatiu

En el transcurs d'algunes rutes d'activitat metabòlica normal es generen petites quantitats d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), com l'anió superòxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), l'anió hidroxil (OH^{\cdot}) o el peroxinitrit (ONOO^{\cdot}), totes químicament molt actives i potencialment tòxiques per les cèl·lules (Lenaz et al., 1998). Aquestes espècies reaccionen amb proteïnes, lípids i àcids nucleics, alterant-los (Beal, 2002). L'activitat respiratòria mitocondrial, la ruta de l'àcid araquidònic i la del citocrom p450 són les principals formes de generació de ROS. Per tal d'evitar el dany oxidatiu, les cèl·lules disposen d'una bateria de defenses: 1) enzims antioxidants, com la SOD, la catalasa o la glutatió peroxidasa, que converteixen les ROS en molècules molt menys reactives. 2) petites molècules amb acció antioxidant, com són el glutatió, les vitamines C i

E, el coenzim Q o l'àcid lipoic. 3) minimització de la disposició de molècules pro-oxidants i 4) protecció mitjançada per *heat shock proteins* (Hsp), que actuen eliminant o reparant les proteïnes malmeses. Quan els mecanismes de defensa antioxidant queden sobrepassats per un excés de producció de ROS o quan l'acció antioxidant disminueix, apareix l'estrès oxidatiu i el dany cel·lular.

Diversos estudis evidencien la participació de l'estrès oxidatiu en la patogènia de la ELA, i existeixen dades que constaten la presència d'un metabolisme de ROS elevat, per la detecció de marcadors bioquímics específics de dany oxidatiu, en mostres d'escorça prefrontal i medul·la espinal *post mortem* de pacients amb ELA esporàdica (Shaw et al., 1995; Simpson et al., 2003; Iliava et al., 2007). L'any 1997, el grup de Flint Beal va detectar, per immunohistoquímica, un marcatge neuronal incrementat per hemoxigenasa-1, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) i 3-nitrotirosina, tots tres marcadors de dany oxidatiu, en medul·la espinal de pacients amb ELA esporàdica i familiar (Beal et al., 1997; Ferrante et al., 1997). Es van realitzar les mateixes mesures en el model de ratolí mSOD1 confirmant la presència de nivells elevats de OH⁻ i altres ROS (Bogdanov et al., 1998; Liu et al., 1998), dany oxidatiu en proteïnes (Andrus et al., 1998), lípids (Hall et al., 1998a) i DNA (Liu et al., 1999), així com elevades concentracions de nitrotirosina, marcador del dany oxidatiu mitjançat per ONOO⁻ (Cha et al., 2000).

Els marcadors de dany oxidatiu de proteïnes i lípids s'han localitzat en MN, macròfags, astròcits i microglia reactiva de la substància gris de medul·la espinal de pacients amb ELA (Shibata et al., 2001). El dany oxidatiu al DNA, mesurat pels nivells de 8-OHdG, també s'ha trobat incrementat en medul·la cervical d'aquests pacients (Fitzmaurice et al., 1996). Nivells elevats d'aquest marcador han estat detectats en LCR de malalts amb ELA (Ihara et al., 2005), així com també els de 3-nitrotirosina (Tohgi et al., 1999).

L'entrada de Ca^{2+} dins els mitocondris estimula la producció de ROS (Dykens, 1994) i, l'exposició de les MN i les cèl·lules gials a aquestes ROS, redueix significativament la recaptació de glutamat per reducció del nombre de EAAT2 (Trotti et al., 1998). La inactivació d'aquests transportadors comporta l'increment dels nivells de glutamat en la sinapsi, el que repercuteix en una sobreactivació dels receptors AMPA/Kainat i NMDA, incrementant els nivells de Ca^{2+} intracel·lular i la generació de molècules ROS. L'excitotoxicitat i l'estrès oxidatiu es combinarien doncs en un cercle viciós (Rao et al., 2004).

Alguns investigadors han suggerit que l'estrès oxidatiu muscular podria contribuir a la patogènia de la ELA. La detecció de marcadors d'estrès en múscul esquelètic de ratolins mSOD1, així com la detecció de la sobreexpressió de SOD1, SOD2 i catalasa també en el múscul esquelètic d'aquest model, en estadis simptomàtics de la malaltia, reafirmarien aquesta idea (Mahoney et al., 2006).

Si l'estrès oxidatiu és una causa primària de la ELA o una conseqüència de la malaltia és encara debatut. El descobriment de mutacions en el gen de l'enzim antioxidant SOD1 en algunes formes de ELA familiar va impulsar la teoria del dany oxidatiu en la etiopatogènia de la malaltia. Nivells creixents de OH^{\cdot} , en paral·lel amb la progressió de la malaltia, han estat detectats en el model de ratolí SOD1^{G93A} (Andrus et al., 1998) però no en ratolins SOD1^{G37R} (Bruijn et al., 1997b). L'administració d'un extracte de *Ginkgo biloba*, el qual exerceix efectes protectors contra el dany mitocondrial i l'estrès oxidatiu, és efectiu retardant l'inici de la malaltia i augmentant la supervivència en els models de ratolins mSOD1 (Ferrante et al., 2001). De la mateixa manera, la prevenció de la propagació de radicals lliures amb DMPO (5,5'-dimethylpyrroline-N-oxide), un compost diamagnètic que s'uneix al radical lliure i l'estabilitza, o amb l'antioxidant porfirina, també retarda la paràlisi i augmenta la supervivència en ratolins SOD1^{G93A} (Crow et al., 2005; Liu et al., 2002; Wu et al., 2003). Finalment, la

potenciació de l'estrès oxidatiu per la deficiència de l'enzim mitocondrial SOD2 és perjudicial i empitjora dràsticament el fenotip patogènic en els ratolins mSOD1 (Andreassen et al., 2000).

1.5.3 Alteracions mitocondrials

Els mitocondris són orgànuls multifuncionals, encarregats de produir energia en forma d'ATP, a través de la fosforilació oxidativa de nutrients, i ajudar a mantenir l'homeòstasi del Ca^{2+} , però també, són la principal font de producció de ROS i actuen com a controladors de les vies intrínseques d'apoptosi. Així, la disfunció mitocondrial pot dur a la mort de la cèl·lula, o bé per una fallida bioenergètica, o bé per l'activació dels processos d'apoptosi.

En els últims anys, diverses publicacions han aportat proves d'alteracions mitocondrials com a signe inequívoc de patologia tan en ELA esporàdica, com familiar, així com en els models animals de la malaltia (Beal, 2000; Von Lewinski i Keller, 2005; Martin, 2007). Els últims estudis enfoquen les disfuncions mitocondrials relacionades amb la ELA en alteracions a la cadena respiratòria de l'orgànul, també anomenada cadena de transport d'electrons. Els mitocondris de pacients amb ELA presenten una morfologia anormal, nivells de Ca^{2+} elevats i una activitat disminuïda dels complexos V i VI de la cadena respiratòria (Manfredi i Xu, 2005). En algunes formes esporàdiques de ELA, s'ha detectat també una disminució de l'activitat del complex IV (citocrom C), que han estat relacionades a mutacions en el DNA mitocondrial (Vielhaver et al., 2000). La transfecció de DNA mitocondrial de pacients amb ELA a cèl·lules de neuroblastoma humà en cultiu produïa alteracions en la cadena respiratòria, un increment en l'activitat enzimàtica captadora de radicals lliures, alteracions de l'homeòstasi del Ca^{2+} i anormalitats en l'ultraestructura dels mitocondris (Swerdlow et al., 1998). Alhora, anormalitats mitocondrials com són la inflamació i la vacuolització, són aparents en estadis

presimptomàtics en els ratolins SOD1^{G37R} (Wong et al., 1995) però no s'han detectat en els ratolins SOD1^{G85R} (Bruijn et al., 1997a). El grau de vacuolització dels mitocondris s'ha correlacionat amb la disminució de la força muscular en el model de ratolí SOD1^{G93A} (Kong i Xu, 1998). S'han proposat diferents mecanismes de dany mitocondrial mitjançat per mSOD1, incloent disrupcions en el metabolisme energètic de l'òrganul, obstrucció de la maquinaria d'importació de proteïnes o alteracions en els mecanismes de tamponament del Ca²⁺ intracel·lular (Boillee et al., 2006b). Una altra línia d'investigació ha posat de manifest la importància d'alteracions en el transport mitocondrial relacionades a ELA. En casos de ELA familiar associats a mSOD1 s'ha detectat un alentiment del transport axonal ràpid de mitocondris i altres òrganuls membranosos (De Vos et al., 2007; Zhang et al., 2007). Curiosament, el transport axonal de mitocondris es inhibeix inicialment en direcció anterògrada, suggerint l'existència d'un dèficit energètic en els terminals presinàptics de les plaques motores.

Tot i que els mecanismes moleculars exactes són desconeguts, existeixen moltes proves que suggereixen l'acció directa de mSOD1 en la disrupció de la funció mitocondrial (Figura I-11). Agregats de SOD1 han estat trobats a l'interior de la matriu dels mitocondris en casos de ELA familiar i models animals mSOD1 (Jaarsma et al., 2001; Higgins et al., 2002; Pasinelli et al., 2004). Així com també s'ha descrit una disminució de l'activitat enzimàtica en la cadena de transport d'electrons a nivell dels complexos I, II i IV, en estadis inicials de la malaltia, en models transgènics mSOD1, tan *in vivo* com *in vitro* (Jung et al., 2002; Menzies et al., 2002). Un treball més recent descriu com mSOD1 es capaç de desmantellar l'associació entre el complex IV i la membrana interna del mitocondri, interrompent així la cadena respiratòria (Kirkinetzos et al., 2005). Sembla ser que l'alteració de la funcionalitat de la cadena respiratòria mitocondrial activaria la producció de ROS. Això mateix s'ha observat en cultius de MN que

expressaven mSOD1 (Kruman et al., 1999) i coincidia, alhora, amb els resultats d'una sèrie d'experiments realitzats sobre les MN rodanxes de cervell, on el cianur inhibia el complex IV de la cadena respiratòria (Bergmann i Keller, 2004).

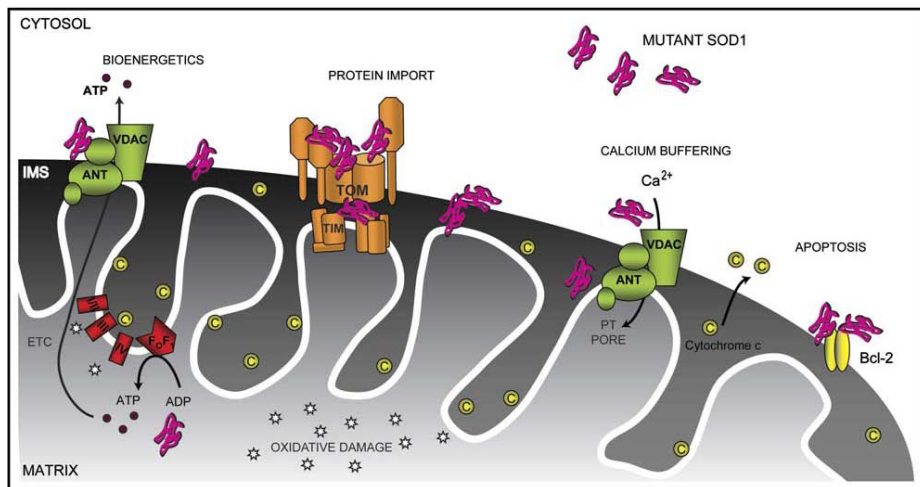


Figura I-11. Mecanismes proposats en l'alteració mitocondrial provocada per mSOD1. mSOD1 ha estat localitzada en els mitocondris dels teixits afectats per ELA. La proteïna podria interferir en la cadena de transport d'electrons interrompent la fosforilació oxidativa que dona com a producte ATP, alterant així la funció bioenergètica de l'òrganul. mSOD1 podria bloquejar també els mecanismes mitocondrials de tamponament de Ca^{2+} . Els agregats de mSOD1 podrien interferir amb components dels processos d'apoptosi dependents de mitocondri, com la proteïna Bcl-2, duent a terme una activació prematura de la cascada apoptòtica i afavorint l'alliberació del citocrom C al citosol. S'ha proposat que mSOD1 podria bloquejar la maquinària del complex d'importació de proteïnes, TOM (*translocator of the outer membrane*) i TIM (*translocator of the inner membrane*). L'estrès oxidatiu degut a l'alteració de certes proteïnes mitocondrials contribuiria també a la disfunció de l'òrganul (Boilee et al., 2006).

Els mitocondris són òrganuls indispensables en els mecanismes involucrats en la supervivència cel·lular, sent les ROS produïdes en els mitocondris elements essencials en la regulació dels processos d'apoptosi. Les ROS són inductores de la mort cel·lular: regulen tan els

estadis inicials com finals de l'apoptosi, i la seva inhibició protegeix contra la mort de la cèl·lula (Fleury et al., 2002). Alhora, les ROS també són producte del propi procés d'apoptosi, degut a l'acció de tall que les caspases exerceixen sobre els complexos I i II de la cadena de transport d'electrons (Ricci et al., 2004). Hi ha un gran nombre de proves bioquímiques que avalen l'activació de la mort cel·lular programada dependent de mitocondris en la ELA (Brooke et al., 1986). En particular, aquest procés ha estat detallat a nivell molecular en el model de ratolí SOD1^{G93A} (Guegan et al., 2001) i en cultius cel·lulars que expressen mSOD1 (Cozzolino et al., 2006). La proteïna proapoptòtica Bax es translocada a l'interior del mitocondri afavorint l'alliberació del citocrom C al citosol. Aquest, s'uneix amb la proteïna Apaf-1 activant la caspasa iniciadora casp9, que alhora activa les caspases efectores casp3 i casp7, iniciant-se el procés d'apoptosi. En concordança amb això, s'ha observat que la inhibició de l'alliberació del citocrom C del mitocondri allarga la vida mitja dels ratolins SOD1^{G93A} (Zhu et al., 2002).

1.5.4 Agregats proteics intracel·lulars

Els agregats proteics són una característica distintiva de patologia en diverses malalties neurodegeneratives com són l'Alzheimer, el Parkinson, el Huntington o la ELA. En el cas de la ELA s'han detectat diferents tipus d'agregats proteics anormals, incloent-hi els cossos de Bunina, les inclusions ubiquitinitzades i les inclusions hialines riques en NF (Strong et al., 2005) (Taula I-2). Encara s'està debatent però si aquests agregats juguen un paper clau en la patogènia de la malaltia, són inofensius i es generen com a productes del procés degeneratiu, són beneficiosos (segrestant proteïnes tòxiques) o si són nocius per la cèl·lula (segrestant proteïnes essencials per al seu funcionament).

Taula-2. Trets patològics característics en la ELA

Table 1. Pathological features seen in amyotrophic lateral sclerosis	
Feature	Description/location
Loss of motor neurons	Evident in cortex, brain stem and spinal cord
Axonal spheroids	Neurofilament aggregates in proximal axons of motor neurons
Bunina bodies	Eosinophilic bodies found in the soma of anterior horn cells; these are unique to amyotrophic lateral sclerosis
Ubiquitinated inclusions 'Skein-like' inclusions 'Lewy body-like' inclusions	Predominantly found in lower motor neurons Threads/filamentous bodies Compact, dense bodies
Hyaline inclusions	Large aggregates containing neurofilaments and other entrapped proteins in the soma of motor neurons

(Goodall i Morrison, 2006)

Els agregats ubiquitinats són les inclusions més freqüents trobades, tan en ELA esporàdica com familiar. Aquestes inclusions presenten immunoreactivitat per diferents tipus de filaments intermedis, com són els NF, suggerint una alteració en el processament d'aquestes proteïnes per part del sistema proteasoma-ubiquitina (Wong et al., 2000).

mSOD1 és el major component dels agregats associats a la ELA familiar. S'han detectat agregats de mSOD1 insoluble en MN i cèl·lules gials de pacients amb ELA familiar i en els models animals de la malaltia. Així mateix, aquests agregats apareixen abans, o coincideixen, amb l'inici dels símptomes, i es van acumulant durant la progressió de la malaltia (Bruijn et al., 1998). Els agregats intracel·lulars interfereixen en diferents mecanismes (Figura 1-12) afavorint la degeneració de les MN: 1) segreguen compostos essencials per al funcionament de la cèl·lula com serien, els transportadors neuronals de glutamat o les Hsp40 i Hsp70 (Watanabe et al., 2001; Shinder et al., 2001). 2) redueixen l'activitat de les xaperones, encarregades de catalitzar el repliegament de les proteïnes, com en el cas de la xaperona del coure per SOD1 (CCS o *cooper chaperone for SOD1*) (Bruening et al., 1999), i 3) alteren l'activitat de la via proteasoma-

ubiquitina, provocant una disfunció de la via normal de degradació proteica (Niwa et al., 2002).

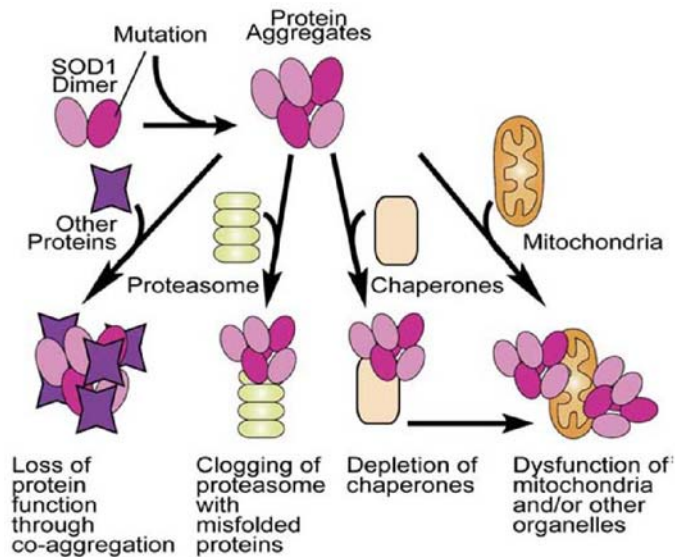


Figura I-12. Mecanismes propostats per la toxicitat dels agregats de mSOD1 lligada a ELA (Boillee et al., 2006b).

El plegament incorrecte de les proteïnes es considera l'iniciador probable de la formació d'agregats, es per això diversos treballs han estudiat el paper de les *Hsp* en la ELA. La sobreexpressió de *Hsp70*, *Hsp40* i *Hsp27* en cultius de MN disminueix el nombre d'agregats, augmenta la supervivència i afavoreix el creixement axonal (Patel et al., 2005, Takeuchi et al., 2002). Desafortunadament, aplicant aquesta estratègia *in vivo*, en quatre línies diferents de ratolins mSOD1, no es va aconseguir retardar la progressió de la malaltia ni millorar la patologia (Liu et al., 2005).

Recentment ha estat descrit que, com els cossos de Bunina i les inclusions ubiquitinitzades, els agregats citoplasmàtics de TDP-43 (apartat 1.4.5 de la secció Introducció) són també un tret comú en els casos de ELA esporàdica i familiar (Van Deerlin et al., 2008).

1.5.5 Transport axonal alterat

El citoesquelet és un element essencial en la determinació de la forma de la cèl·lula, els seus moviments i el tràfic intracel·lular d'òrgànuls i proteïnes. El citoesquelet de les neurones està constituït per microtúbuls, microfilaments d'actina i els anomenats filaments intermedis o NF. Els NF són les proteïnes del citoesquelet més abundants en les MN i juguen un paper clau en la regulació del diàmetre i creixement de l'axó, així com en la velocitat del transport axonal d'òrgànuls i altres molècules (Xu et al., 1993). En la ELA, hi ha diverses proves que confirmen l'alteració del citoesquelet i el transport axonal en MN de zones afectades per la malaltia. Una de les característiques histopatològiques típiques de la ELA és l'acumulació aberrant de NF, tan en el soma de les MN com en els axons proximals. La sobreexpressió de subunitats dels NF en ratolins transgènics provoca un acoblament alterat d'aquests NF, acompanyat d'un transport axonal aberrant i una disfunció generalitzada de les MN (Lee et al., 1994). Sorprenentment, la sobreexpressió de NF en ratolins SOD1^{G37R} no empitjora la progressió de la malaltia, sinó que atenua la degeneració de les MN i augmenta la supervivència (Couillard-Despres et al., 1998). En aquests animals l'acumulació de NF està incrementada en el soma però disminuïda en els axons. Sembla ser que l'acumulació de NF en el citosol contrarestarà la toxicitat mitjançada per mSOD1, tamponant certes reaccions intracel·lulars perjudicials com serien els nivells excessius de Ca²⁺ (Couillard-Despres et al., 1998) o la fosforilació de certes proteïnes per part de la CDK5 (*cyclin-dependent kinase 5*) (Nguyen et al., 2001a). A la vegada, la disminució de l'acumulació NF en els axons d'aquests animals estaria protegint les MN mitjançant la facilitació del transport axonal, el qual s'ha vist disminuït en etapes inicials presimptomàtiques de la malaltia en animals SOD1^{G93A} i SOD1^{G37R} (Zhang et al., 1997; Borchelt et al., 1998; Williamson i Cleveland, 1999).

El complex dineïna-dinactina, involucrat en el transport axonal retrògrad ràpid, es troba alterat en la ELA. En MN d'animals SOD1^{G93A} s'ha detectat colocalització de dineïna citoplasmàtica amb agregats de SOD1 (Ligon et al., 2005) observant-se un transport retrògrad defectiu. Així mateix, en pacients amb una forma de ELA familiar de progressió lenta, s'han descrit mutacions en el gen de la dinactina (Puls et al., 2003; Munch et al., 2004).

1.5.6 Neuroinflamació

La microglia són les cèl·lules immunitàries del SNC, dotades d'una gran capacitat fagocítica i migratòria. En el teixit nerviós adult, la microglia es troba en estat quiescent, presentant un cos cel·lular petit, moltes ramificacions fines i una baixa expressió d'antígens de superfície (Garden i Möller, 2006). El fenomen neuroinflamatori apareix quan una lesió desencadena l'activació ràpida de les cèl·lules de la microglia, que adopten el fenotip de cèl·lules citotòxiques, alliberant diversos factors com glutamat, òxid nítric, ROS, citoquines proinflamàtores i prostaglandines. Aquesta transformació és evident morfològicament, passant d'un estat ramificat a un estat ameboide (Perry, 2004). La microglia activada exerceix els seus efectes sobre les MN, però alhora també, sobre els astròcits i els oligodendròcits. L'activació microglial, però, pot induir tan regeneració com dany neuronal. Amb l'alliberació de citoquines anti-inflamatòries, neurotrofines i factors de creixement, així com amb l'eliminació d'axons i neurones malmeses, la microglia indueix la reparació neuronal. En canvi, amb l'alliberació de citoquines proinflamàtores, proteases lisosomals, ROS i via activació astrogliàl i fagocitosi crònica, la microglia pot induir dany neuronal (Banati et al., 1993).

Estudis amb mostres *post mortem* de cervell i medul·la espinal de pacients amb ELA han detectat activació i proliferació de cèl·lules microglials i astroglials hipertròfiques en les àrees afectades per la

malaltia (Turner et al., 2004; Kawamata et al., 1992). Aquest fenomen també s'ha detectat en els models murins transgènics abans de l'aparició dels primers símptomes i durant tot el curs de la malaltia (Bruijn et al., 1997a; Hall et al., 1998b). Els factors alliberats per la microglia afecten directament els astròcits, produint una disminució de l'expressió de factors neurotròfics per part d'aquestes cèl·lules i promovent, en canvi, l'alliberació de nous factors neuroinflamatoris que reforcen l'activació de la microglia, creant un cicle potencialment letal (Dong i Benveniste, 2001) (Figura I-13).

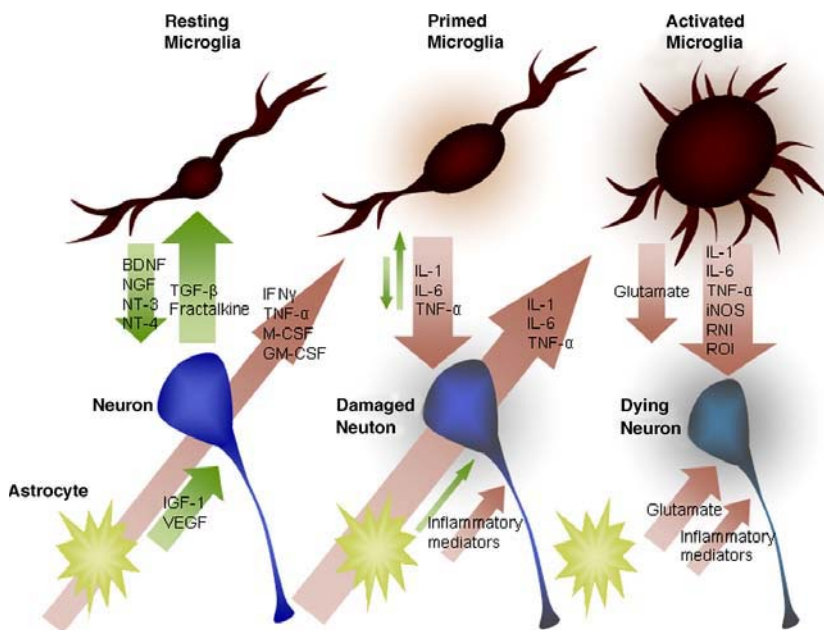


Figura I-13. Interacció neuroinflamatòria entre microglia, astròcits i neurones.

En resposta a un estímul inicial, desconegut en la ELA, la microglia comença a produir citocines proinflamatòries i a regular a la baixa l'expressió de factors de creixement, afectant tan MN com astròcits. En resposta a un segon estímul, en aquest cas astrocitari, la microglia esdevé completament activa. Aquestes cèl·lules produeixen quantitats creixents de citocines proinflamatòries, RNI (*reactive nitrating intermediates*), ROI (*reactive oxygenating intermediates*) i glutamat. Els astròcits disminueixen l'expressió de factors de creixement i alliberen també glutamat i factors inflamatoris. Les MN, envoltades d'aquestes senyals citotòxiques, acaben degenerant (Nguyen et al., 2001b).

Tan en pacients com en animals mSOD1 es dona una sobreexpressió de citokines proinflamatòries (TNF α , *tumor necrosis factor alpha*), interleuquines (IL-1 β , IL-6), prostaglandines (PGE₂), ROS i ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Nguyen et al., 2001b; Yasojima et al., 2001). També s'han detectat nivells anormalment elevats de citokines proinflamatòries com la MCP-1 α (*monocyte chemoattractant protein 1 alpha*) i el MCSF (*monocyte colony stimulating factor*) o proteïnes del complement com C3c, en plasma i LCR de pacients amb ELA (Simpson et al., 2004; Goldknopf et al., 2006).

COX-2, produïda en abundància per la microglia, és un enzim crucial en la producció de prostaglandines i juga un paper important en la neuroinflamació. En mostres *post mortem* de pacients amb ELA i en ratolins mSOD1 s'han detectat nivells elevats de mRNA i proteïna COX-2 així com també de PGE₂, un dels seus productes (Almer et al., 2001). L'ús de l'inhibidor de la COX-2, celecoxib, en els models animals de la malaltia retarda l'inici dels símptomes i augmenta la supervivència (Drachman et al., 2002), disminuint també els nivells de PGE₂. Malgrat això, cap dels inhibidors de COX provats han estat eficaços en els pacients amb ELA (Cudkovicz et al., 2006). Una altra citokina particularment interessant i regulada a l'alça en ratolins SOD1^{G93A}, és el TNF α (Weydt et al., 2004). L'administració del seu antagonista comporta un lleuger augment de l'esperança de vida d'aquests animals (West et al., 2004).

Per altra banda, s'ha observat en els models animals de ELA i en cultius mixtes de MN i cèl·lules microgials que, mSOD1, actuant extracel·lularment o formant agregats a l'interior de la microglia, és un potent activador de la resposta inflamatòria, promovent l'activació de les cèl·lules microgials i incrementant la seva neurotoxicitat (Beers et al., 2006; Harraz et al., 2008; Zhao et al., 2010).

Tot i que la participació dels processos de neuroinflamació en la patologia de la ELA és clara, encara es desconeix si són una causa primària o una conseqüència de la neurodegeneració.

1.5.7 Autoimmunitat

Diversos estudis han suggerit el paper d'un possible mecanisme autoimmunitat en la patogènia de la ELA (Appel et al., 1991; Smith et al., 1996; Haggstrom et al., 1997), tot i que les proves que li donen suport no són del tot concloents. Moltes de les característiques pròpies de les malalties autoimmunes no han estat trobades en la ELA, com l'associació amb tipus d'histocompatibilitat o la millora terapèutica enfront tractaments immunosupressors (Brown et al., 1986; Drachman et al., 1994).

S'ha descrit, però, l'existència d'anticossos circulants contra canals de Ca^{2+} dependents de voltatge (VGCCs, *voltage-gated calcium channel*) en el sèrum de pacients amb ELA esporàdica (Appel et al., 1995). Aquests anticossos provoquen l'entrada de Ca^{2+} per activació dels VGCCs en MN en cultiu, facilitant la degeneració i mort de les cèl·lules per fenòmens d'excitotoxicitat. Alhora, la transferència passiva d'aquests anticossos a ratolins, altera l'homeòstasi intracel·lular dels Ca^{2+} i produeix canvis estructurals en les MN d'aquests animals (Engelhardt et al., 1995; Engelhardt et al., 1997). S'ha comprovat també que aquests anticossos anti-VGCCs són citotòxics per la línia cel·lular híbrida de MN VSC4.1, de forma Ca^{2+} extracel·lular-dependent. La citotoxicitat desapareix preincubant els anticossos amb antagonistes dels VGCCs o amb subunitats aïllades dels VGCCs (Smith et al., 1994).

Així mateix, s'han detectat anticossos contra antígens motoneuronals en el sèrum i LCR de pacients amb ELA, identificats com anticossos anti-gangliòsids GM1 i GM1a (Pestronk et al., 1988; Niebroj-Dobosz et

al., 1999; Mizutani et al., 2003). Els gangliòsids són glucoesfingolípidis que contenen àcid siàlic, presents en elevada concentració a les membranes de les neurones, tan en substància blanca com gris, i preferentment distribuïts en terminals nerviosos (Marconi et al., 2005). Es desconeix encara el significat de la presència d'anticossos contra aquest antigen, ja que no es troben sempre en el sèrum de pacients amb ELA i, alhora, també es troben en el sèrum de pacients amb altres malalties neurològiques (Lamb i Patten, 1991; Gallardo et al., 2001). Diversos estudis han descrit la presència d'altres anticossos en sèrum de pacients amb ELA, tan esporàdica com familiar: anticossos contra sulfoglucuronil paraglobòsid (Ben Younes-Chennoufi et al., 1995), contra l'acetilcolinesterasa d'eritròcits (Haggstrom et al., 1997), contra el receptor d'ACh (Okuyama et al., 1997), contra NF (Couratier et al., 1998) i contra Fas (Sengun i Appel, 2003). La citotoxicitat del sèrum de pacients amb ELA contra eritròcits ha estat confirmada (Conradi i Ronnevi, 1985) així com la presència d'immunoglobulines contra eritròcits en la saliva d'aquests pacients (Conradi et al., 1990). Aquestes troballes, però, no han estat relacionades amb la progressió de la malaltia, el sexe o l'edat dels pacients.

En els últims treballs publicats, s'ha descrit que la injecció intraperitoneal d'immunoglobulines G (IgG) de pacients amb ELA en ratolins, produeix la degeneració de les MN d'aquests animals, acompanyada d'un increment en la concentració intracel·lular de Ca^{2+} (Pullen et al., 2004; Pagani et al., 2006). Al cap de 24 h de la injecció, les IgG eren trobades en el SNC dels ratolins, a l'alçada dels axons terminals de la segona MN, localitzades més concretament en els microtúbuls i en el RE rugós (Engelhardt et al., 2005). La injecció d'aquestes IgG en unió neuromuscular de ratolins produïa alteracions en la plasticitat sinàptica dels terminals nerviosos (Fratantoni et al., 2000). El significat de la presència d'aquests anticossos és encara desconeguda i lamentablement, els assajos clínics realitzats amb

teràpia immunosupressora no s'han mostrat eficaços en el tractament de la ELA.

1.6 Diagnòstic de la malaltia

En absència d'un test diagnòstic definitiu, la diagnosi de la ELA es realitza amb la clínica, basant-se principalment en la detecció de signes i símptomes de deteriorament de les MN superiors i inferiors. Els criteris formals per al diagnòstic de la ELA es van definir l'any 1994, amb l'acceptació del criteri de El Escorial (Brooks, 1994). Aquest criteri, especifica els graus de certesa diagnòstica en relació a l'extensió de la malaltia (Figura I-14). Fins ara, s'han definit 4 regions en el SNC a tenir en compte: tronc de l'encèfal, regió cervical, regió toràctica i regió lumbosacra. Els símptomes motors que normalment s'avaluen són la debilitat i atrofia muscular, l'espasticitat (contracció permanent de la musculatura) i la hiperreflexia, els quals empitjoren progressivament durant el curs de la malaltia.

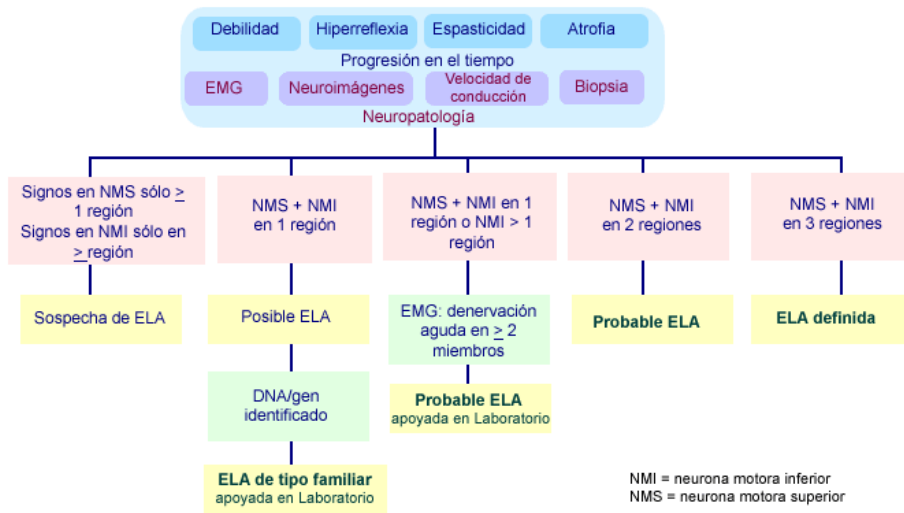


Figura I-14. Criteris de El Escorial per al diagnòstic de la ELA. EMG, electromiografia (adaptat de Brooks, 1994).

Les proves a les que normalment son sotmesos els pacients són la electromiografia (EGM), la qual detectarà les alteracions motores causades per la degeneració de les motoneurons inferiors, la ressonància magnètica i l'assaig de velocitat de conducció dels nervis. D'acord amb els resultats d'aquestes proves es poden realitzar exàmens d'orina i sang per descartar altres malalties, així com també una biòpsia muscular.

La ELA clínicament definida és aquella que presenta alhora signes d'alteració en MN superiors i inferiors en 3 de les regions abans esmentades.

1.7 Tractament de la ELA i estratègies terapèutiques

En aquest moment, no existeix encara cap tractament farmacològic efectiu en la ELA. El Riluzol, bloquejant de la transmissió glutamatèrgica (veure secció 1.5.1 de la introducció), es l'únic fàrmac aprovat per la FDA (*Food and Drug Administration*) en el tractament de la malaltia. Malgrat tot, la seva eficàcia és limitada donat que no millora la funció muscular i tan sols retarda la progressió de la malaltia en uns mesos.

Els últims estudis en teràpia gènica per al tractament de la ELA familiar, deguda a mutacions en el gen de la SOD1, estan provant la viabilitat de l'ús de nucleòtids antisentit (Smith et al., 2006) o RNA d'interferència per aquesta proteïna (Raoul et al., 2005) en els models animals transgènics mSOD1. La viabilitat de l'administració intratecal de nucleòtids antisentit en aquests animals ha estat demostrada i els assajos clínics segueixen en curs.

En el cas de la ELA de tipus esporàdica s'estan duent a terme un gran nombre d'assajos clínics. Entre d'altres, s'ha demostrat que l'administració intracerebroventricular de VEGF en ratolins mSOD1 retarda l'aparició dels primers símptomes i allarga la vida mitja d'aquests animals (Azzouz et al., 2004; Storkebaum et al., 2005).

Altament, s'estan provant fàrmacs amb propietats anti-excitotòxiques. El Talampanel, un antagonista dels AMPARs, està actualment en la fase III dels assajos clínics i la ceftriaxona, un fàrmac que augmenta l'expressió de EAAT2 i la supervivència dels animals mSOD1 (Rothstein et al., 2005), està sent investigada ja en humans (Van Damme i Robberecht, 2009). En un altre estudi s'ha observat que el liti retarda la degeneració de MN en ratolins mSOD1 i incrementa la supervivència en pacients amb ALS (Fornai et al., 2008), tot i això, la publicació de diversos treballs amb resultats contraris fan dubtar de la veritable eficàcia del liti.

Molts dels assajos terapèutics realitzats en els últims anys han tingut resultats negatius. La gran majoria dels compostos analitzats són efectius en els models animals mSOD1, però ineficaços en humans, i aquest fet ha generat una discussió sobre si els models animals transgènics són una eina útil en l'estudi de tractaments per la ELA esporàdica. En els últims anys, la troballa de mutacions en TDP-43 i agregats d'aquesta proteïna en casos de ELA esporàdica, però no en els models animals mSOD1, ha despertat la necessitat de generar nous models transgènics TDP-43.

2. El receptor de glutamat de tipus NMDA

El glutamat és el principal NT excitador del SNC i els seus receptors tenen un paper vital en la regulació de la transmissió sinàptica excitadora.

Els NMDARs són canals de membrana de Ca^{2+} , pertanyents a la família dels receptors ionotròpics de glutamat, que juguen un paper clau en el desenvolupament neural i en els processos relacionats amb la plasticitat sinàptica, potenciació a llarg termini (LTP o *Long-term potentiation*), aprenentatge i memòria (Asztely et al., 1996). Alhora, l'alteració dels NMDARs pot activar vies de mort cel·lular en una gran

varietat de desordres neurològics com serien l'epilèpsia, el dany isquèmic cerebral, el Parkinson, l'Alzheimer, la Corea de Huntington o la ELA.

Els receptors de glutamat es poden dividir en ionotròpics (associats a canals permeables a ions) i metabotròpics (associats a proteïnes G). Aquests últims, no condueixen corrent directament sinó que, a través de senyals a la proteïna fosfolipasa C, alliberen Ca^{2+} dels reservoris intracel·lulars, o, a través d'adenilat ciclasa, modulen altres canals iònics i vies bioquímiques intracel·lulars (De Blasi et al., 2001).

2.1 Receptors ionotròpics de glutamat

Els receptors ionotròpics són canals iònics que s'obren per unió a lligand, en aquest cas a glutamat, permetent l'entrada d'ions carregats com són el Na^+ i el Ca^{2+} a través del porus situat al centre del complex del receptor. Aquest flux d'ions dona com a resultat la despolarització de la membrana plasmàtica i la generació d'un potencial d'acció que és propagat al llarg de l'axó. Els receptors ionotròpics de glutamat són complexos formats per 4 o 5 subunitats, classificats en 3 grups segons les seves característiques estructurals i morfològiques, i l'agonista al qual responen: NMDA, AMPA i Kainat (Figura 1-15). Aquests receptors tenen en comú una permeabilitat substancial a Na^+ i K^+ , i una permeabilitat variable a Ca^{2+} .

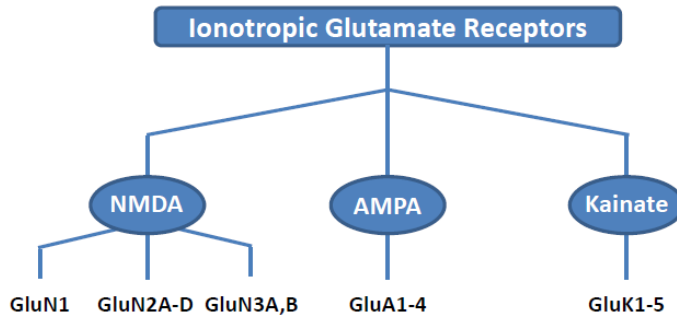


Figura I-15. Classificació dels receptors ionotròpics de glutamat amb la nomenclatura més recent acceptada per la IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology*)(adaptat de Collingridge et al., 2009).

Els AMPARs són els receptors de glutamat més abundants en les MN i estan relacionats amb la transmissió excitadora ràpida, mentre que els NMDARs estan implicats en la transmissió excitadora a llarg termini. Els receptors de Kainat, involucrats en processos de plasticitat sinàptica, comparteixen agonista amb els AMPA, agrupant-los sovint com una mateixa entitat anomenada "receptors AMPA/Kainat" o receptors "no NMDA" (Bigge, 1999).

En adults, la subunitat GluN1 del NMDAR s'expressa de forma ubíqua per tot el SNC. GluN2A s'expressa predominantment en cervell, GluN2B es troba restringit al prosencèfal, GluN2C al cerebel i GluN2D a petits grups de cèl·lules en regions específiques del cervell (Kohr, 2006). L'expressió de NR3A i NR3B disminueix dràsticament en adults i es localitza selectivament al tàlem, l'amígdala i el nucli del tracte olfactori lateral (Low i Wee, 2010).

2.2 Estructura del receptor de NMDA

Els NMDARs són tetràmers heteròmers formats per l'assemblatge de dues subunitats GluN1 i dues GluN2. GluN1 és un component essencial dintre del complex del NMDAR, i pot interactuar amb qualsevol dels 4

tipus de subunitats GluN2 (GluN2A-D), les quals són producte de 4 gens diferents. Les combinacions d'ambdues subunitats donen lloc a un gran nombre de NMDARs amb diferents propietats biològiques i farmacològiques.

A més de la variabilitat donada per l'ús de diferents subunitats GluN2, existeixen múltiples variants d'empalmament de la subunitat GluN1 (Figura I-16). Hi ha dues regions en l'mRNA de GluN1 on es pot dur a terme aquest empalmament: en l'exó 5 del domini N-terminal i en els exons 21 i 22 del domini C-terminal.

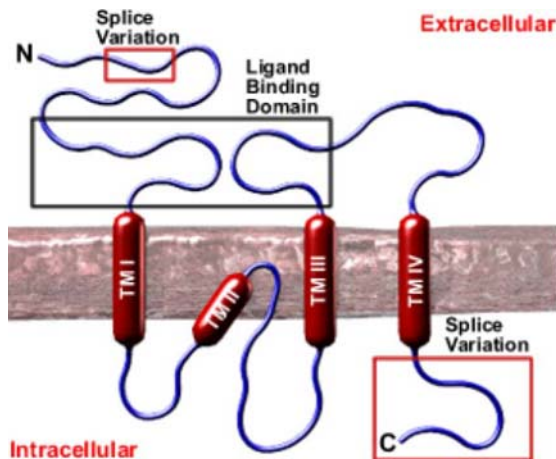


Figura I-16. Estructura de la subunitat GluN1 del NMDAR. GluN1 consta d'un domini N-terminal extracel·lular seguit d'una llarga nansa que correspon al domini d'unió a lligand, quatre segments transmembrana (TM I-IV) i un domini curt C-terminal intracel·lular. Es mostren les regions sotmeses a variacions d'empalmament alternatiu (fins a vuit variants).

Aquestes variants d'empalmament són importants en la regulació de les interaccions intracel·lulars del receptor amb altres proteïnes, com la PSD-95, encarregada de l'acoblament del NMDAR amb l'òxid nítric sintasa neuronal (Dingledine et al., 1999).

Per a l'activació del NMDAR, apart del glutamat, es necessita un coagonista, la glicina. El lloc d'unió per als dos neurotransmissors es troba en diferents subunitats, la glicina s'uneix a GluN1 mentre que el glutamat ho fa a GluN2. La subunitat GluN2 posseeix també un lloc

d'unió a poliamines, molècules reguladores que modulen el funcionament del NMDAR.

Totes les subunitats del receptor comparteixen una estructura bàsica comuna (Figura I-16) (Wollmuth i Sobolevsky, 2004):

- 1) Un domini N-terminal de 350 aminoàcids, lloc d'unió de diversos moduladors alostèrics del receptor com el Zn^{2+} , H^+ i les poliamines espermina i espermidina.
- 2) Un domini d'unió a lligand, format per una *nansa* llarg entre el domini N-terminal i el primer segment transmembrana (TMI) i una *nansa* extracel·lular entre els segments TMIII i TMIV.
- 3) Quatre regions hidrofòbiques transmembrana (TMI-TMIV) a la regió central de la seqüència.
- 4) Un domini C-terminal on s'uneixen proteïnes intermediàries d'unió al citoesquelet, proteínquineses, proteínfosfatases i altres molècules intermediàries en la regulació de vies de senyalització intracel·lular.

2.3 Activació del receptor de NMDA

A potencials de membrana en repòs, els NMDARs es troben inactius. Aquest fet ve donat per un bloqueig voltatge-dependent del porus del receptor amb ions Mg^{2+} . Quan la membrana plasmàtica es despolaritza, el Mg^{2+} es alliberat del complex del receptor i, per l'acció dels coagonistes glutamat i glicina, es produeix un canvi conformacional del canal, permetent l'entrada de Ca^{2+} i Na^+ a l'interior de la cèl·lula i la sortida de K^+ (Mayer i Westbrook, 1987). El canal associat al NMDAR presenta una major permeabilitat a Ca^{2+} que els associats a receptors AMPA i Kainat, així com una cinètica d'activació-inactivació més lenta (Forsythe i Westbrook, 1988).

El receptor té una sèrie d'agonistes, moduladors al·lostèrics i fàrmacs que poden regular la seva activitat (Figura I-17).

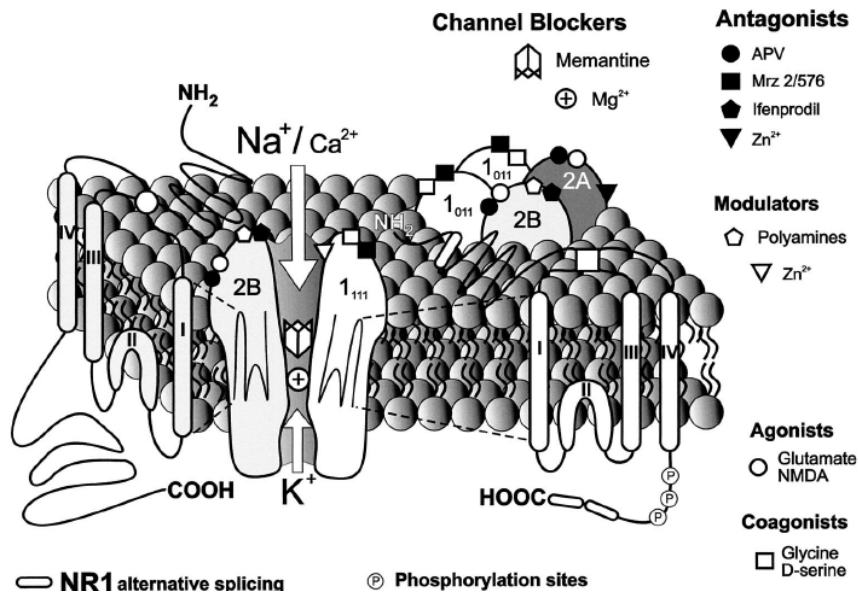


Figura I-17. Representació esquemàtica de l'estructura del NMDAR i la seva farmacologia. El Zn^{2+} extracel·lular pot actuar com un modulador al·lostèric negatiu del canal o, alhora, com un antagonista selectiu dels NMDARs que contenen la subunitat GluN2A. Les poliamines, en canvi, actuen com a moduladors positius, tot i que, a altes concentracions, poden bloquejar el NMDAR. L'APV (2-amino-5-phosphovalerate) i el Mrz 2/576 actuen com antagonistes competitius, mentre que l'ifenprodil és un antagonista selectiu dels NMDARs que contenen la subunitat GluN2B. El Mg^{2+} , la memantina, i també l'MK-801 actuen com a bloquejadors del canal. L'NMDAR pot ser modulats també per agents redox oxidants, protons extracel·lulars i pH (Danysz i Parsons, 1998).

2.4 Funcions del receptor de NMDA

Com ja hem comentat anteriorment, els NMDARs tenen un paper essencial en els processos de plasticitat sinàptica però també en el desenvolupament del SNC i la transmissió de la senyal excitadora (Bliss i Collingridge, 1993). La sobre-estimulació dels NMDARs, però, també pot causar mort cel·lular deguda a excitotoxicitat per Ca^{2+} , en certes

condicions patològiques (Lipton i Rosenberg, 1994). Així, els NMDARs tindrien un efecte dual, amb la capacitat d'actuar en vies de senyalització que promouen la supervivència o la mort neuronal.

En condicions fisiològiques normals, els NMDARs activen diverses vies de senyalització intracel·lular, essencials per la supervivència neuronal, com serien les vies de les MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*) i la de l'òxid nítric (NO o *nitric oxide*).

2.4.1 Vies de senyalització de les MAPKs

Les MAPK són proteínquineses que regulen diverses activitats cel·lulars com serien l'expressió de gens promotors de la plasticitat sinàptica, la mitosi, la diferenciació cel·lular, la supervivència i l'apoptosi. L'activació del NMDAR i l'estimulació elèctrica ràpida indueixen la fosforilació de les MAPKs activant-les (Haddad, 2005).

L'entrada de Ca^{2+} a través del NMDAR provoca la generació d'AMP cíclic (cAMP) i l'activació de la proteïna quinasa A (PKA) que fosforila les MAPKs ERK1 o $\text{MAPK}^{\text{ERK1/p44}}$ (*extracellular signal-regulated kinase1*) i ERK2 o $\text{MAPK}^{\text{ERK2/p42}}$. Aquestes actuen sobre els seus factors de transcripció diana, Elk-1 i CREB (*cAMP-response element-binding protein*), entre d'altres, activant-los, amb la subseqüent transcripció dels gens associats a plasticitat sinàptica (Vossler et al., 1997; Abel et al., 1997). Un estudi més recent, descriu una ruta alternativa d'activació de les MAPKs via el proto-oncogen Ras (Sweatt, 2001)(Figura I-18).

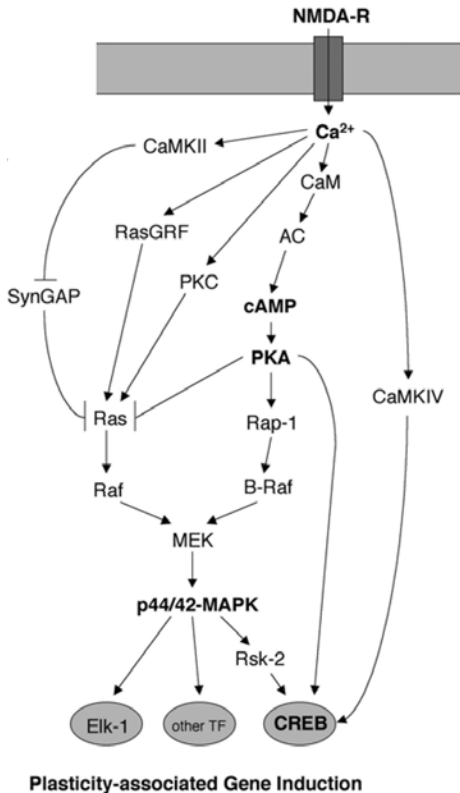


Figura I-18. Vies de senyalització de la transcripció de gens associats a plasticitat activades per l'entrada de Ca^{2+} a través del NMDAR. AC, adenylate cyclase; CaM, calmodulin; CaMKII i CaMKIV, Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II i IV; cAMP, cyclic AMP; CREB, cAMP-response element-binding protein; MEK, MAPK/ERK kinase; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; Rap-1, Ras-related protein 1; RasGRF, Ras protein-specific guanine nucleotide-realising factor; Rsk-2, p90 ribosomal S6 protein kinase 2; SynGAP, synaptic Ras-GTPase activating protein (Waltreit i Weller, 2003).

2.4.2 Via de senyalització de l'òxid nítric

El NO és un gas incolor i poc soluble en aigua produït en petites quantitats en mamífers, on actua com a missatger biològic. Es caracteritza per una vida mitja curta i la capacitat de difondre lliurement per membranes cel·lulars. El NO es sintetitza en diferents tipus cel·lulars a partir de l'extrem N-terminal de l'aminoàcid L-arginina, formant-se també L-citrulina (Nathan, 1992). Aquesta reacció es catalitzada per la NO sintasa (NOS).

En el cervell, l'entrada de Ca^{2+} a través dels NMDARs estimula l'acció de la NOS neuronal o NOS de tipus 1 (nNOS o NOS1). Aquesta estimulació és possible gràcies a la colocalització del NMDAR i la nNOS a través de la PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*) que, gràcies a la calmodulina (CaM), assegura que el Ca^{2+} que entra pel canal del

receptor sigui selectivament acoblat a la nNOS (Aoki et al., 1997; Brenman et al., 1996)(Figura I-19).

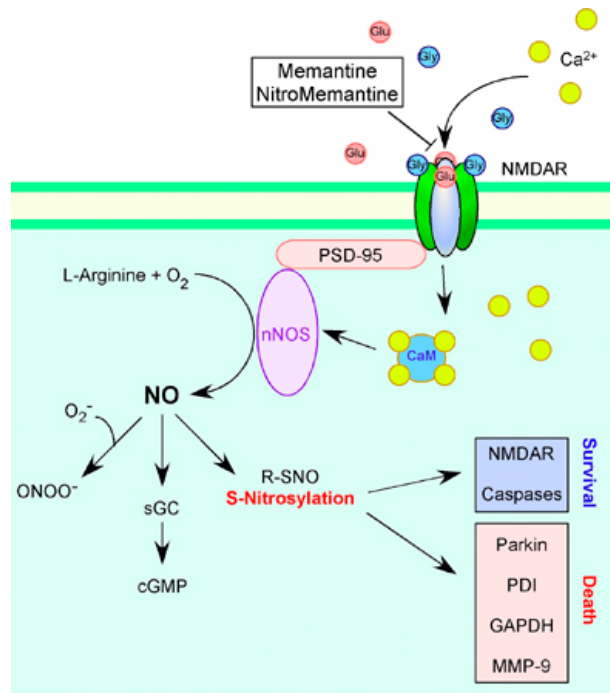


Figura I-19. Activació de la nNOS per l'influx de Ca²⁺ a través del NMDAR i producció de NO. El NO activa la guanilat ciclasa soluble (sGC) per produir GMP cíclic (cGMP). L'activitat excessiva del NMDAR duu a una sobreproducció de NO que pot ser neurotòxica. La S-nitrosilació de proteïnes com Parkina (una E3 ubiquïtina lligasa), PDI (*protein disulfide isomerasa*), GAPDH o la metaloproteïna MMP-9 contribueix al dany i la mort neuronal. Els efectes neurotòxics del NO també poden ser deguts al ONOO⁻. Alternativament, la S-nitrosilació també pot tenir efectes neuroprotectors per la cèl·lula, inhibint l'activitat de les caspases o prevenint la sobreactivació dels NMDARs (Nakamura i Lipton, 2007).

El NO produït per l'activació del NMDAR s'ha vist implicat en nombroses funcions tals com la supressió de les descàrregues reflexes dels sistema simpàtic perifèric o la vasodilatació cerebral (Meng et al., 1995), però també en la producció de radicals lliures lligada a la mort neuronal per excitotoxicitat per glutamat (Montoliu et al., 2001).

3. Les semaforines

Les semaforines, també anomenades colapsines, són una família de glicoproteïnes, secretades o associades a membrana, identificades inicialment en el sistema nerviós com molècules inhibidores del creixement axonal (Kolodkin et al., 1993). Posteriorment es va descriure que les semaforines incloïen membres amb activitat quimiorrepulsiva i quimioattractant, involucrats en la regulació de processos com la migració cel·lular, la guia del conus de creixement de l'axó, la sinaptogènesi, la densitat i maduració de les espines dendrítiques (Tran et al., 2007).

Les semaforines estan dividides en 8 subfamílies en base a l'organització dels seus motius estructurals i l'origen de l'espècie on van ser descrites (Figura I-20). Les classes 1 i 2 pertanyen a invertebrats, les classes 3-7 a mamífers i la classe 8, també anomenada V, correspon a les semaforines virals.

Les plexines, proteïnes transmembrana de tipus 1 amb un domini citoplasmàtic amb homologia Ras GAPs (*GTPase-activating proteins*) altament conservat, actuen com a molècules receptors de les semaforines (Winberg et al., 1998). Les plexines poden interactuar tan amb les semaforines presents en cèl·lules adjacents com amb les que es troben en forma soluble. Tan sols la classe 3 de semaforines requereixen de les neuropilines, proteïnes transmembrana amb dominis intracel·lulars curts sense activitat enzimàtica, com a co-receptors per a la senyalització a través de plexines (Kolodkin et al., 1997).

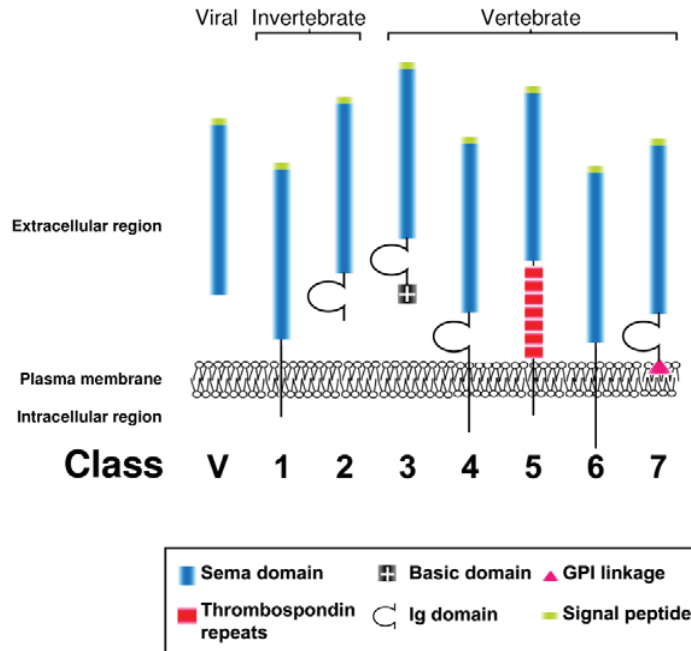


Figura I-20. Família de proteïnes de les semaforines. Totes les semaforines contenen un domini d'uns 500 aminoàcids, a l'extrem N-terminal, anomenat domini Sema, seguit en algunes classes, per un domini immunoglobulina (Ig). Les classes V, 2 i 3 són secretades, mentre que la resta estan unides a la superfície cel·lular per un domini transmembrana o un domini d'ancoratge GPI (*glycosylphosphatidylinositol*). La classe 5 conté un domini de repeticions de tromboespondina i la classe 3 un domini C-terminal bàsic (Eickholt, 2008).

Dintre de les semaforines, la classe 3 ha estat una de les més estudiades i la isoforma Sema3A, relacionada amb el col·lapse del conus de creixement de l'axó, la quimiorepulsió i l'apoptosi neuronal, ha estat examinada en detall. La classe 3 es sintetitza majoritàriament com a precursors proteics inactius que requereixen un processament proteolític. Els resultats del procés proteolític són diferents isoformes que difereixen en la seva activitat repulsiva depenent del tall realitzat. Si el tall es realitza a l'extrem C-terminal s'augmenta l'activitat repulsiva, però si el tall es produeix dins el domini Sema, la seva activitat queda inhibida (Adams et al., 1997). Sema3A és un potent

inhibidor del creixement dels axons del gangli raquidi embrionari (Luo et al., 1993), dels ganglis simpàtics (Koppel et al., 1997) i de les MN espinals (Varela-Echavarría et al., 1997). In vitro, Sema3A repel·leix axons hipocampals (Chetodal et al., 1998) i projeccions axonals corticals (Polleux et al., 1998). Més recentment s'ha relacionat l'acció de Sema3A en la patogènesi de malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer i la ELA. S'ha detectat una alteració en la senyalització de Sema3A en malalts d'Alzheimer que provoca la seva internalització en neurones hipocampals promovent la degeneració d'aquestes cèl·lules (Good et al., 2004). A més, en models animals de ELA SOD1^{G93A} s'ha descrit una sobreexpressió de Sema3A en cèl·lules Schwann terminals a nivell de la unió neuromuscular, provocant la retracció de l'axó i la degeneració de les MN (De Winter et al., 2006).

OBJECTIUS

La ELA és una malaltia neurodegenerativa complexa i de pronòstic fatal que afecta selectivament les MN de la banya ventral de la medulla espinal, del còrtex cerebral i del tronc de l'encèfal. Tot i que s'han descrit diversos mecanismes patològics, no excloents entre ells, implicats en la progressió de la ELA, els factors determinants de l'inici de la patologia són, avui dia, encara desconeguts.

Per una banda, molts treballs evidencien la presència d'alteracions degudes a excitotoxicitat per glutamat en els teixits afectats per la malaltia, tan en pacients amb ELA de tipus esporàdica com familiar, així com també, en els models animals transgènics. Alhora, la implicació dels receptors ionotròpics de glutamat en els processos d'excitotoxicitat que duen a la degeneració de les MN en la ELA, ha estat també clarament observada en diversos estudis (secció 1.5.1 de la introducció). Per altra banda, tan la detecció de diferents tipus d'autoanticossos en sèrums de pacients amb ELA, com la toxicitat exercida per les IgG de malalts sobre les MN, l'homeòstasi del Ca^{2+} i els processos de plasticitat sinàptica, observada en experiments *in vivo* i *in vitro*, donen suport a la hipòtesi de la implicació d'un mecanisme de tipus autoimmune en la patogènia de la ELA (secció 1.5.7 de la introducció).

Tenint en compte aquests antecedents, en la primera part d'aquest estudi s'ha analitzat l'acció directa del sèrum ELA sobre el receptor de glutamat de tipus NMDA. Així mateix, en la segona part de l'estudi, i amb col·laboració amb un treball iniciat al Departament de Neurobiologia Cel·lular de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida-IRBLLLEIDA, s'ha dissenyat un assaig d'ELISA per la detecció d'autoanticossos circulants contra Semaforina 3A en sèrums ELA.

Per dur a terme aquest estudi es van plantejar els següents objectius específics:

OBJECTIU 1. Avaluar l' efecte dels sèrums patològics ELA sobre el receptor de glutamat de tipus NMDA GluN1/GluN2A expressat en oòcits de *Xenopus laevis*.

- Explorar i caracteritzar l'efecte dels sèrums humans control i patològics sobre oòcits de *Xenopus* injectats amb aigua DEPC o amb el cRNA del NMDAR.
- Avaluat l'acció de la fracció de IgG de sèrums humans control i patològics sobre oòcits de *Xenopus* injectats amb aigua DEPC o amb el cRNA del NMDAR.
- Mesurar l'efecte del sèrum de rates transgèniques mSOD1 G93A en oòcits de *Xenopus* injectats amb aigua DEPC o amb el cRNA del NMDAR.

OBJECTIU 2. Detectar la possible presència d'autoanticossos circulants en sèrums patològics ELA.

- Establir un protocol d'ELISA per detectar la unió d'anticossos circulants en sèrums control i patològics a pèptids comercials de Sema3A.
- Detectar la presència d'autoanticossos circulants contra proteïna Sema3A recombinant en sèrums control i patològics.

MATERIALS I MÈTODES

1. Obtenció i preparació de les mostres de sèrum

1.1. Mostres de sèrum humà control i patològic

En col·laboració amb el Banc de Sang i Teixits de L'Hospital Universitari de Bellvitge (HUB) es van obtenir mostres de sang provinents de 14 subjectes, 7 homes i 7 dones, en un rang d'edat entre els 20 i els 68 anys, i sense cap tipus d'afectació neurològica coneguda, que van ser utilitzades com a mostres control. Les mostres de sang es van recollir en tubs de vidre sense cap tipus d'agent anticoagulant i es van deixar a temperatura ambient durant 1h. Després es van centrifugar durant 15 min a 1000 g per tal d'obtenir-ne el sèrum.

Les mostres de sèrum provinents de pacients diagnosticats clínicament amb ELA de tipus esporàdica, seguint els criteris de El Escorial (Brooks, 1994), van ser cedides per la Dra. Mònica Povedano del Departament de Neurologia del HUB-IDIBELL. El procés d'extracció de la sang i obtenció del sèrum es va realitzar d'acord amb la normativa del comitè ètic del HUB i amb el previ consentiment dels pacients. Es van obtenir mostres de sèrum de 14 pacients d'ELA, 5 dones i 9 homes, en un rang d'edat entre els 47 i els 75 anys, i amb una durada mitja de la malaltia de 3 anys i 6 mesos. 10 d'aquests pacients van tenir un inici de la malaltia de tipus espinal, 2 d'ells un inici de tipus bulbar i en els 2 casos restants es desconeixia el tipus d'inici dels símptomes. Els pacients estaven tractats amb Riluzol.

Les dades clíniques dels pacients es troben resumides a la Taula M-1.

Taula M-1. Característiques clíniques dels pacients amb ELA esporàdica utilitzats en l'estudi.

Sporadic ALS patients	Male/Female	Age of onset (years)	Site of onset	Survival (years)	Treatment
ALS 1	Female	57	Limb	4.3	Riluzole
ALS 2	Male	63	Limb	5.2	Riluzole
ALS 3	Female	n/a	n/a	n/a	n/a
ALS 4	Male	69	Limb	7	Riluzole
ALS 5	Male	64	Limb	1.8	Riluzole
ALS 6	Male	57	Limb	2.7	Riluzole
ALS 7	Female	75	Bulbar	2.6	Riluzole
ALS 8	Male	47	Limb	2.3	Riluzole
ALS 9	Male	49	Limb	4.2	Riluzole
ALS 10	Female	n/a	n/a	n/a	n/a
ALS 11	Male	54	Limb	2.4	Riluzole
ALS 12	Male	67	Limb	2	Riluzole
ALS13	Male	56	Limb	6.9	Riluzole
ALS14	Female	57	Bulbar	2.3	Riluzole

n/a, not available

A través de la Unitat de Neurobiologia Cel·lular de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida-IRBLLEIDA es van obtenir mostres de sèrum de pacients amb altres malalties de tipus neuromuscular. Aquestes mostres van ser inicialment cedides per la Dra. Isabel Illa del Servei de Neurologia de L'Hospital de Sant Pau de Barcelona. Les mostres van ser obtingudes d'1 pacient amb Miastènia Gravis (MG), 1 pacient amb Paràlisi Bulbar Progressiva (PBP) i 4 pacients amb *Lower Motoneuron Disease* (LMND) i van ser utilitzades com a mostres control de malaltia.

Totes les mostres de sèrum es van sotmetre a un xoc tèrmic de 56°C durant 30 min per tal d'inactivar el sistema del complement i es van dialitzar amb membranes de diàlisi *Dialysis Tubing Cellulose Membrane* (D9527, Sigma, St. Louis, MO, USA). 1 ml de cada mostra es va dialitzar durant 24h a 4°C, contra 2 l de sèrum fisiològic al 0.9% (NaCl 9 g/l) i amb 3 canvis de solució, de 2 l cadascun, per tal d'eliminar el glutamat i totes les molècules més petites de 12000 Da.

Finalment, les mostres de sèrum van ser aliquotades i emmagatzemades a -80°C fins al seu ús.

1.2. Mostres de sèrum del model de rata transgènica mSOD1 G93A

Les mostres de sèrum del model animal de la malaltia van ser cedides per la Dra. Anna Casanovas del Departament de Neurobiologia Cel·lular de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida-IRBLLLEIDA. Es van obtenir mostres de sèrum de rates mascles i femelles de la soca Sprague-Dawley amb l'insert NTac: SD-TgN (SOD1 G93A) (Taconic Farms, Germantown, NY, USA). Les mostres de sèrum control es van obtenir de rates Sprague-Dawley WT del mateix fons genètic (Taconic Farms, Germantown, NY, USA).

El curs temporal de la progressió de la malaltia que desenvolupen els animals pot tenir petites variacions entre individus, però, generalment, una vegada s'inicien els primers símptomes, la progressió de la malaltia es relativament ràpida, provocant la mort de l'animal, com a molt, als 5 mesos d'edat. Es van obtenir mostres de sèrum de cada animal a P30, P60, P90 i P120 dies que havien estat tractades, en el laboratori d'origen, com les mostres de sèrum humà descrites en l'apartat anterior.

1.3. Obtenció de la fracció d'immunoglobulines G dels sèrums

La fracció d'IgG del sèrum d'individus control i pacients d'ELA es va purificar per cromatografia d'afinitat seguint el protocol del kit *Protein G Sepharose 4 Fast Flow* (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden).

100 μl de sèrum es van carregar en una Unitat de Filtració per Centrifugació de 0.45 μm (UFC30HV25, Ultrafree-MC, MILLIPORE

Iberica, Madrid, Spain) que contenia 60 µl de proteïna G, equilibrada prèviament amb PBS 20 mM a pH 7.4. La columna es va situar en un braç rotatori i es va incubar durant 2 h a temperatura ambient. La fracció d'IgG es va eluir amb 100 µl de glicina 0.1 M a pH 2.5-3.0, i el pH de la mostra eluïda es va neutralitzar amb 20 µl de Tris-HCl 1 M a pH 9.0. Les IgG es van dialitzar contra PBS, a 4°C durant 1-2 dies, amb 3 canvis de solució, de 2 l cadascun, per dia. La concentració de cada una de les mostres es va estimar per espectrofotometria (DO 280 nm).

2. Obtenció i preparació del material d'injecció

2.1. Obtenció dels plasmidis

Els plasmidis que contenien el cDNA de les subunitats GluN1 i GluN2A del receptor humà d'NMDA GluN1/GluN2A van ser cedits pel Dr. Paul Whiting (Neuroscience Research Centre, Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Harlow, UK). El cDNA de la subunitat GluN1 estava clonat en el vector pCI-neo, inserit en el lloc de restricció EcoRI (Figura M-1), mentre que el cDNA de la subunitat GluN2A va ser clonat en el vector pCDNA1/Amp, inserit entre el llocs de restricció HindIII i EcoRI (Figura M-2).

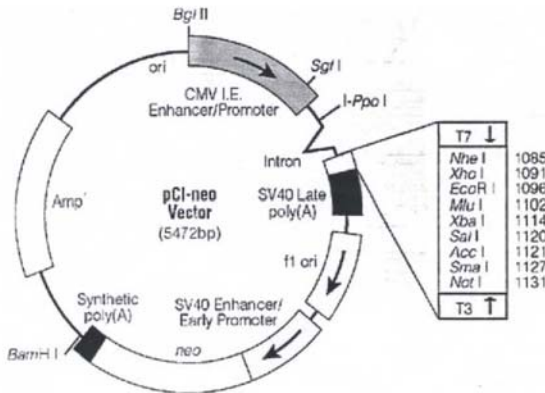


Figura M-1. Esquema del vector pCI-neo. L'insert de la subunitat GluN1 està clonat en el lloc de restricció EcoRI i orientat de manera que s'obtingui el cRNA fent la reacció de transcripció amb la polimerasa T7.

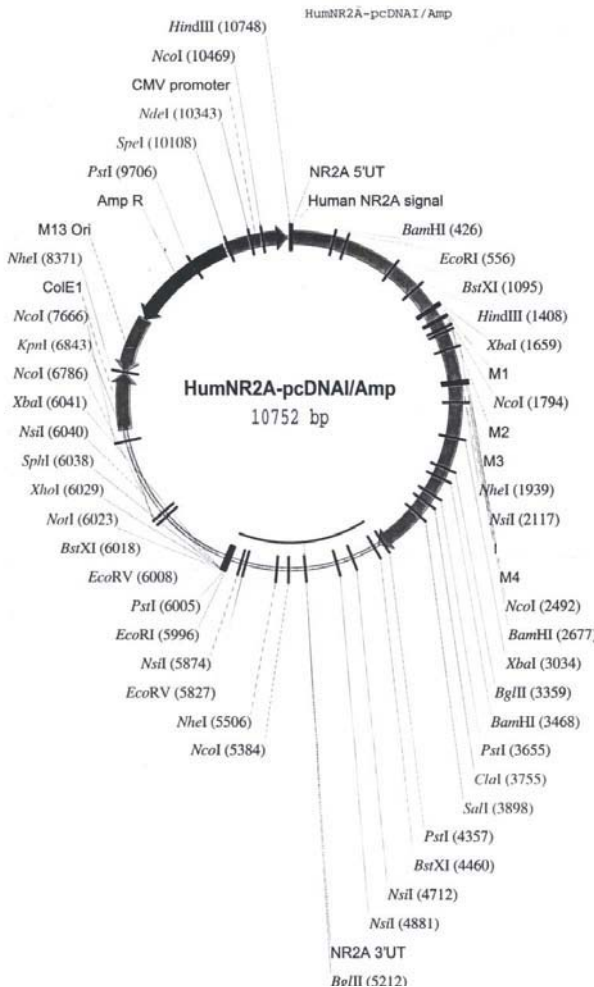


Figura M-2. Mapa de restricció del vector pcDNA1/Amp. El vector conté el promotor CMV, per a l'expressió en cèl·lules eucariotes, i la seqüència que confereix resistència a ampicil·lina. El cDNA de la subunitat GluN2A està clonat entre els llocs de restricció HindIII i EcoRI.

2.2. Transformació de bacteris

Per tal d'aconseguir la quantitat òptima de plasmidi per dur a terme la reacció de transcripció, es van transformar bacteris competents *E. Coli* de la soca XL1-blue. Per cada transformació es va utilitzar una alíquota de 200 µl de bacteris, s'hi van afegir 4 µl del plasmidi a transformar i es van deixar reposar en gel durant 30 min. Passat aquest temps es va realitzar un xoc tèrmic a 42°C durant 45 s en un bany per tubs eppendorf, i ràpidament les alíquotes es van tornar a incubar en gel durant 2 min. Després s'hi van afegir 800 µl de medi LB i es van fer créixer els bacteris a 37°C en agitació durant 1 h. Finalment, es van sembrar 100 µl del cultiu en una placa de medi agar LB amb una concentració d'ampicil·lina de 50 µg/ml i es van incubar tota la nit a 37°C.

2.3. Purificació del DNA plasmídic recombinant (MiniPREP)

Per cada una de les transformacions es van picar vàries colònies que havien crescut en les plaques d'agar i es van inocular cultius de 3 ml de medi LB complementat amb ampicil·lina (50 µg/ml), els quals van ser incubats tota la nit en agitació a 37°C.

Per determinar quines colònies havien incorporat el plasmidi es va realitzar una purificació del DNA plasmídic a petita escala (MiniPREP) utilitzant el kit comercial *Minitools Miniprep Kit* (21022, BIOTOOLS, Madrid, Spain). 1.5 ml de cada cultiu es van centrifugar durant 2 min a 15000 g. El sediment obtingut es va ressuspendre en 100 µl de Solució I del kit complementada amb 1 µl/ml de RNAsa 2000. Després s'hi van afegir 100 µl de Solució II i la mostra es va barrejar per inversió fins a 5 vegades. Tot seguit, s'hi van afegir 100 µl de Solució III i es va deixar incubar en gel durant 5 min. Es va dur a terme una centrifugació de 10 min a 15000 g de la qual es va recuperar el sobrenedant de la mostra,

s'hi van afegir 10 µl de matriu de sílice i es va deixar incubar durant 10 min a temperatura ambient, barreiant per inversió cada 2-3 min. La mostra es va carregar en una columna de purificació i es va centrifugar 5 min a 15000 g . Es va eliminar l'elutit, es van afegir 300 µl de *Wash Solution* al cartutx de la columna i aquesta es va centrifugar durant 1 min a 15000 g . Es va repetir aquest últim pas de rentat un cop més i després es va transferir la columna a un tub eppendorf nou on es va incubar durant 2 min a temperatura ambient amb 50 µl de tampó TE a 65°C. L'elutit amb el DNA es va recuperar després d'una centrifugació de 2 min a 15000 g.

Per comprovar la qualitat dels plasmidis, les miniPREPs obtingudes es van digerir amb els enzims de restricció corresponents per a cadascun d'ells durant 3-4 h a 37°C i les digestions es van córrer en un gel d'agarosa al 1%.

2.4. Purificació del DNA plasmídic recombinant (MidiPREP)

Es van escollir les colònies d'on provenien les miniPREPs dels bacteris que havien incorporat correctament els plasmidis i es va procedir a la purificació de DNA plasmídic a gran escala (MidiPREP).

Es van picar les colònies, es van inocular cultius de 250 ml de medi LB complementat amb ampicil·lina (50 µg/ml) i es van deixar créixer durant tota la nit en agitació a 37°C. Seguint el protocol del kit comercial *MidiPrep Kit* (12143, QIAGEN Inc., CA, USA), els cultius es van centrifugar durant 15 min a 6000 g i a 4°C. El sediment obtingut es va ressuspendre en 4 ml de Tampó P1 i es va traspasar a un tub corex de 30 ml. Tot seguit s'hi van afegir 4 ml de Tampó P2, barreiant-ho per inversió 6 vegades i deixant-ho incubar 5 min a temperatura ambient. El mateix es va fer al afegir 4 ml de Tampó P3. La barreja final es va incubar durant 15 min en gel. A continuació es va dur a terme una

centrifugació de 30 min a 20000 g i 4°C, alhora que s'equilibrava una columna Qiagen-Tip 100, per cada una de les midiPREPs, amb 4 ml de Tampó QBT. Els sobrenedants resultants de la centrifugació es van afegir a les columnes i es van rentar dues vegades amb Tampó QC. Finalment, el DNA es va eluir amb 5 ml de Tampó QF, recollint-se en un tub corex de 15 ml i precipitant-se amb 3.5 ml d'isopropanol. A continuació es va dur a terme una centrifugació de 30 min a 20000 g i 4°C, després de la qual es va descartar el sobrenedant i es va rentar el sediment amb 2 ml d'etanol al 70%. Es va centrifugar de nou la mostra durant 10 min a 15000 g i 4°C i es va deixar assecar el sediment durant 5-10 min. El sediment de DNA es va ressuspensionar en 200 µl d'aigua miliQ, es va quantificar i es va comprovar la seva qualitat digerint una petita quantitat de cada una de les midiPREPs amb els enzims de restricció corresponents, tal com s'havia fet amb el resultat de les miniPREPs, explicat en l'aparat anterior. Les midiPREPs es van emmagatzemar a -20°C fins al seu ús.

2.5. Generació dels stocks de glicerol

Les colònies seleccionades s'emmagatzemaven en glicerol després de comprovar que havien incorporat correctament els respectius plasmidis. Per això, s'inoculaven de nou cultius de 3 ml de medi LB complementat amb ampicil·lina i es feien créixer tota la nit en agitació a 37°C. 800 µl d'aquests cultius es barrejaven amb 200 µl de glicerol al 75% en un tub eppendorf i ràpidament es congelaven a -80°C, on quedaven emmagatzemats pel seu ús a llarg termini.

2.6. Producció de cRNA

Seguint el protocol del kit comercial *mCAP RNA Capping kit* (#200350, Stratagene, CA, USA) es va dur a terme la producció de cRNA a partir de cDNA. 10 µg dels plasmidis que contenen el cDNA de les subunitats

Glun1 o Glun2A es van linealitzar amb els enzims de restricció XbaI i EcoRV respectivament, i es va procedir a la reacció de transcripció amb la T7-RNA-polimerasa. Seguidament es va realitzar un tractament amb 4 unitats de DNAsa I del mateix kit per tal d'eliminar el DNA sobrant i es va precipitar el cRNA a -20°C durant tota la nit amb acetat sòdic 3M a proporció 1:10 i amb 2.5 volums d'etanol absolut. A l'endemà es va centrifugar la barreja durant 15 min a 15000 g i 4°C, es va descartar el sobrenedant, es va ressuspèndre el sediment de cRNA en 15 µl d'aigua lliure d'RNases tractada amb DEPC i es va quantificar i comprovar en un gel d'agarosa a l'1.2%. El cRNA sobrant es va aliquotar de 3 en 3 µl en tubs eppendorf i es van conservar a -80°C fins al seu ús.

3. Model experimental d'oòcit de *Xenopus laevis*

3.1. Obtenció i manteniment dels oòcits de *Xenopus laevis*

Les femelles de *Xenopus laevis* es van obtenir del Centre d'Élevage des Xénopes, de Montpellier, França, i es mantenien establades individualment, a l'estabulari del Campus de Bellvitge de la Universitat de Barcelona, en gàbies amb aigua destil·lada i amb un 2% de NaCl. L'aigua de les gàbies es canviava tres cops per setmana, el mateix dia que s'alimentaven les granotes, amb cor de vedella triturat.

Per a l'extracció dels oòcits, els exemplars de *Xenopus* s'anestesiaven per immersió en aigua destil·lada que contenia un 0.17% de triclaïna, 3-aminobenzoic acid ethyl ester (Sigma, St. Louis, MO, USA). Es practicava una petita incisió abdominal, primer través de la pell i després a través de la capa de musculatura, fins arribar a l'ovari, d'on s'hi extreien algunes bosses ovàriques que es disposaven en una placa de Petri estèril que contenia solució de Barth, una solució fisiològica isotònica (detallada en l'apartat 8). La solució de Barth estava

complementada amb penicil·lina/estreptomicina. La incisió es cosia posteriorment amb fil de seda estèril de 2 mm (6/0 TB-10, Aragó, Laboratoris Aragó, Barcelona) i es deixava reposar l'animal durant un període no inferior als 3 mesos abans d'una nova operació. Cada individu era operat no més de 4 vegades.

El protocol de manipulació dels animals i extracció dels oòcits va ser certificat i aprovat pel comitè ètic d'experimentació animal de la UB, d'acord amb les lleis de la Unió Europea i el Govern de la Generalitat Catalana.

En una placa de Petri i sota una lupa Sz-40 (Olympus, Hamburg, Germany) els oòcits en estadi de desenvolupament V i VI (Sive et al., 2000) eren separats manualment, un per un, de la capa de teixit connectiu que els mantenia units, amb l'ajuda d'unes pinces de rellotger (Num. 55, WPI, Stevenage, UK). Aquestes fases de desenvolupament dels oòcits de *Xenopus* són fàcilment distingibles a simple vista degut a la seva grandària (Figura M-3).



Figura M-3. Oòcits de *Xenopus laevis* en estadi de maduració V i VI.

Els oòcits seleccionats es mantienien en plaques de Petri amb medi de Barth en un incubador a 18°C. El medi es canviava cada dia i s'eliminaven els oòcits morts. Amb aquest protocol s'aconseguia una supervivència del 90-95%.

3.2. Injecció de cRNA en els oòcits de *Xenopus laevis*

Les micropipetes d'injecció de cRNA s'obtenien a partir d'un capil·lar de vidre (4878, WPI, Stevenage, UK) i utilitzant un protocol d'estirament en dos passos amb un estirador de vidre programable P-97 (Sutter Instruments Co., CA, USA). Un cop fetes les pipetes, i amb l'ajuda d'una lupa, se'ls hi trencava la punta fins a assolir el diàmetre adequat per a la injecció (10-15 µm). Les pipetes ja preparades s'esterilitzaven en una estufa a 200°C durant 4 h.

Per la injecció de cRNA, tot el material utilitzat, així com la superfície d'injecció, havia de ser estèril. Amb l'ajuda d'una xeringa d'1 ml amb agulla de 25G (141.2001A, Rubilabor, Barcelona, Spain) s'omplia la micropipeta d'injecció amb oli mineral estèril (M-5904, Sigma, St. Louis, MO, USA) fins a la meitat, per evitar que la mostra estigués en contacte amb l'èmbol metàl·lic del nanoinjector i es pogués contaminar. Es col·locava la micropipeta en el nanoinjector (A203XVZ, WPI, Stevenage, UK) i aquest es subjectava amb un micromanipulador (MMN-3R, Narishigue, Japan). Una gota de la mostra a injectar es posava en el tap del mateix eppendorf on estava al·liquotada i, posant la punta de la micropipeta en contacte amb la gota, es xuclava la mostra amb l'ajuda dels comandaments del nanoinjector. Llavors els oòcits, en grups reduïts, es disposaven sobre un motlle de parafilm amb forats d'1 mm de diàmetre aproximadament, en els quals s'acomodaven cadascun d'ells i s'hi mantenien humits durant tot el procés d'injecció.

Cada oòcit es punxava en el pol vegetal, a prop de l'equador, per tal de no malmetre el nucli, i s'injectava amb 50 nl de cRNA a una concentració de 1-2 mg de cRNA/ml. Els oòcits injectats es disposaven de nou en una placa de Petri amb solució de Barth complementada amb penicil·lina/estreptomycina i s'hi mantenien entre 48-72 h, temps necessari per a la correcta expressió de la mostra. Després d'aquest temps es procedia als experiments d'electrofisiologia.

3.3. Tractament amb col·lagenasa

Abans de començar els registres electrofisiològics es procedia a l'eliminació de la capa fol·licular dels oòcits de *Xenopus*. El gruix d'aquesta capa impedeix als microelèctrodes de registre penetrar en l'oòcit sense trencar-se i, alhora, el seu contingut de canals iònics i unions GAP pot interferir en el registre dels canals de la membrana plasmàtica (Browne et al., 1979; Browne i Werner, 1984). Per eliminar aquesta capa, els oòcits es col·locaven en vials de vidre que contenien una solució Ringer amb 0.5 mg/ml de l'enzim Col·lagenasa IA (Sigma, St. Louis, MO, USA) i s'incubaven en un braç rotatori, a 10 rpm i a temperatura ambient, durant 30-45 min aproximadament, fins a observar el despreniment de les capes fol·liculars. Per aturar el tractament es feien 5 rentats dels oòcits amb 1 ml de solució Ringer i, finalment, es retornaven a les plaques de Petri amb solució Barth fins al moment del registre.

4. Registre de la fixació de voltatge amb dos elèctrodes (*Two Electrode Voltage Clamp*)

4.1. Tècnica de la fixació de voltatge amb dos elèctrodes

La tècnica de fixació de voltatge amb dos elèctrodes consisteix en la utilització d'un elèctrode que detecta la diferència de potencial entre l'interior de l'oòcit i el bany que l'envolta, i, un segon elèctrode que injecta el corrent necessari per mantenir el potencial de membrana constant i a un valor desitjat. Això s'aconsegueix mitjançant un circuit de retroalimentació de l'amplificador de voltatge. Durant el registre, quan s'obren els canals iònics de la membrana de la cèl·lula fixada a un potencial determinat, l'amplificador injecta, a través d'un dels elèctrodes, un corrent de la mateixa intensitat i de sentit oposat al

corrent que flueix a través dels canals iònics per mantenir el potencial de membrana constant (Figura M-4).

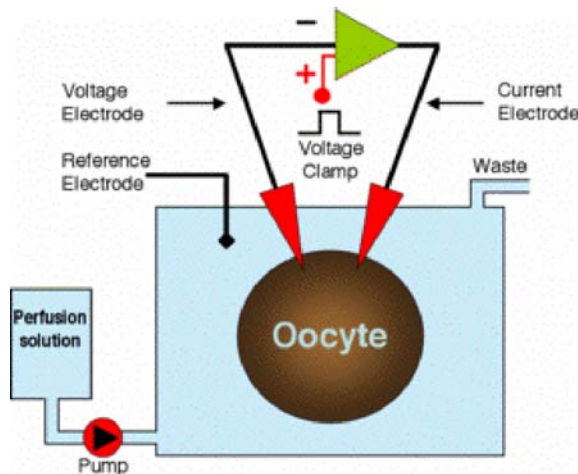


Figura M-4. Esquema de la cambra de registre i del circuit elèctric que realitza la funció de fixació de voltatge.

4.2. Components del set-up de *Voltatge Clamp*

En els registres amb la tècnica de fixació de voltatge amb dos elèctrodes, l'òcit es situava en una cambreta de plàstic transparent de 200 μ l amb un canal per on passava el fluid i al mig del qual hi havia un forat de 1-2 mm de diàmetre on es dipositava l'òcit amb una pipeta Pasteur. En aquesta posició, l'òcit es punxava amb els dos microelèctrodes (Figura M-5).

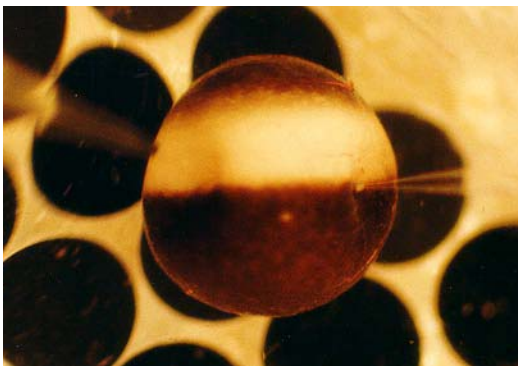


Figura M-5. Imatge d'un òcit de *Xenopus*, a la cambra de registre, punxat amb els dos microelèctrodes.

La cambra estava fixada sota d'una lupa (Stemi SV8, Carl Zeiss, Canadà) i il·luminada amb llum freda (Olympus Highlight 3000) que ens permetia veure i punxar correctament l'oòcit. La lupa estava situada sobre una taula antivibratoria (TMC, MA, USA) per evitar possibles vibracions que poguessin fer malbé l'oòcit durant el registre electrofisiològic. La taula estava envoltada per una gàbia metàl·lica de Faraday opaca. El fluid s'aplicava des d'un tub que desembocava per gravitació a un dels extrems del canal, des d'un sistema de vuit xeringues de 70 ml de volum situades a una alçada d'uns 80 cm. El flux de les diferents xeringues es controlava mitjançant un sistema de vàlvules *BPS-8 Valve Control System* (ALA Scientific Instruments, NY, USA). El fluid transcorria pel canal, a una velocitat de entre 6 i 10 ml/min, mullava l'oòcit i s'extreia per l'altre extrem del canal mitjançant un tub connectat a la xarxa de buit de l'edifici a través de dos vasos kitasato.

L'oòcit es punxava amb dos elèctrodes intracel·lulars situats en els *holders* dels preamplificadors, connectats a un amplificador de voltatge (GeneClamp 500, Axon Instruments, CA, USA), que al seu torn estava connectat a una tarja digitalitzadora (NI-DAQ, National Instruments, TX, USA) que passava els senyals a l'ordinador mitjançant el programa *Whole Cell Analysis WinWCP v3.3.3* del professor J. Dempster (Strathclyde University, Scotland, UK). Per altra banda, el senyal també es visualitzava amb un oscil·loscopi Tektronix TDS 420A (Tektronix, OR, USA) (Figura M-6).

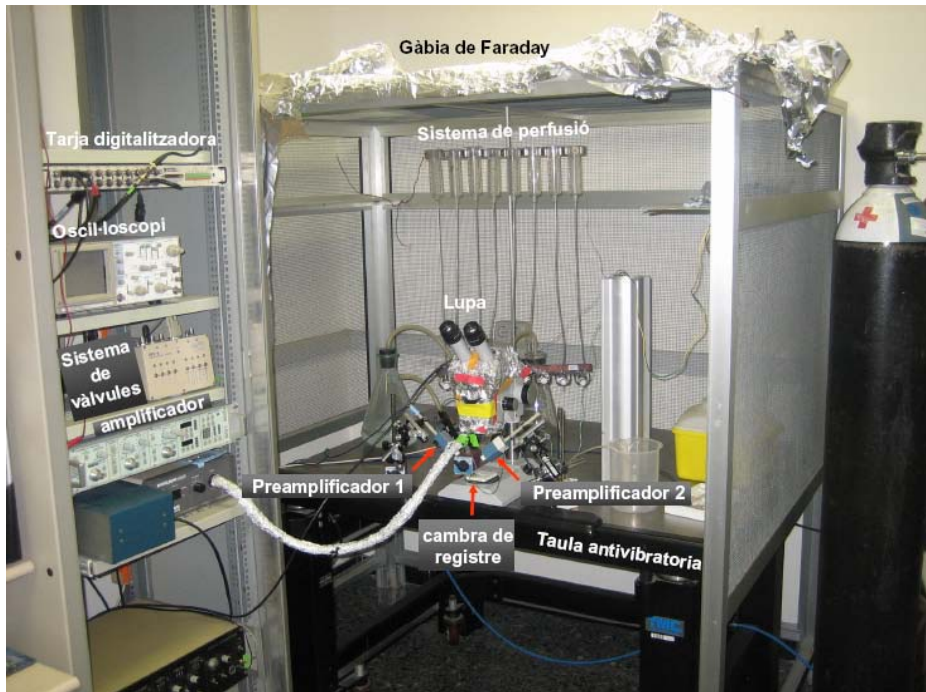


Figura M-6. Imatge dels components del set-up de Voltage Clamp.

Tots els registres amb oòcits de *Xenopus laevis* es realitzaven a una temperatura ambient controlada d'entre 20 i 22°C.

4.3. Preparació del material i registre de fixació de voltatge amb dos elèctrodes.

En un primer pas, es feien els elèctrodes de registre amb uns capil·lars de vidre amb filament intern del tipus GC120TF-7.5 (Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) utilitzant un estirador de vidre P-97 (Sutter Instrument Co., CA, USA) per estirar els capil·lars amb un programa de dos passos. Els elèctrodes havien de tenir una resistència de entre 0.5-3 MΩ. Després, els microelèctrodes s'omplien amb una solució 3M de KCl i es connectaven a un *holder*, el qual contenia un elèctrode de plata clorurat de 25 mm de diàmetre (Axon Instruments, CA, USA). Els *holders*, amb els microelèctrodes, es col·locaven en uns

preamplificadors o *headstages* (HS-2A, Axon Instruments, CA, USA), el model HS-2Ax1L per l'elèctrode que enregistrava el potencial de membrana i el model HS-2Ax10MG per al d'injecció de corrent. Els preamplificadors, els holders i els microelèctrodes es controlaven mitjançant uns micromanipuladors (MMN-3R, Narishigue, Japan). El bany de la cambra de registre es connectava a un elèctrode de plata clorurat que estava connectat al terra de la xarxa i servia d'elèctrode de referència.

Un cop l'oòcit es col·locava dins de la cambra, la qual estava plena de la solució de registre, i els dos microelèctrodes es fixaven en els holders i es connectaven als preamplificadors, la punta dels microelèctrodes es submergia en la solució de la cambra i es corregia el desplaçament inicial (*offset* dels elèctrodes) ajustant-lo a zero. Es penetrava l'oòcit amb els dos microelèctrodes amb un angle d'aproximadament 90° entre un i l'altre. En aquest moment, l'amplificador de voltatge mesurava el potencial de membrana real de l'oòcit i només s'enregistrava la cèl·lula si el potencial era inferior a -20 mV, ja que potencials superiors indicaven que l'oòcit no es trobava en condicions òptimes. Per començar el registre es posava l'amplificador en mode *voltage clamp* i es fixava el potencial a -80 mV. Seguidament es calculava la resistència de la membrana de l'oòcit llegint la diferència de corrent que hi havia entre els potencials -60mV i -40mV i aplicant la llei d'Ohm, i es començava l'enregistrament. No es van utilitzar oòcits amb resistències inferiors a 0.5 MΩ.

4.4. Registre de l'activitat generada per sèrums i immunoglobulines G

Per mesurar la resposta generada pels sèrums i la fracció d'IgG en els oòcits, aquests es col·locaven en la cambra de registre que estava

plena de la solució Ringer-Ba²⁺ i es fixava el potencial de membrana tal com s'ha explicat en l'apartat anterior. Amb l'ajuda d'una micropipeta (GELoader Tips 0.5-20 µl, Eppendorf, Hamburg, Germany) es recollien 5 µl de sèrum o IgG i la punta de la micropipeta travessava la solució de registre fins a apropar-se a l'oòcit sense arribar a tocar-lo. Amb el sistema de perfusió apagat es començava l'enregistrament i, 5 s després del inici, s'aplicava la mostra de sèrum o IgG directament sobre la membrana de l'oòcit. Els registres tenien una durada de 2.5 min. Els corrents generats eren filtrats a 10 Hz, digitalitzats i emmagatzemats en un PC a través del mateix programa *Whole Cell Analysis* a una freqüència d'adquisició de dues vegades la freqüència de filtració. En aquells oòcits injectats amb el cRNA del receptor de glutamat GluN1/GluN2A es mesurava l'activitat del receptor prèviament a l'aplicació del sèrum. Amb l'oòcit col·locat a la cambra de registre i fixat a -80 mV, s'aplicava, mitjançant el sistema de perfusió, la solució Ringer-Ba²⁺, complementada amb 100 µM àcid L-glutàmic i 10 µM glicina, durant 25 s.

5. Producció de Semaforina 3A recombinant

5.1. Obtenció dels plasmidis

El plasmidi que contenia el cDNA de la proteïna Semaforina 3A de ratolí va ser cedit pel Dr. Alex Kolodkin (The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA). L'insert va ser clonat en el vector pAPtag-5, entre els llocs de restricció XbaI i ApaI. Aquest vector es utilitza per a fer proteïnes de fusió amb fosfatasa alcalina (AP) (Figura M-7).

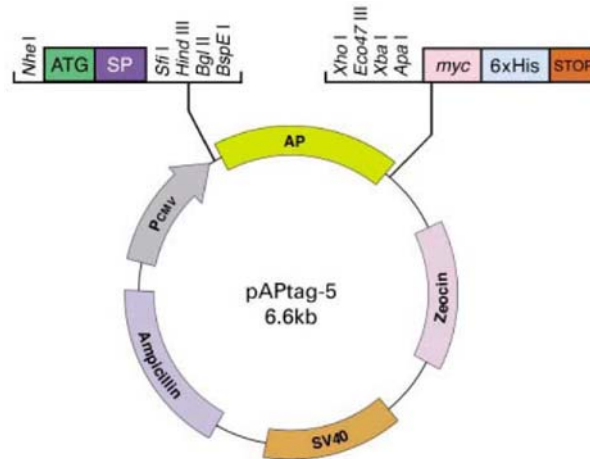


Figura M-7. Mapa del vector de clonació pAPtag-5. L'expressió del vector genera la proteïna de fusió Sema3A-AP.

5.2. Transformació de bacteris i purificació de DNA plasmídic recombinant (MiniPREP, MidiPREP)

Per tal d'aconseguir una quantitat òptima de DNA recombinant de Semaforina 3A per a realitzar el procés de transfecció es van dur a terme les tècniques esmentades en els apartats 2.2, 2.3 i 2.4.

5.3. Transfecció de cèl·lules COS-7

Per a la obtenció de proteïna Semaforina 3A es van utilitzar cèl·lules COS-7. Aquestes cèl·lules es van fer créixer en plaques de cultiu de 10 ml, en un medi que contenia DMEM/F-12 (HAM) 1:1 (01-170-1A, Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel), 10% de sèrum fetal boví (FBS), 200 mM de L-Glutamina, i que estava complementat amb penicil·lina (50 U/ml) i estreptomicina (50 µg/ml). Quan la confluència de les cèl·lules del cultiu era d'un 80-90% es procedia a la transfecció

mitjançant Lipofectamina 2000 (11668-027, Invitrogen, CA, USA), seguint el protocol de la casa comercial.

Per una banda, es van diluir 60 µl de Lipofectamina 2000 en 1.5 ml de medi Opti-MEM (31985-062, Invitrogen, CA, USA) i es van incubar durant 5 min. Per una altra banda, 24 µg de DNA de Semaforina 3A recombinant es van diluir en 1.5 ml de medi Opti-MEM i també es van incubar durant 5 min. Passat aquest temps es van barrejar les solucions que contenen la Lipofectamina i el DNA i es van incubar durant 20 min més. Aquesta barreja es va afegir a les plaques de cultiu de cèl·lules COS-7, on prèviament s'havia substituït el medi normal per medi Opti-MEM. Les cèl·lules es van incubar durant 4 h a 37°C i finalment l'Opti-MEM va ser altre cop substituït per medi de cultiu de COS-7. Les cèl·lules es van fer créixer durant 48 hores i es van seleccionar clons de cèl·lules transfectades per dilució límit en presència d'ampicil·lina. Per la selecció clonal es van contar les cèl·lules, es van diluir a una concentració de 0,7 cèl·lules/100 µl i es van plantar en plaques de 96 pous (100 µl/pou). Diluint d'aquesta manera s'aconsegueixen clons que provenen d'una única cèl·lula. Aquests, es van fer créixer en plaques de 24, 12 i 6 pous fins a obtenir el nombre necessari de cèl·lules per plantar plaques de 10 ml, d'on es recollien els medis de cultiu.

5.4. Obtenció de la mostra i concentració

Es van recollir els medis de cultiu de clons de cèl·lules COS-7 transfectades i es van concentrar mitjançant uns filtres concentradors *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices* (MILLIPORE, Barcelona, Spain). 10 ml de medi de cada cultiu es situaven en aquests filtres i es centrifugaven durant 40 min a 4000 g i 4°C. Després es procedia a quantificar la concentració de proteïna de cada mostra.

5.5. Identificació per Western-Blot

La presència de proteïna Semaforina 3A en el medi de cultiu de cèl·lules COS-7 transfectades es va determinar mitjançant la tècnica de Western-Blot.

El gel d'acrilamida/bisacrilamida per a l'electroforesi es va fer utilitzant una solució *Resolving* al 10% i una solució *Stacking* al 4%. Es va afegir tampó de càrrega a les mostres i aquestes es van incubar durant 3-5 min a 100°C. Les mostres es van carregar en el gel, es va omplir la cubeta amb tampó d'electroforesi i es van fer córrer durant 1 h a 200 V de corrent i a una intensitat de 18 mA. Després de l'electroforesi, les proteïnes es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa (1620112, Bio-Rad Laboratories S.A., Hercules, CA, USA) seguint el protocol de transferència *sandwich*, durant 1 h a 100 V. La membrana de nitrocel·lulosa transferida va ser bloquejada durant 45 min amb tampó llet, en agitació suau i a temperatura ambient. La solució de bloqueig va ser substituïda per una nova solució de tampó llet que contenia l'anticòs primari i la membrana es va incubar durant 1 h, en agitació suau i a temperatura ambient o durant tota la nit a 4°C. Posteriorment, la membrana de nitrocel·lulosa es va rentar amb tampó llet durant 6 min i en agitació tres cops i s'hi va afegir una nova solució de tampó llet que contenia l'anticòs secundari. La membrana es va incubar amb l'anticòs secundari durant 1 h en agitació suau i a temperatura ambient. Després es van realitzar tres rentats de la membrana amb tampó llet i dos rentats amb tampó TBS, durant 6 min i en agitació. Les membranes es van revelar mitjançant el sistema ECL (RPN2209, GE Healthcare, Valencia, Spain). Aquest sistema aprofita l'enzim peroxidasa unit a l'anticòs secundari que, juntament amb l'H₂O₂ i el Luminol presents en l'ECL, genera una senyal lluminosa que es captada per un film per rajos X (Kodak).

Tant els anticossos, com les dilucions utilitzades de cadascun d'ells, estan descrits en l'apartat 7.

6. Assaigs d'ELISA

Per tal de detectar la presència d'anticossos circulants contra Semaforina 3A en sèrums patològics d'ELA es van dissenyar experiments d'ELISA seguint el següent protocol: Es van utilitzar plaques *Immuno-plate MaxiSorp 96* (Nunc, Roskilde, Denmark) on s'hi van incubar 100 µl/pou d'una solució de bicarbonat sòdic 100 mM a pH 8.5, on estava dissolt el pèptid comercial de la Semaforina 3A (100 ng/pou), durant tota la nit a 4°C. Les plaques es van rentar dos cops amb 200 µl/pou d'una solució PBS-tritó 0.1% mitjançant un rentador de plaques *Automated microplate washer* (Das, Roma, Italia). Després, les plaques es van bloquejar amb una solució PBS-tritó 0.1%-BSA 2% (A9647, Sigma, St. Louis, MO, USA) durant 2 h a temperatura ambient, i, posteriorment, es van rentar altre cop amb PBS-tritó 0.1%. Tot seguit, les plaques es van incubar amb 100 µl/pou d'una solució PBS-tritó 0.1%-BSA 0.1% que contenia l'anticòs primari (mostres de sèrum control/pacient amb ELA, dilució 1:50), durant tota la nit a 4°C. Les plaques es van tornar a rentar tal com s'ha explicat anteriorment i es van incubar amb l'anticòs secundari dissolt en PBS-tritó 0.1%-BSA 0.1% (100 µl/pou) durant 1 h a temperatura ambient i es va procedir a un parell de rentats abans del revelat.

Les plaques es van revelar mitjançant el sistema *Sigma Fast OPD tablet sets* (P-9187, Sigma, St. Louis, MO, USA) que aprofita la presència de l'enzim peroxidasa unit a l'anticòs secundari per provocar una reacció colorimètrica. Dues pastilles d'OPD es van dissoldre en 20 ml d'aigua i es van afegir 100 µl a cada pou. Les plaques es van incubar durant 15 min i la reacció es va parar amb 50 µl/pou d'una solució H₂SO₄ 2.5 M.

Es va mesurar el resultat per espectrofotometria, llegint l'absorbància de cada pou a 450 nm.

En els assajos d'ELISA realitzats amb proteïna recombinant Semaforina 3A vam aplicar un protocol d'ELISA *Sandwich* (Figura M-8). En aquest cas, primer de tot les plaques d'ELISA es van incubar amb 100 µl/pou d'una solució de bicarbonat sòdic 100 mM a pH 8.5, on estava dissolt l'anticòs comercial contra Semaforina 3A, durant 2 h a temperatura ambient. Després es van rentar i bloquejar les plaques tal com s'ha explicat anteriorment i es van incubar amb 100 µl/pou d'una solució PBS-tritó 0.1%-BSA 0.1% que contenia la Semaforina 3A recombinant (1 µg/pou), durant 2 h, a temperatura ambient. A partir d'aquest punt es va seguir el mateix protocol utilitzat amb els pèptids de Semaforina 3A: incubació de les plaques amb les mostres problema (sèrum control/ELA), rentat, incubació amb l'anticòs secundari i revelat de les plaques.

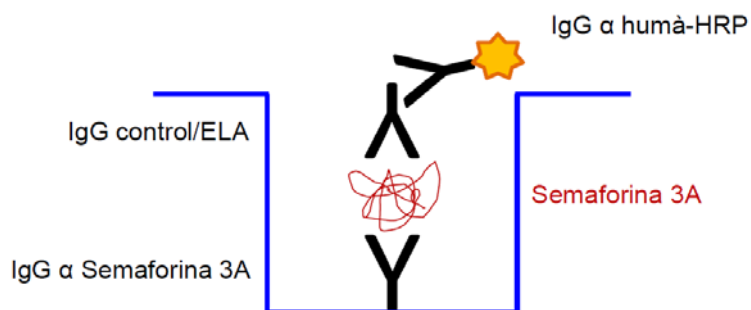


Figura M-8. Esquema de l'assaig d'ELISA *Sandwich* utilitzat en la detecció d'anticossos contra Semaforina 3A en sèrums de pacients amb ELA. Inicialment, s'uneix l'anticòs comercial contra Semaforina 3A al fons de la placa, el qual captura la mostra de Semaforina 3A recombinant. Després s'incuba la placa amb les mostres problema de sèrum control o ELA i es detecta la unió d'aquestes a l'antigen amb un anticòs secundari contra IgG humanes, que alhora, està unit a un enzim peroxidasa. Finalment, s'afegeix el substrat que reacciona amb l'enzim i es llegeix la DO per espectrofotometria. HRP, *Horse radish Peroxidase*.

Tant els pèptids comercials de Semafarina 3A com els anticossos, així com les dilucions de cadascun d'ells utilitzades en els experiments, estan descrites a l'apartat 7.

7. Anticossos i pèptids

Anticòs primari (Referència)	Casa comercial	WB	ELISA
<i>Anti-Semaphorin 3A (ab 23393)</i>	Abcam	1:500	1:2000
<i>Anti-Semaphorin 3A (sc-1148)</i>	St. Cruz	1:500	1:500
<i>Anti-human AP (A 2951)</i>	Sigma	1:2000	1:2000

Anticòs secundari (Referència)	Casa comercial	WB	ELISA
<i>Anti-rabbit IgG-HRP (P0217)</i>	Dako	1:1000	1:1000
<i>Anti-goat IgG-HRP (P0160)</i>	Dako	1:2000	1:20000
<i>Anti-mouse IgG-HRP (P0161)</i>	Dako	1:1000	1:1000
<i>Anti-human IgG-HRP (P214)</i>	Dako		1:1000

Pèptids (Referència)	Casa comercial	ELISA
<i>Semaphorin 3A peptide</i> (ab 42768)	Abcam	1:1000
<i>Semaphorin 3A peptide</i> (ab 42770)	Abcam	1:1000

8. Composició de les solucions

<p><u>Tampó PBS</u></p> <p>NaCl 137 mM KCl 2.7 mM NaH₂PO₄ 2 mM Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.4 (HCl)</p> <p><u>Solució de Barth</u></p> <p>NaCl 88 mM KCl 1 mM Ca(NO₃)₂ 0.33 mM CaCl₂ 0.41 mM NaHCO₃ 2.40 mM MgSO₄ 0.82 mM HEPES 20 mM Penicil·lina (100 U/ml) Estreptomicina (100 µg/ml) pH 7.5</p> <p><u>Ringer Normal (NR)</u></p> <p>NaCl 115 mM KCl 2 mM CaCl₂ 1.8 mM HEPES 10 mM pH 7.4</p>	<p><u>Medi LB</u></p> <p>10% Triptona 5% Extracte de llevat 10% NaCl pH 7.0</p> <p><u>Agar LBr</u></p> <p>Medi LB 15 g/l Bacto agar</p> <p><u>Solució Resolving (10%)</u></p> <p>Acrilamida 2.5 ml Tampó <i>Resolving</i> 2.5 ml Aigua MiliQ 4.85 ml Temed 10 µl APS 10% 100 µl</p> <p><u>Solució Stacking (4%)</u></p> <p>Acrilamida 400 µl Tampó <i>Stacking</i> 1 ml Aigua MiliQ 2.5 ml Temed 4 µl 10% APS 40 µl</p>
---	---

<p><u>Ringer Ba²⁺</u></p> <p>NaCl 115 mM KCl 2 mM BaCl₂ 1.8 mM HEPES 10 mM pH 7.4</p>	<p><u>Tampó d'electroforesi</u></p> <p>Glicina 192 mM Tris 25 mM 1% SDS</p>
<p><u>Tampó de càrrega</u></p> <p>Tris-HCl 0.3 M 8.5% SDS 30% Glicerol 0.01% Blau bromofenol 4% Mercaptoetanol</p>	<p><u>Tampó TBS (10X)</u></p> <p>Tris 100 mM NaCl 1.4 M 1% Tween-20 pH 7.4</p>
<p><u>Tampó Sandwich</u></p> <p>Glicina 192 mM Tris 25 mM 20% m Metanol</p>	<p><u>Solució ECL A</u></p> <p>Tris 100 mM pH 8.5 Àcid Cumàric 450 nM Luminol 2.5 mM</p>
<p><u>Tampó Llet</u></p> <p>TBS 1x 5% Llet en pols</p>	<p><u>Solució ECL B</u></p> <p>Tris 100 mM pH 8.5 0.06% H₂O₂</p>

9. Anàlisi estadística

L'Estudi estadístic dels resultats es va realitzar mitjançant el programa informàtic SigmaStat 3.2 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). El mètode estadístic utilitzat en aquest estudi va ser la comparació de mitjanes per a mostres independents amb la prova de la t-Student, quan comparàvem dues condicions, o l'ANOVA d'un únic factor (*one-way analysis of variance*), quan comparàvem més de dues condicions. En el cas de mostres que provenien del mateix animal es

va realitzar la comparació de mostres relacionades. Tots els resultats s'han expressat com a la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana (SEM). Els valors amb una probabilitat inferior a 0.05 s'han considerat significativament estadístics.

RESULTATS

1. Efecte dels sèrums patològics ELA sobre el receptor de glutamat de tipus NMDA GluN1/GluN2A expressat en oòcits de *Xenopus laevis*

1.1 Obtenció del cRNA de les subunitats GluN1 i GluN2A

En la primera part d'aquest treball, per tal de poder expressar el NMDAR en els oòcits de *Xenopus*, es va dur a terme la producció del cRNA de cadascuna de les subunitats que el formen. A partir dels plasmidis que contenien el cDNA humà de GluN1 i GluN2A, cedits pel Dr. Paul Whiting (Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Harlow, UK) i seguint les tècniques de biologia molecular descrites a l'apartat 2 de la secció Materials i mètodes, es van produir i purificar els cRNAs corresponents a les dues subunitats (Figura R-1).

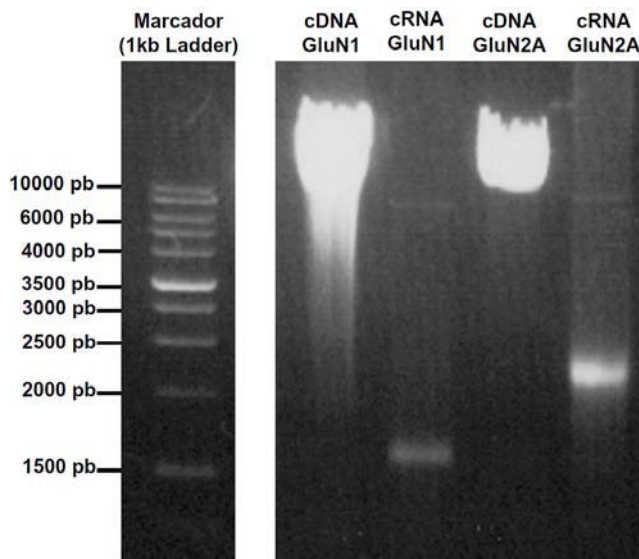


Figura R-1. Bandes corresponents al cDNA i cRNA de GluN1 i GluN2A separades en un gel d'agarosa. La integritat del cRNA es va comprovar per electroforesi en gel d'agarosa a l'1.2% (dissolta en tampó MOPS 1X), tenyit amb bromur d'etidi. La mida dels cRNAs obtinguts corresponia amb l'esperada.

El cRNA de GluN1 tenia una mida d'uns 1700 pb, mentre que el cRNA de GluN2A tenia aproximadament 2300 pb. Els cRNAs de GluN1 i GluN2A s'injectaven conjuntament en els oòcits 3 dies abans del

registre electrofisiològic, a una concentració de 1-2 mg/ml, en una proporció 1:2 i a un volum final de 50 nl per oòcit.

1.2 Anàlisi del contingut d'aminoàcids dels sèrums humans control i ELA

Abans de començar amb els registres electrofisiològics es va procedir a analitzar el contingut de glutamat, glicina i aspartat de les mostres de sèrum control i ELA, abans i després del procés de diàlisi al que havien estat sotmeses (apartat 1.1 de la secció Materials i mètodes). Aquests aminoàcids podien interferir en els experiments al tractar-se d'agonistes del NMDAR. Les mostres es van processar i analitzar a la unitat d'Anàlisi elemental orgànica i d'aminoàcids (Serveis Científicotècnics, UB) mitjançant una cromatografia líquida d'intercanvi iònic. Els resultats es mostren a la Taula R-1.

Taula R-1. Contingut de glutamat, glicina i aspartat en mostres de sèrum control i ELA

	Before dialysis			After dialysis		
	Glu	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp
Dialysis buffer	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Control sera	125.79 ± 13.35	231.18 ± 14.09	27.06 ± 1.19	0.0 ± 0.0	2.42 ± 0.92	0.54 ± 0.36
ALS sera	396.99 ± 32.76***	372.42 ± 49.32**	84.17 ± 24.07*	0.54 ± 0.54	4.32 ± 0.39	0.49 ± 0.49

Els valors s'expressen, en $\mu\text{mol/L}$, com la mitjana \pm SEM (n=8-10 mostres/grup). Glu, glutamat; Gly, glicina; Asp, aspartat. Els asteriscs indiquen la diferència significativa entre mostres control i ELA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Es va comprovar que la diàlisi realment reduïa el contingut dels 3 aminoàcids en sèrum, tan control com ELA, i que no hi havia diferències significatives entre aquests dos un cop realitzat el tractament. Cal esmentar que, del total de mostres analitzades, 8 sèrums ELA i 10 sèrums control, la gran majoria no presentaven valors apreciables de cap dels 3 aminoàcids un cop realitzada la diàlisi. També vàrem observar que, abans de dialitzar les mostres, la concentració de glutamat, glicina i aspartat en sèrum ELA era significativament superior a la trobada en controls. Aquest fet ja s'havia descrit en treballs que relacionaven l'excitotoxicitat per glutamat amb la degeneració neuronal observada en la ELA (Rothstein et al, 1991; Urushitani et al, 1998). Durant els registres electrofisiològics, les mostres de sèrum eren diluïdes en la solució de registre que hi havia a la cambra on es situaven els oòcits. Les concentracions resultants dels tres aminoàcids excitatòris després d'aquesta dilució eren: 0.0135 μM Glutamat, 0.108 μM Glicina i 0.0122 μM Aspartat.

1.3 Efecte dels sèrums humans control i patològics en oòcits de *Xenopus* injectats amb aigua DEPC.

Els primers experiments d'aquest estudi es van dissenyar per mesurar l'efecte dels sèrums control i patològics en oòcits que no expressaven cap tipus de material exogen, es a dir, oòcits control, que van ser injectats amb aigua DEPC.

El protocol utilitzat es va basar en els estudis de Miledi i Parker, 1989, Miledi et al., 1989 i Tigyí et al., 1990, en els que es va observar que l'aplicació de sèrum de diferents espècies de vertebrats sobre la membrana dels oòcits activava corrents iònics de clorur de tipus oscil·latori. Seguint la metodologia d'aquests treballs i utilitzant la tècnica de fixació de voltatge amb dos elèctrodes (apartat 4 de la secció Materials i mètodes), es va fixar el potencial de membrana dels

oòcits a -80 mV i es va enregistrar l'efecte de l'aplicació de 5 μ l de sèrum directament sobre la membrana de la cèl·lula. El sèrum complet quedava dissolt en els 200 μ l solució de registre Ringer-Ba²⁺ que hi havia en la cambra on es col·locava l'oòcit. El registre es duia a terme amb el sistema de perfusió apagat i tenia una durada de 2.5 min.

Els sèrums utilitzats en l'estudi provenien de 14 individus control sans, 14 pacients amb ELA, 1 pacient amb MG, 1 pacient amb PBP i 4 pacients amb LMND i van ser descomplementats i dialitzats abans d'iniciar els experiments.

Prèviament a la utilització dels sèrums es comprovava que, en cada un dels oòcits control enregistrats, no es generava cap tipus de resposta deguda a l'aplicació dels agonistes del receptor de glutamat (100 μ M àcid L-glutàmic/ 10 μ M glicina), els quals s'aplicaven per perfusió, dissolts en la solució de registre, durant 25 s (Figures R-2A i B). L'aplicació de sèrum control, en canvi, activava la generació de corrents d'entrada de tipus oscil·latori (Figura R-2C), tal com s'havia descrit en els treballs esmentats anteriorment. El tret diferencial va ser que, en aplicar el sèrum ELA, els corrents generats tenien una càrrega elèctrica dues vegades superior a la observada en el cas dels corrents generats pel sèrum control (Figura R-2D).

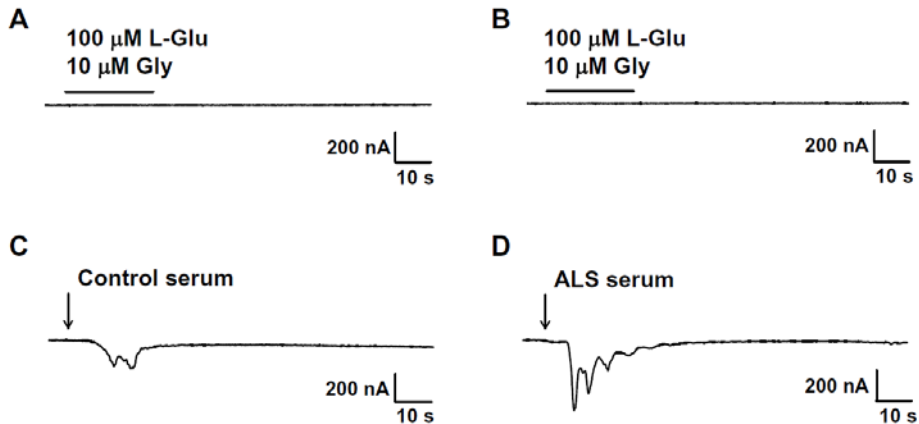


Figura R-2. Corrents activats per sèrums provinents d'individus sans (control) i pacients amb ELA (ALS) en oòcits de *Xenopus* injectats amb aigua DEPC. (A,B) L'aplicació de 100 μM d'àcid L-glutàmic (L-Glu) / 10 μM glicina (Gly) no induïx la generació de cap tipus de corrent en els oòcits injectats amb aigua. **(C)** Registre d'un corrent de membrana de l'oòcit que es mostra a l'apartat (A) estimulat amb sèrum control (fletxa). **(D)** Registre obtingut amb sèrum ELA en el mateix oòcit que es mostra a l'apartat (B), la fletxa indica l'aplicació del sèrum.

En la gran majoria de casos, l'aplicació de sèrum, tan control com ELA, generava corrents de resposta ràpida, caracteritzats per un pic inicial d'amplitud força gran que es recuperava ràpidament, seguit per una sèrie d'oscil·lacions transitòries del corrent de cinètica més lenta.

L'any 1992, Tigyi i Miledi van descriure que aquests corrents oscil·latoris generats en els oòcits de *Xenopus* per acció del sèrum eren deguts a l'acció d'un factor sèric anomenat àcid lisofosfatídic o lisofosfatidat (LPA). L'LPA actua mitjançant el seu propi receptor present a la membrana dels oòcits, el qual està acoblat a la via de senyalització de la PLC i el PIP₂, provocant l'alliberació de Ca²⁺ dels compartiments intracel·lulars i la conseqüent activació dels canals de Cl⁻ dependents de Ca²⁺, endògens en aquestes cèl·lules. Així doncs, la generació de corrents oscil·latoris de Cl⁻ seria directament proporcional a la

mobilització de Ca^{2+} intracel·lular. A més quantitat de Ca^{2+} alliberat, més quantitat de canals de Cl^- dependents de Ca^{2+} activats, amb el conseqüent augment en el nombre de càrregues elèctriques dels corrents generats.

Es van mesurar els corrents activats pels 14 sèrums control. La mitjana i SEM de la càrrega elèctrica suportada per cadascun dels corrents es poden observar a la figura R-3A. Els sèrums control generaven corrents amb una càrrega elèctrica de $4.11 \pm 0.17 \mu\text{C}$, $n=97$ oòcits, mentre que els sèrums ELA produïen uns corrents amb una càrrega elèctrica de $8.12 \pm 0.2 \mu\text{C}$, $n=93$ (Figura R-3B).

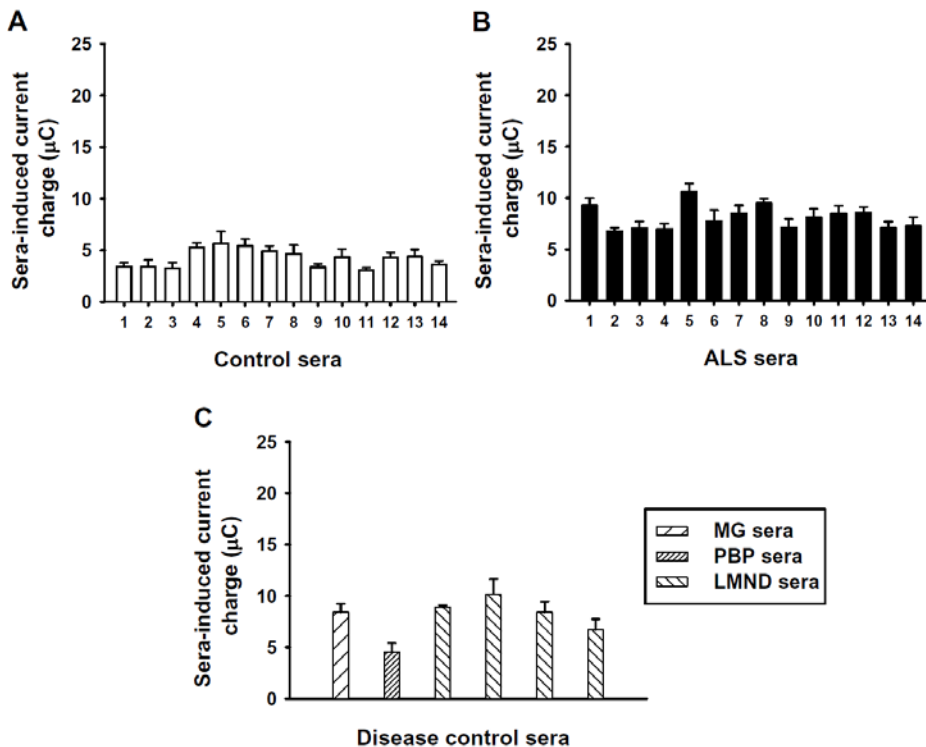


Figura R-3. Càrrega elèctrica suportada pels corrents activats per sèrums control i patològics en els oòcits de *Xenopus* injectats amb aigua DEPC. (A) Histograma que representa la càrrega elèctrica dels corrents activats per sèrums provinents de 14 voluntaris sans, cada barra correspon a l'acció d'un únic sèrum en, almenys, 6 oòcits. **(B)** Resultats obtinguts amb les mostres de sèrum de 14 pacients amb ELA. Cada barra representa l'acció d'un únic

sèrum ELA sobre, almenys, 6 oòcits. **(C)** L'efecte de sèrums provinents de pacients amb altres malalties de la MN com MG, PBP i LMND també es va enregistrar. Cada barra correspon a l'acció d'un únic sèrum corresponent a la malaltia indicada en, almenys, 7 oòcits.

Els sèrums de pacients amb MG, PBP i LMND es van utilitzar com a control de malaltia i el seu efecte sobre els oòcits injectats amb aigua DEPC també es va enregistrar. Els sèrums MG, PBP i LMND generaven corrents amb una càrrega elèctrica de $8.40 \pm 0.82 \mu\text{C}$ ($n=10$), $4.52 \pm 0.87 \mu\text{C}$ ($n=10$), and $8.51 \pm 0.52 \mu\text{C}$ ($n=22$), respectivament (Figura R-3C).

Cal destacar que, tal com s'havia observat en el cas del sèrums ELA, els sèrums MG i LMND generaven també un increment en la càrrega elèctrica dels corrents respecte del sèrums de voluntaris sans. El sèrum PBP, en canvi, no produïa aquest efecte, i la resposta generada no es diferenciava de la observada en el cas de les mostres de sèrum control.

1.4 Efecte dels sèrums humans control i patològics en oòcits de *Xenopus* que expressen el NMDAR.

Per determinar l'existència d'algun efecte específic dels sèrums ELA en els NMDARs, es van reproduir els experiments esmentats a l'apartat anterior, en aquest cas, utilitzant oòcits que expressaven el receptor GluN1/GluN2A a la membrana.

Inicialment es va comprovar l'expressió del receptor perfonent les cèl·lules amb la solució $100 \mu\text{M}$ àcid L-glutàmic/ $10 \mu\text{M}$ glicina, la qual activava corrents d'entrada glutamatèrgics amb una amplitud màxima de $0.4 \pm 0.04 \mu\text{A}$ i una càrrega elèctrica de $8.90 \pm 0.78 \mu\text{C}$, $n=122$ (Figures R-4A i B). Es va enregistrar en els mateixos oòcits l'efecte dels sèrums control i ELA, els quals induïen, de nou, l'activació de corrents d'entrada de tipus oscil·latori (Figures R-4C i D).

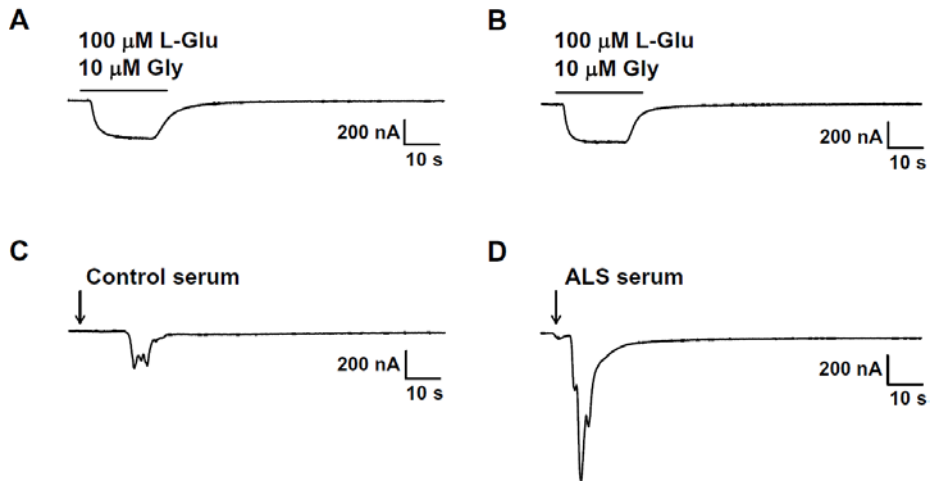


Figura R-4. Corrents activats per sèrums provinents d'individus sans (control) i pacients amb ELA en oòcits de *Xenopus GluN1/GluN2A*. (A,B) L'aplicació de 100 μM L-Glu/10 μM Gly activa corrents d'entrada reversibles en els oòcits injectats amb el NMDAR. (C) Registre d'un corrent de membrana de l'oòcit que es mostra a l'apartat (A) estimulat amb sèrum control (fletxa). (D) Registre obtingut amb sèrum ELA, la fletxa indica l'aplicació de sèrum en l'oòcit que es mostra a l'apartat (B).

Cal remarcar en aquest cas que, tot i que ambdós tipus de sèrum continuaven activant corrents de tipus oscil·latori, l'efecte del sèrum control no variava respecte l'observat en absència del receptor de glutamat, i, en canvi, el sèrum ELA, activava corrents amb una càrrega elèctrica molt més gran quan el receptor era present en la cèl·lula, sent aquesta càrrega 3 vegades superior a la observada en el cas de les mostres control en aquests oòcits.

Per tal de caracteritzar els corrents activats per sèrum en presència del NMDAR vàrem mesurar el seu potencial de reversió aplicant polsos de sèrum en els oòcits fixats a diferents voltatges de membrana (Figura R-5). El potencial de reversió dels corrents activats per sèrum control va ser de -32.90 ± 2 mV (n=4) i el dels corrents activats per sèrum ELA va

ser de -30.05 ± 2 mV ($n=4$), tots dos propers al potencial d'equilibri del clorur descrit en oòcits de *Xenopus* (~ -30 mV) (Barish, 1983).

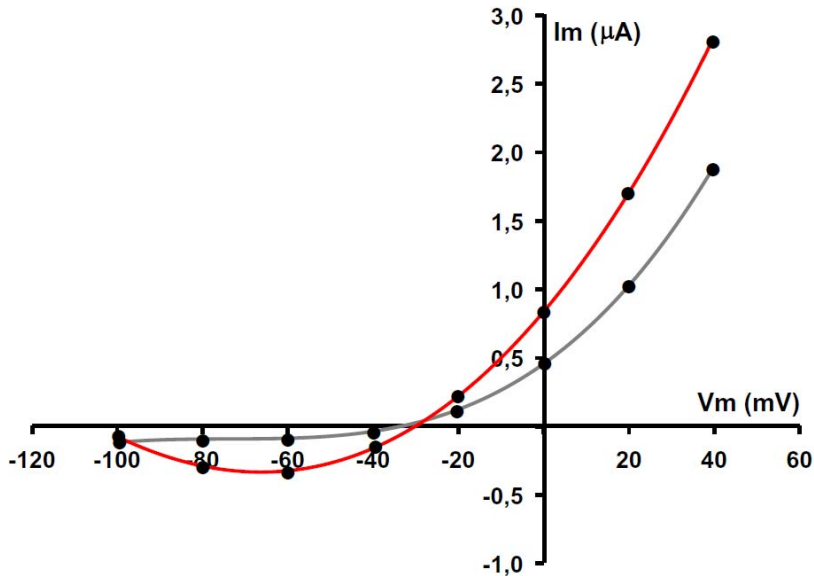


Figura R-5. Relació Intensitat de corrent-Voltatge (I-V) dels corrents activats per sèrum en oòcits que expressen el receptor GluN1/GluN2A. Relació I-V d'un corrent activat per sèrum control (gris) i un activat per sèrum ELA (vermell) en oòcits injectats amb el NMDAR. Les relacions I-V es generaven en resposta a l'aplicació de 5 µl de sèrum en els oòcits fixats a diferents potencials de membrana que anaven des de -100 mV fins a + 40 mV. El període de rentat entre polsos de sèrum, amb el conseqüent canvi de voltatge de membrana, era de 10 min. Im, Intensitat del corrent de membrana, Vm, voltatge de membrana.

Els potencials de reversió dels corrents activats per sèrum en presència del NMDAR coincidien amb els caracteritzats per Miledi i Parker, l'any 1989, en oòcits injectats amb aigua, confirmant que els corrents oscil·latoris eren deguts, en gran part, a mobilització d'ions clorur.

La càrrega elèctrica dels corrents generats pels sèrums control va ser de 4.22 ± 0.20 µC, $n=56$, mentre que la dels sèrums ELA va ser de 14.60 ± 0.60 µC, $n=76$ (Figures R-6A i B). En el cas dels sèrums MG, PBP i LMND,

els corrents generats tenien unes càrregues elèctriques de $8.60 \pm 0.81 \mu\text{C}$ ($n=10$), $4.93 \pm 1.52 \mu\text{C}$ ($n=10$), i $9.21 \pm 0.90 \mu\text{C}$ ($n=17$), respectivament (Figura R-6C).

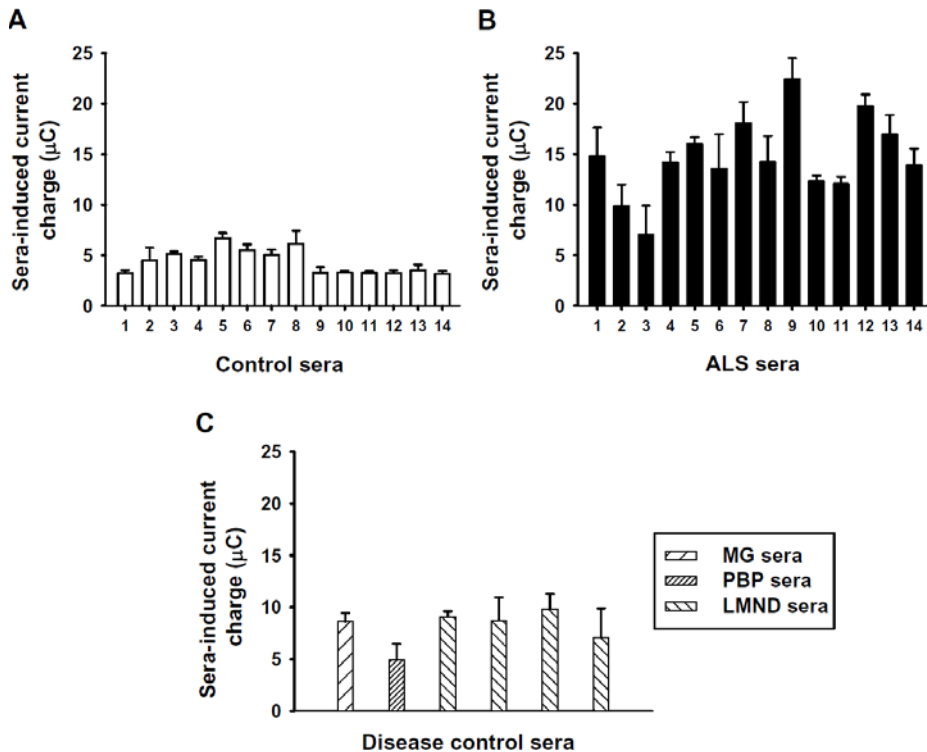


Figura R-6. Càrrega elèctrica suportada pels corrents activats per sèrums control i patològics en els oòcits de *Xenopus GluN1/GluN2A*. (A) Histograma que representa la càrrega elèctrica dels corrents activats per sèrums provinents de 14 voluntaris sans, cada barra correspon a l'acció d'un únic sèrum en, almenys, 6 oòcits. **(B)** Resultats obtinguts amb les mostres de sèrum de 14 pacients amb ELA. Cada barra representa l'acció d'un únic sèrum ELA sobre, almenys, 6 oòcits. **(C)** L'efecte de sèrums provinents de pacients amb altres malalties de la MN com MG, PBP i LMND també es va enregistrar. Cada barra correspon a l'acció d'un únic sèrum corresponent a la malaltia indicada en, almenys, 7 oòcits.

Després dels registres vam poder observar que, de la mateixa manera que passava amb les mostres de sèrum control, la càrrega elèctrica

dels corrents generats per sèrums MG, PBP i LMND en presència del receptor GluN1/GluN2A no es diferenciava de la observada en el cas dels oòcits control.

1.5 Potenciació dels corrents oscil·latoris de membrana per acció del sèrum ELA en presència del NMDAR.

Els sèrums de pacients amb ELA, MG i LMND activaven una resposta significativament superior a la observada en el cas de sèrums control tan en oòcits injectats amb aigua DEPC com amb el receptor GluN1/GluN2A (Figura R-7).

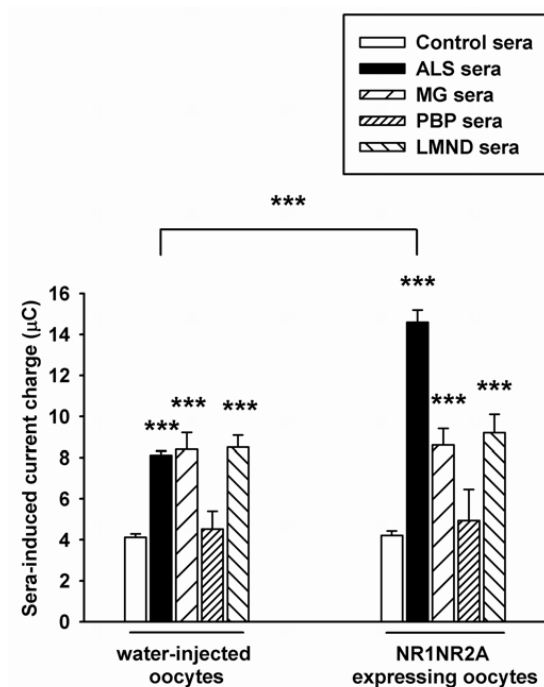


Figura R-7. El sèrum ELA potencia els corrents de membrana en els oòcits de *Xenopus* GluN1/GluN2A. A la part esquerra de la figura es mostra un histograma que representa la mitjana de la càrrega elèctrica dels corrents generats per sèrums control, ELA, MG, PBP i LMND de les figures R-3A, B i C en oòcits control. A la part dreta de la figura es mostra un altre histograma amb la mitjana de les dades representades a les figures R-6A, B i C per als mateixos tipus de sèrum i en presència del receptor de glutamat, n=398 oòcits. ***p<0.001

En ambdós tipus d'oòcits, el sèrum PBP mostrava la mateixa resposta que el sèrum control, indicant que l'especificitat de l'efecte observat es trobaria en un altre tipus de sèrum, tot i això, s'ha de tenir en compte que tan per la mostra PBP com per la mostra MG disposàvem d'una $n=1$ i per tant els resultats no serien del tot concloents per aquestes dues patologies.

Podem observar, però, que mentre que les mostres MG i LMND generaven uns corrents de membrana incrementats significativament respecte dels observats en el cas de les mostres control i PBP, aquest efecte era independent de la presència del receptor de glutamat, i tan sols les mostres de sèrum ELA generaven un increment significatiu de la resposta obtinguda en oòcits GluN1/GluN2A respecte dels injectats amb aigua.

1.6 Especificitat del sèrum ELA pel NMDAR.

Per caracteritzar aquesta resposta al sèrum ELA en presència del receptor de glutamat, es van enregistrar els corrents generats en oòcits que expressaven tan sols una de les seves subunitats, GluN1 o GluN2A, comparant-ho amb la resposta obtinguda amb el receptor format per ambdues subunitats.

El sèrum control activava corrents oscil·latoris d'entrada, en els oòcits GluN1/GluN2A, amb una càrrega elèctrica de $4.35 \pm 0.41 \mu\text{C}$, $n=10$ (Figura R-8A), mentre que el valor obtinguts amb el sèrum ELA era gairebé 4 vegades més gran, $16.73 \pm 0.93 \mu\text{C}$, $n=10$ (Figura R-8B).

En els oòcits que expressaven la subunitat GluN1, els sèrums control i ELA activaven respostes amb una càrrega elèctrica de $4.63 \pm 0.87 \mu\text{C}$ ($n=10$), i $8.87 \pm 0.57 \mu\text{C}$ ($n=10$), respectivament (Figures R-8C i D). Es van obtenir valors similars amb els oòcits que expressaven la subunitat GluN2A: $4.85 \pm 0.81 \mu\text{C}$, $n=10$, pel sèrum control, i $8.47 \pm 0.76 \mu\text{C}$, $n=10$ pel sèrum ELA (Figura R-8E i F). Aquests resultats es resumeixen a les figures R-8G i H.

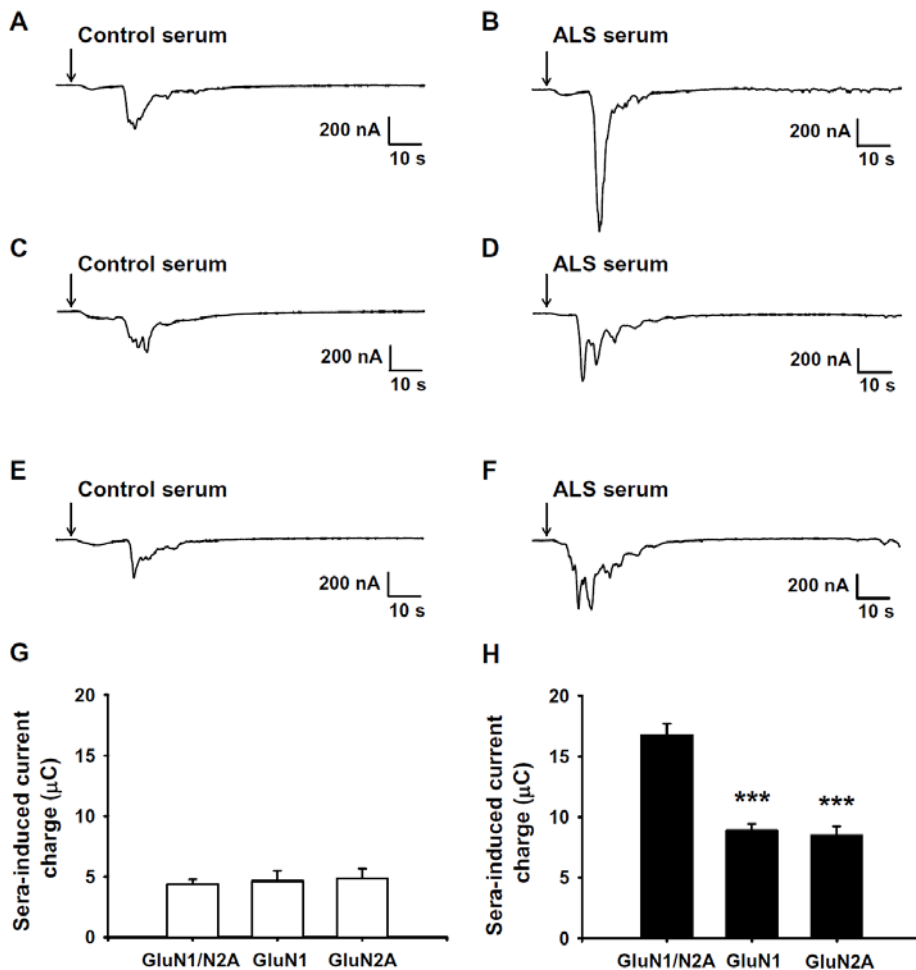


Figura R-8. Corrents activats per sèrums control i ELA en oòcits de *Xenopus* que expressen la subunitat GluN1, la subunitat GluN2A o ambdues subunitats del NMDAR. Tan el sèrum control (A) com el sèrum ELA (B) activen corrents oscil·latoris en oòcits que expressen, simultàniament, les subunitats GluN1 i

GluN2A. Els sèrums control i ELA generen respostes en oòcits que expressen tan sols una de les subunitats, **(C i D)** oòcits que expressen GluN1, **(E i F)** oòcits que expressen GluN2A. **(G i H)** Quantificació dels corrents activats per sèrum en les diferents condicions. Cada sèrum ha estat provat en, almenys, 7 oòcits. La fletxa correspon al moment precís en que el sèrum va ser aplicat a la cambra de registre. *** $p < 0.001$

Amb aquests experiments vàrem observar que la resposta al sèrum control no variava, independentment de l'absència d'alguna de les subunitats del receptor GluN1/GluN2A en els oòcits. Contràriament, la resposta al sèrum ELA es veia significativament disminuïda quan el receptor no estava completament format i era similar a la observada en oòcits control per l'acció d'aquest tipus de sèrum.

Per aprofundir en la caracterització de l'acció del sèrum ELA en el NMDAR vàrem utilitzar l'MK-801, un antagonista no competitiu del receptor. En oòcits GluN1/GluN2A obteníem corrents amb càrregues elèctriques de $4.32 \pm 0.32 \mu\text{C}$, $n=14$, per acció del sèrum control (Figura R-9A) i de $14.64 \pm 1.05 \mu\text{C}$, $n=14$, per acció del sèrum ELA (Figura R-9B). Cada oòcit es va incubar amb una solució $10 \mu\text{M}$ de l'antagonista durant 10 min i seguidament es va estimular amb la solució d'agonistes del NMDAR per comprovar el bloqueig del receptor. Després de rentar els agonistes, però mantenint el MK-801 a la cambra de registre, de nou es van estimular els oòcits amb sèrum. Es va observar l'activació de corrents oscil·latoris amb una càrrega elèctrica de $4.88 \pm 0.52 \mu\text{C}$, $n=10$, per acció del sèrum control (Figura R-9C) i de $8.25 \pm 1.08 \mu\text{C}$, $n=10$, per acció del sèrum ELA (Figura R-9D).

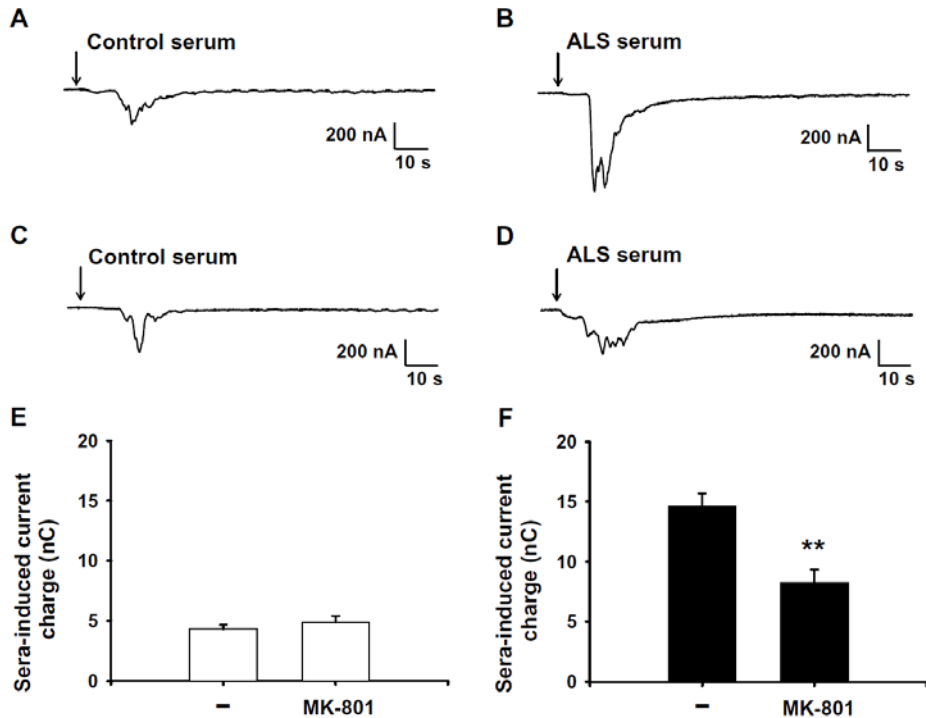


Figura R-9. Bloqueig dels corrents activats per sèrum en oòcits GluN1/GluN2A. Efecte del MK-801. (A,B) Tal com s'ha mostrat en imatges anteriors, els sèrums control i ELA activen corrents oscil·latoris en oòcits que expressen el NMDAR. (C,D) Després d'incubar durant 10 min amb l'MK-801 els mateixos oòcits dels apartats A i B, s'enregistra altre cop l'efecte de sèrums control i ELA. (E,F) Mitjana i SEM de la càrrega elèctrica dels corrents generats per sèrum control (barres blanques) i sèrum ELA (barres negres) en oòcits tractats o no tractats amb MK-801. Cada barra representa l'acció del sèrum en almenys 7 oòcits. La fletxa indica el moment exacte en que el sèrum és afegit a la cambra de registre. ** $p < 0.01$

Tal com es pot observar a les figures R-9E i F, el bloqueig del receptor per MK-801 no afectava la resposta generada per sèrum control, en canvi hi havia una disminució significativa en el cas del sèrum ELA, indicant que era necessària la forma activa del NMDAR per arribar als nivells de resposta observats per aquest tipus de sèrum.

1.7 Efecte de les Immunoglobulines G de sèrums humans control i patològics en oòcits de *Xenopus* que expressen el NMDAR.

Per tal de determinar quina part del sèrum era la responsable dels efectes observats, es va procedir al fraccionament de les mostres i es va purificar la fracció de IgG.

Les IgG de ELA han estat relacionades amb processos de degeneració estructural de MN i alteracions de la plasticitat sinàptica, amb implicació de mobilització de Ca^{2+} intracel·lular, en diferents treballs (Pagani et al., 2006, Pullen et al., 2004, Fratantoni et al., 2000).

Cal dir que en aquest punt de l'estudi comptàvem amb un factor limitant que era la poca quantitat de mostra disponible, així que es va dur a terme la purificació de la fracció de IgG de 6 sèrums control i 4 sèrums ELA. La metodologia va ser la mateixa que en els experiments anteriors.

A diferència de l'efecte observat amb el sèrum complet, les IgG control activaven corrents d'entrada petits, no oscil·latoris i de curta durada, en oòcits injectats amb aigua i amb el receptor GluN1/GluN2A (Figura R-10A), amb unes càrregues elèctriques de $1.67 \pm 0.11 \mu\text{C}$, $n=61$, i de $1.57 \pm 0.15 \mu\text{C}$, $n=30$, respectivament (Figures R-10B i C). Les IgG de ELA també activaven aquest tipus de corrents en oòcits control i en presència del NMDAR (Figura R-10A), amb unes càrregues elèctriques de $1.85 \pm 0.23 \mu\text{C}$, $n=23$, i de $4.02 \pm 0.39 \mu\text{C}$, $n=28$, respectivament (Figures R-10B i C). Aquests resultats estan resumits a la figura R-10D.

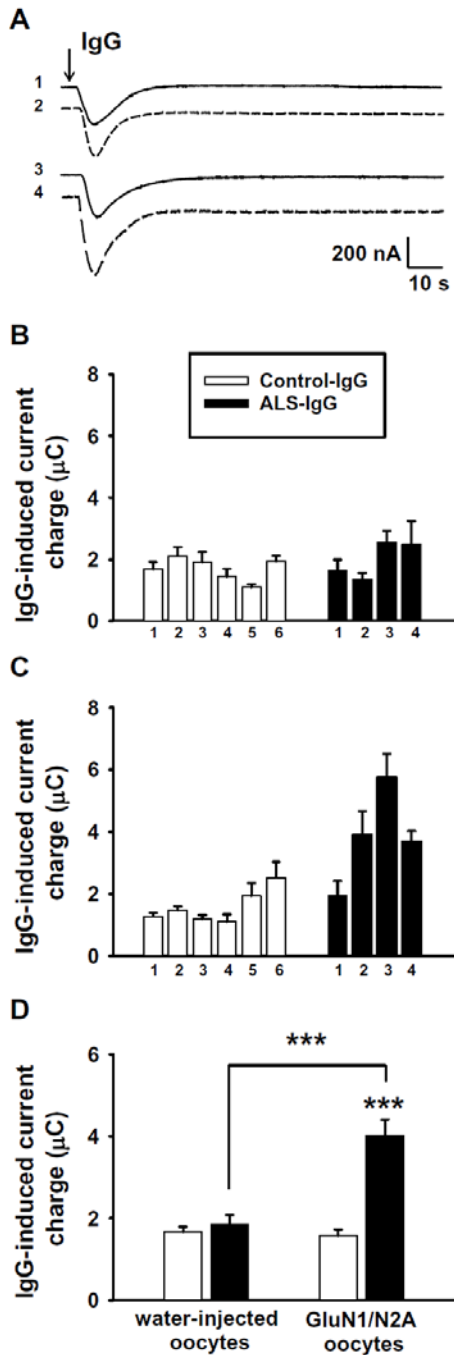


Figura R-10. Corrents activats per la fracció de IgG de sèrums control i ELA. (A) Registres de corrents de membrana en oòcits de *Xenopus* degut a l'aplicació (fletxa) de IgG control (línia continua) i ELA (línia discontinua). Tan control com ELA-IgG generen corrents d'entrada no oscil·latoris en els oòcits injectats amb aigua (1 i 2) o amb el receptor GluN1/GluN2A (3 i 4). **(B)** Mitjana i SEM de la càrrega elèctrica dels corrents activats per IgG control i ELA en oòcits control. **(C)** Mitjana i SEM de la càrrega elèctrica dels corrents activats per IgG control i ELA en oòcits que expressen el NMDAR. **(D)** Histograma que representa la mitjana de l'efecte de totes les IgG control i ELA en oòcits injectats amb aigua o amb GluN1/GluN2A (n=69 oòcits). ***p<0.001

Tal com havíem observat en el cas del sèrum complet control, la resposta originada per la fracció IgG control no mostrava diferències

significatives en presència o absència del NMDAR. En aquest cas, però, tampoc existien diferències significatives entre IgG control i ELA en absència del receptor, diferint del resultat obtingut en el sèrum complet.

El fet que les IgG de ELA generaven respostes dues vegades superiors en presència del receptor GluN1/GluN2A respecte de les IgG control, i, tot i que aquest tipus de resposta contrasta amb la observada amb el sèrum complet ELA, ens indicaria que les IgG de ELA també estarien implicades en el procés de mobilització de Ca^{2+} intracel·lular dependent de NMDAR que es traduïa dels resultats obtinguts amb el sèrum complet.

1.8 Efecte del sèrum de rates transgèniques mSOD1 G93A en oòcits de *Xenopus* que expressen el NMDAR.

Continuant amb l'estudi i per tal d'esbrinar mecanismes patològics comuns entre la ELA esporàdica i la ELA de tipus familiar, vàrem reproduir els experiments utilitzant sèrums del model animal de la malaltia. Les mostres van ser cedides per la Dra. Anna Casanovas del Departament de Neurobiologia Cel·lular de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida-IRBLLEIDA, i van ser descomplementades i dialitzades en aquest mateix laboratori. Es van analitzar mostres de rates WT i mSOD1 G93A a diferents edats: P30, P60, P90 i P120 dies post natal.

Tal com s'havia observat amb les mostres humanes, el sèrum de rata activava corrents d'entrada de tipus oscil·latori en el oòcits.

La càrrega elèctrica dels corrents activats per sèrum WT a P30, P60, P90 i P120 en els oòcits control va ser de $9.33 \pm 0.64 \mu\text{C}$, ($n=28$), $10.02 \pm 0.83 \mu\text{C}$ ($n=23$), $8.63 \pm 0.58 \mu\text{C}$ ($n=32$), i $9.97 \pm 0.81 \mu\text{C}$ ($n=22$), respectivament, mentre que en el cas de sèrums mSOD1 G93A va ser

de $10.99 \pm 0.66 \mu\text{C}$ ($n=35$), $9.54 \pm 0.86 \mu\text{C}$ ($n=17$), $10.44 \pm 0.85 \mu\text{C}$ ($n=22$) i $12.06 \pm 0.99 \mu\text{C}$ ($n=22$), respectivament (Figura R-11A).

En presència del NMDAR, el sèrum WT a P30, P60, P90 i P120 activava respostes amb una càrrega elèctrica de $19.19 \pm 1.66 \mu\text{C}$ ($n=15$), $19.252 \pm 1.35 \mu\text{C}$ ($n=18$), $17.02 \pm 1.71 \mu\text{C}$ ($n=15$) i $18.70 \pm 1.25 \mu\text{C}$ ($n=21$), respectivament, mentre que la activada per sèrum transgènic era de $25.17 \pm 1.61 \mu\text{C}$ ($n=19$), $18.18 \pm 1.31 \mu\text{C}$ ($n=19$), $16.93 \pm 1.07 \mu\text{C}$ ($n=20$) and $19.41 \pm 1.44 \mu\text{C}$ ($n=21$), respectivament (Figura R-11B).

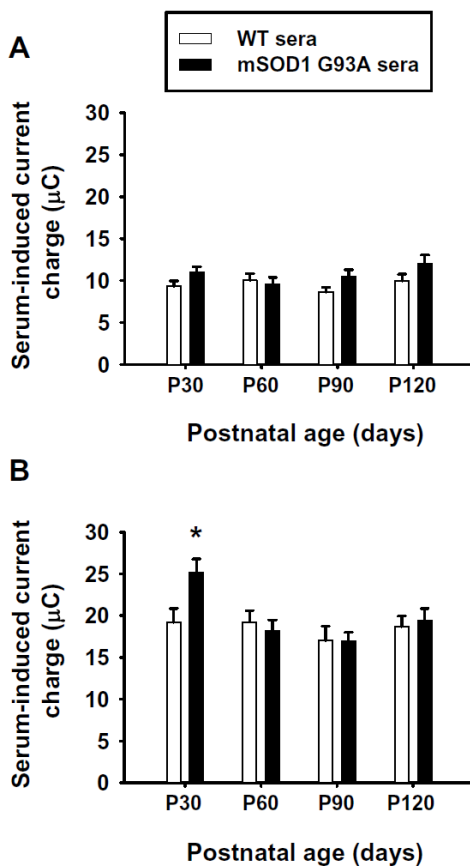


Figura R-11. Corrents activats per sèrum de rates WT i mSOD1 G93A. (A) Mitjana i SEM de la càrrega elèctrica dels corrents activats per sèrum de rates WT i mSOD1 G93A en oòcits injectats amb aigua. Cada barra representa l'acció del sèrum corresponent en, almenys, 15 oòcits. Les edats post natal examinatees van ser les següents: P30, P60, P90 i P120. **(B)** Mitjana i SEM de la càrrega elèctrica dels corrents activats per sèrum de rates WT i mSOD1 G93A en oòcits GluN1/GluN2A. Cada barra representa l'acció del sèrum corresponent en, almenys, 15 oòcits. * $p < 0.05$

Vam observar que no hi havien diferències significatives entre les respostes generades per sèrum WT i mSOD1 G93A en absència del

receptor a cap de les edats testades. En canvi, en presència del NMDAR a P30 hi havia un increment significatiu en la càrrega del corrents generats per sèrum de rata transgènica.

1.9 Facilitació de la resposta glutamatèrgica per acció del sèrum.

L'acció del sèrum en els oòcits que expressaven el NMDAR tenia un efecte addicional sobre la resposta glutamatèrgica. Durant els experiments vam observar que els corrents suportats pel NMDAR incrementaven després de l'exposició a sèrum.

L'aplicació de 100 μ M d'àcid L-glutàmic/10 μ M glicina en els oòcits GluN1/GluN2A activava corrents d'entrada reversibles (Figura R-12A). L'oòcit era tractat amb sèrum i després es procedia a un rentat de 3 min amb solució de registre seguit d'una segona aplicació de la solució d'agonistes del NMDAR. Els resultats corresponents a aquesta segona aplicació estan resumits a la figura R-12B. L'increment en la càrrega elèctrica dels corrents activats a través del NMDAR després de l'estimulació dels oòcits amb sèrum control, ELA, MG, PBP i LMND era de 249.47 ± 10.74 %, n=48 oòcits, 269.24 ± 11.64 %, n=74, 216.84 ± 32.37 %, n=18, 139.25 ± 2.31 %, n=15, 213.98 ± 11.18 %, n=22, respectivament.

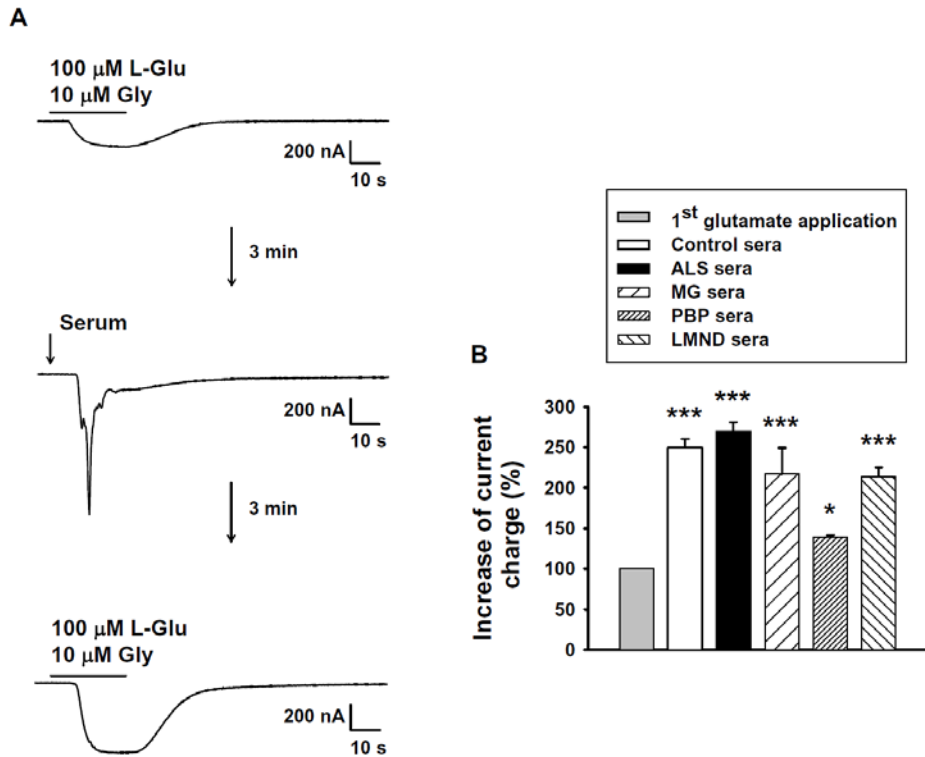


Figura R-12. Potenciació dels corrents generats a través del receptor GluN1/GluN2A per acció del sèrum. (A) L'aplicació de la solució d'agonistes del NMDAR activa corrents d'entrada glutamatèrgics en oòcits GluN1/GluN2A i fixats a -80 mV. Després d'un estímul de 5 μ l de sèrum i d'un període de rentat de 3 min, els corrents generats per una segona aplicació dels agonistes es veuen incrementats. **(B)** Mitjana i SEM de l'increment en la càrrega elèctrica dels corrents activats per àcid L-glutàmic i glicina després d'estimular els oòcits amb sèrum control, ALS, MG, PBP i LMND. n=177 oòcits. * p<0.05, *** p<0.001

Com es pot veure a la figura R-12, tots els sèrums provocaven un increment significatiu en la càrrega elèctrica dels corrents a través de GluN1/GluN2A, sensibilitzant la membrana de la cèl·lula a la segona aplicació dels agonistes de NMDAR i facilitant els corrents glutamatèrgics.

Aquest efecte de potenciació degut al sèrum, que involucra l'activació de la PKC i la CaMkII per acció del LPA, ha estat ja descrit

en oòcits de *Xenopus* que expressaven receptors d'ACh i AMPA (Nishizaki et al., 1997, Nishizaki i Sumikawa, 1997).

**2. *Detecció d'autoanticossos circulants
en sèrums patològics ELA***

En un treball publicat aquest mateix any pel Departament de Neurobiologia Cel·lular de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida-IRBLLEIDA (Hernández et al., 2010), amb el qual col·laborem, s'ha descrit, per anàlisis proteòmiques, la presència en sèrums ELA d'anticossos circulants contra diferents proteïnes de la família de les Semaforines.

En els primers experiments d'aquest treball es va descriure que l'administració, *in ovo*, de IgG o fluid cerebrospinal de pacients amb ELA i LMND produïa un efecte rescatador de les MN del corn ventral de la medulla espinal lumbar durant el període de mort cel·lular programada (període comprés entre el dies embrionaris E6 i E10), en el model experimental d'embrió de pollastre.

Així mateix l'administració de sèrum ELA i LMND produïa un increment de la ramificació nerviosa intramuscular dels músculs innervats per les MN lumbars.

Per WB es va estudiar la unió dels sèrums patològics a proteïnes presents en diferents teixits (cor, múscul, intestí, ronyó, fetge, pulmó, medulla espinal i cervell) de l'embrió de pollastre a E10 i es va observar que els anticossos presents en el sèrum reconeixien selectivament antígens de cervell i medulla espinal, sent la fracció de IgG la responsable de la unió. Ni el sèrum complet ni les IgG de mostres control mostraven reconeixement per cap dels teixits analitzats.

La fracció proteica de les mostres de teixit reconegudes per les IgG es va separar per Electroforesi Bidimensional (2D), mentre que per WB, utilitzant com a anticòs primari sèrums patològics, es van aïllar les proteïnes reconegudes per aquests. Utilitzant l'espectrometria de masses MALDI-TOF es va determinar que la fracció d'IgG de sèrums ELA i LMND reconeixia proteïnes de la família de les Semaforines o proteïnes relacionades amb les seves vies de senyalització (Taula R-2).

Taula R-2. Proteïnes reconegudes per sèrums patològics ELA i LMND (Hernández et al., 2010)

SERUM	IDENTIFIED PROTEIN
#5 (LMD)	Collapsin response mediator protein 1B
#4 (ELA)	Semaphorin 3A precursor (Collapsin 1)
#6 (ELA)	Semaphorin 3D precursor (Collapsin 2)
#7 (ELA)	Semaphorin 3E precursor (Collapsin 5)

Proteïnes identificades per anàlisi MALDI-TOF, posterior a l'electroforesi 2D i el WB, reconegudes per cada un dels 3 sèrums ELA (ELA) i pel sèrum LMND (LMD) analitzats en l'estudi.

Les Semaforines són una família de proteïnes secretades o associades a membrana que actuen com a molècules de guia del creixement axonal. Descrites inicialment com proteïnes quimiorepel·lents o inhibidores, s'ha observat que també poden exercir senyals de tipus atraient, tot afectant la direcció de creixement, la fascicul·lació i ramificació de l'axó, així com la formació de la sinapsi.

La capacitat dels anticossos contra Semaforina, presents en el sèrum, de neutralitzar les molècules d'aquesta família amb activitat quimiorepel·lent (com les Semaforines de classe 3), respondria el perquè de l'estímul de la ramificació axonal i la supervivència de les MN observada en els embrions de pollastre exposats als sèrums ELA i LMND.

Tanmateix, en els últims anys s'ha postulat que una expressió aberrant o una disfunció de les proteïnes encarregades del control del creixement axonal, com són les Semaforines, podria contribuir als mecanismes patogènics observats en la ELA (Schmidt et al., 2009). Mes concretament, s'ha descrit que la sobreexpressió de Semaforina 3A (Sema3A) està selectivament induïda en cèl·lules de Schwann terminals d'un subtipus específic de fibres musculars, anomenades "fast-fatigable" o fibres de tipus IIb i IIx, en el model de ratolí mSOD1 G93A (De Winter et al., 2006). L'expressió de Sema3A no només

inhibeix la plasticitat a nivell del terminal nerviós d'aquestes sinapsis sinó que afavoreix la denervació axonal i la degeneració de les MN en estadis primerencs de la malaltia.

En aquesta segona part de l'estudi es va dissenyar un assaig d'ELISA per tal de determinar la presència d'anticossos contra Sema3A en pacients amb ELA i altres malalties de la MN i avaluar la seva rellevància clínica i especificitat.

2.1 Unió d'anticossos circulants en sèrums patològics a pèptids de Sema3A. Assaigs d'ELISA.

Degut a que la única proteïna comercial que existeix de Sema3A porta unida una regió constant Fc de IgG humana (1250-S3-025, R&D Systems, MN, USA) i que l'anticòs secundari adequat per unir-se als sèrums humans es també un anti-IgG humà, va ser impossible utilitzar-la en l'estudi. Per aquest motiu vàrem començar els experiments utilitzant dos pèptids sintètics que corresponien a diferents regions de la proteïna Sema3A humana. El pèptid Sema3A ab42768 corresponia a la regió central de la proteïna mentre que el pèptid Sema3A ab42770 corresponia a la regió C-terminal. Els sèrums es van provar en els assaigs d'ELISA utilitzant-los com a anticossos primaris contra aquests pèptids. Es van utilitzar 4 sèrums control, 1 sèrum PBP, 4 sèrums LMND i 9 sèrums ELA. Els resultats obtinguts amb el pèptid ab42768 es poden observar a les figures R-13 i R-14, mentre que els obtinguts amb el pèptid ab42770 es poden observar a les figures R-15 i R-16.

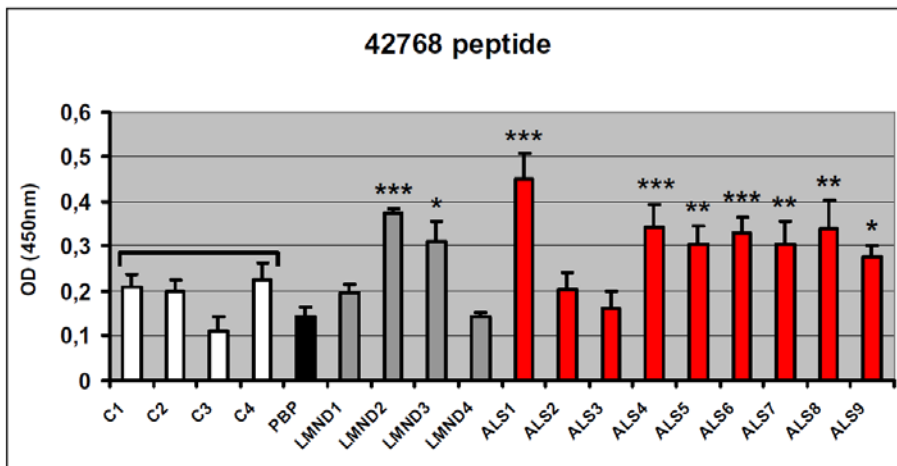


Figura R-13. Assaig d'ELISA per determinar la presència d'anticossos contra Sema3A en sèrums patològics utilitzant el pèptid ab42768. Cada barra representa un valor individual per mostra de sèrum, mitjana de 3 assaigs d'ELISA independents (amb 3 rèpliques per mostra cadascun) de la DO a 450 nm \pm SEM. Cadascuna de les mostres patològiques es va comparar amb la mitjana de les 4 mostres control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

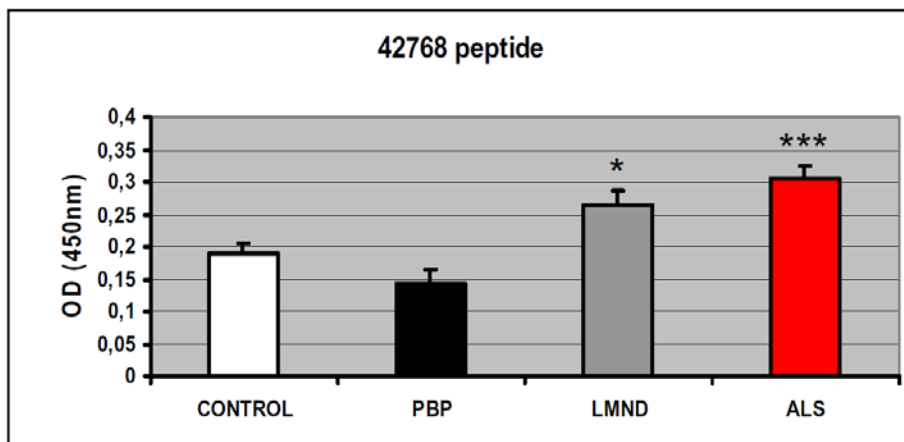


Figura R-14. Assaig d'ELISA per determinar la presència d'anticossos contra Sema3A en sèrums patològics utilitzant el pèptid ab42768. Cada barra representa el valor, agrupat per patologia o grup control, de la densitat òptica a 450 nm \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Vàrem observar que, utilitzant el pèptid 42768, hi havien diferències significatives pel que fa a la DO (la qual indica el grau de reconeixement de l'antigen, en aquest cas el pèptid corresponent a la regió central de la sema3A, per l'anticòs present en els sèrums) en 2 dels 4 sèrums LMND i en la majoria dels sèrums ELA respecte dels sèrums control (Figura R-13). No es van observar diferències entre mostres LMND i ELA en aquest cas. Cal destacar també que, tot i que no es van observar diferències significatives entre sèrums control i PBP, els valors de DO obtinguts eren força elevats.

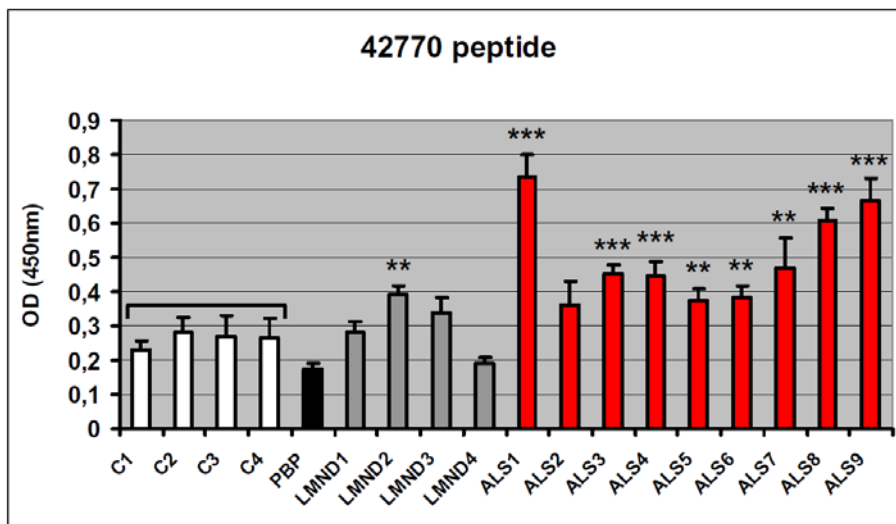


Figura R-15. Assaig d'ELISA per determinar la presència d'anticossos contra Sema3A en sèrums patològics utilitzant el pèptid ab42770. Cada barra representa un valor individual per mostra de sèrum, mitjana de 3 assaigs d'ELISA independents (amb 3 rèpliques per mostra cadascun) de la DO a 450 nm \pm SEM. Cadascuna de les mostres patològiques es va comparar amb la mitjana de les 4 mostres control. **p<0.01, ***p<0.001

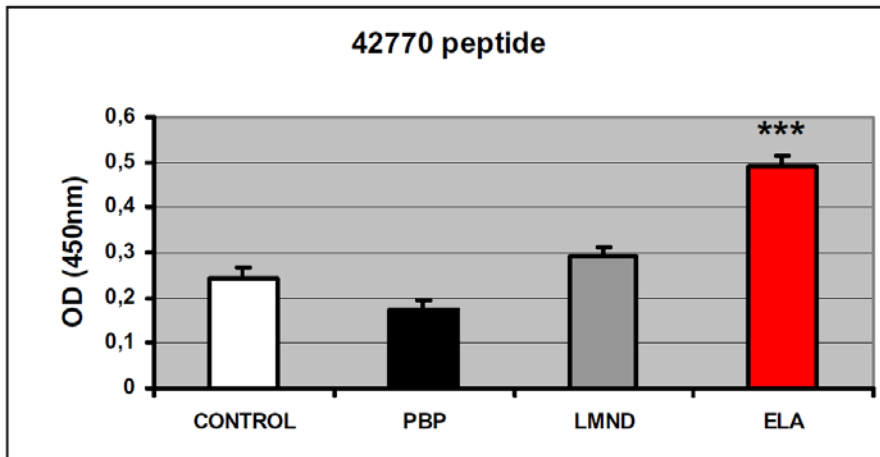


Figura R-16. Assaig d'ELISA per determinar la presència d'anticossos contra Sema3A en sèrums patològics utilitzant el pèptid ab42770. Cada barra representa el valor, agrupat per patologia o grup control, de la densitat òptica a 450 nm \pm SEM. *** $p < 0.001$

Utilitzant com a antigen en l'assaig d'ELISA el pèptid corresponent a l'extrem C-terminal de la Sema3A varem observar que totes les mostres de sèrum ELA, excepte una, mostraven valors de DO significativament superiors als de les mostres control (Figura R-15), es a dir, hi havia un reconeixement significatiu per part dels anticossos presents en els sèrums ELA del pèptid de Sema3A. En aquest cas, tan sols 1 dels sèrums LMND mostrava valors significativament superiors als dels controls, i de nou, no es mostraven diferències entre sèrums control i PBP. Hem de tenir en compte però, que tan sols disposàvem d'una única mostra PBP, i que les 4 mostres control mostraven uns valors de DO elevats, indicant certa unió inespecífica en l'assaig.

2.2 Producció de proteïna recombinant Sema3A en cèl·lules COS-7

Per tal d'evitar els possibles problemes d'inespecificitat amb els pèptids i confirmar la presència d'autoanticossos contra Sema3A en els sèrums patològics vam produir la proteïna recombinant al laboratori. Es van transfectar cèl·lules COS-7 amb el plasmidi que contenia la Sema3A de ratolí (la qual té una homologia del 95% amb la proteïna humana) unida a fosfatasa alcalina (Sema3A-AP). Les cèl·lules es van fer créixer durant 48 hores i es van seleccionar clons de cèl·lules transfectades per dilució límit en presència de l'antibiòtic permissiu corresponent. Es van obtenir els medis de diferents clons i es van concentrar per centrifugació. La presència de Sema3A-AP en els medis de cultiu es va detectar per WB (Figura R-17).

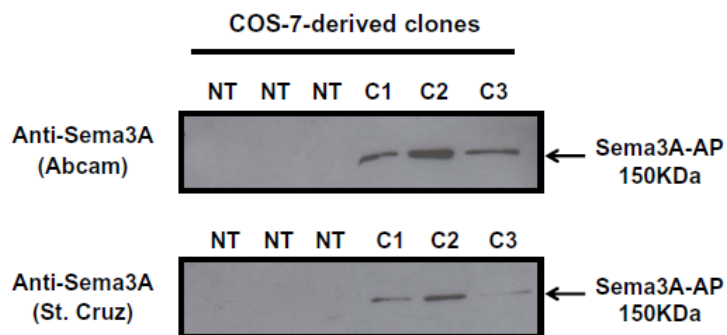


Figura R-17. Detecció per WB de Sema3A-AP en medis de cultiu de clons de cèl·lules COS-7 transfectades. Els 3 primers carrils corresponen a medi de cultiu de cèl·lules no transfectades (NT). C1, C2 i C3 corresponen a medis de cultiu de 3 clons diferents de cèl·lules COS-7 transfectades. Com a anticossos primaris s'han utilitzat dos anti-sema3A de dues cases comercials diferents (Abcam i St. Cruz).

Vàrem observar en el WB, utilitzant ambdós anticossos contra Sema3A dels que disponíem, que no apareixia cap banda corresponent a la

proteïna en els medis de cèl·lules no transfectades, utilitzats com a control negatiu. En canvi, en els 3 clons transfectats amb el plasmidi que vam provar apareixia una banda d'uns 150 kDa, pes corresponent a la proteïna de fusió Sema3A-AP.

2.3 Unió d'anticossos circulants en sèrums patològics a proteïna Sema3A recombinant. Assaigs d'ELISA.

En els primers assajos realitzats van haver-hi problemes en la unió de la proteïna en els pous de la placa d'ELISA, per això vam decidir aplicar el model de *Sandwich* del test.

Primer de tot vam mesurar quina era la combinació antígen-anticossos que donava una major resposta en la DO, indicativa de la detecció de Sema3A. Hi havia diferents combinacions a tenir en compte degut a que podíem detectar la presència de Sema3A amb dos anticossos diferents anti-Sema3A o fer-ho per detecció de la fosfatasa alcalina a la que està unida. Per detectar la AP contàvem també amb un anticòs específic i un substrat que reacciona a l'enzim (Alkaline Phosphatase Yellow [pNPP] Liquid Substrate System for ELISA, P7998, Sigma, St. Louis, MO, USA).

Així doncs, vam incubar en diferents pous de la placa d'ELISA els dos anticossos contra Sema3A i l'anticòs contra AP. Després vam afegir 1µg/pou de Sema3A recombinant a cadascun d'ells. Per detectar l'antigen vam afegir de nou els anticossos contra Sema3A i fosfatasa alcalina, i el reactiu per AP (200 µl/pou). I finalment vam incubar els pous amb els anticossos secundaris corresponents a cadascun dels anticossos específics per l'antigen (les dilucions de cadascun dels anticossos utilitzats estan indicades a l'apartat 7 de la secció Materials i mètodes). Els resultats d'aquest primer assaig es poden veure a la figura R-18.

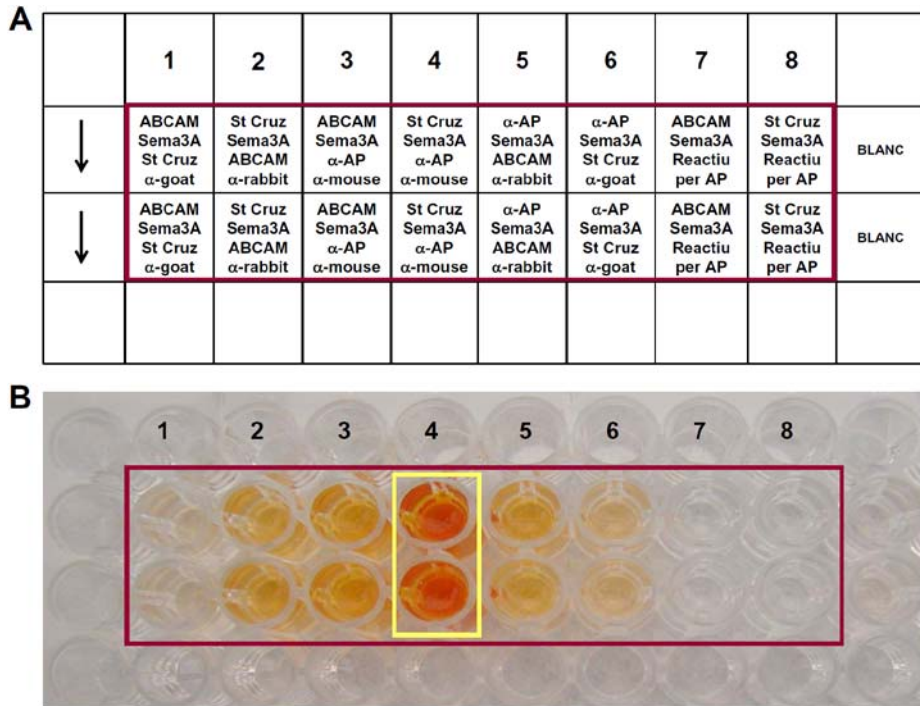


Figura R-18. Detecció de Sema3A per assaig d'ELISA Sandwich. (A) Esquema de les combinacions antigen-anticossos utilitzades (1-8), amb dues rèpliques per cadascuna d'elles. La direcció de la fletxa indica l'ordre d'aplicació dels productes en els pous de la placa d'ELISA. **(B)** Imatge de la placa d'ELISA corresponent a l'esquema vist en (A) amb la reacció colorimètrica obtinguda per a cadascuna de les combinacions antigen-anticossos utilitzades. La combinació corresponent a la filera de pous número 4 presentava els valors de DO més elevats.

Aquest assaig en va permetre determinar que la detecció de Sema3A, directament relacionada al valor de la DO, era major quan, prèviament a l'adició de la proteïna recombinant, havíem enganxat l'anticòs anti-Sema3A de St. Cruz al fons dels pous de la placa d'ELISA. Vam decidir utilitzar aquesta combinació d'antigen-anticossos (pou nº 4, figura R-18) com a control positiu de detecció de l'antigen en els següents experiments, en els que els sèrums control i patològics actuaven com a anticossos primaris contra Sema3A.

Degut al factor limitant del volum de les mostres de sèrum, en el següent assaig no vam poder provar 3 de les mostres de LMND i tampoc 2 mostres de ELA utilitzades en els experiments amb els pèptids. Els resultats de l'assaig d'ELISA utilitzant Sema3A recombinant, unida a la placa per l'anti-Sema3A de St. Cruz, i els sèrums controls i patològics com a anticossos contra aquest antigen, poden veure's a la figura R-19.

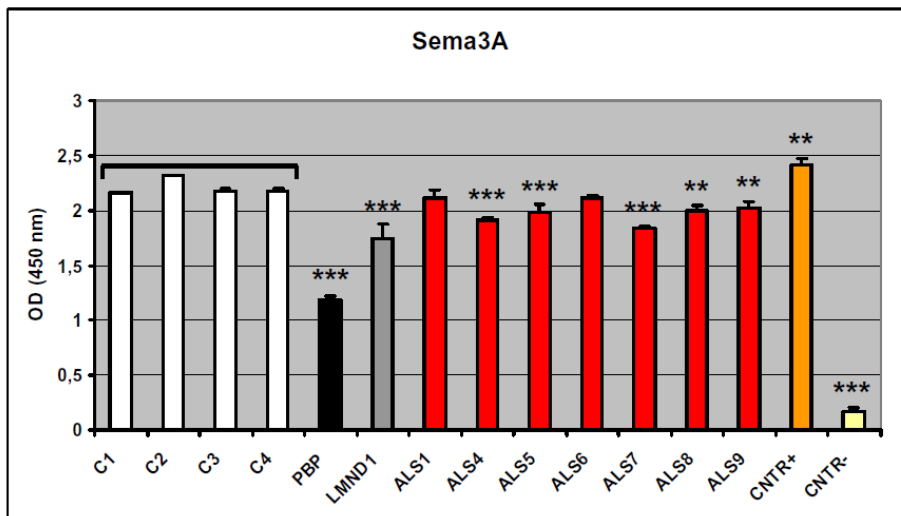


Figura R-19. Assaig d'ELISA per determinar la presència d'anticossos contra Sema3A en sèrums patològics utilitzant Sema3A recombinant. Cada barra representa un valor individual per mostra de sèrum, mitjana de 2 assaigs d'ELISA independents (amb 3 rèpliques per mostra cadascun) de la DO a 450 nm \pm SEM. El control negatiu (CNTR-) es una replica de la composició d'antigen-anticossos del control positiu (CNTR+) però en absència de Sema3A. . Cadascuna de les mostres patològiques es va comparar amb la mitjana de les 4 mostres control. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Com es pot observar a la figura R-19, utilitzant la Sema3A recombinant com a antigen, tots els sèrums, excepte PBP, mostraven valors de DO força elevats, sent les mostres control les que presentaven un reconeixement per l'antigen superior al de la resta. Aquest fet ens va fer pensar que els components del medi de cultiu de cèl·lules COS-7,

on havia estat secretada la Sema3A, podrien estar interferint en el reconeixement de l'antigen per part dels anticossos presents en els sèrums. Per aquesta raó, en el Departament de Neurobiologia Cel·lular de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida-IRBLLLEIDA, es va dur a terme la purificació de la proteïna i els següents assaigs d'ELISA.

2.4 Unió d'anticossos circulants en sèrums patològics a proteïna Sema3A recombinat purificada. Assaigs d'ELISA.

La Sema3A present en medi de cultiu de cèl·lules COS-7 va purificar-se en columna de cromatografia d'afinitat, amb boles de sefarosa conjugades a AP, i es va comprovar la seva presència en l'eluït de la columna per WB.

Aquesta Sema3A purificada es va utilitzar en els següents assaigs d'ELISA, en els quals es van analitzar 9 sèrums control, 10 sèrums control de patologia, pertanyents a pacients amb algun tipus de malaltia neurodegenerativa però no relacionats a malalties de la MN (Alzheimer, Parkinson i MG), 5 sèrums LMND i 15 sèrums ELA. Els resultats del test es poden veure a la figura R-20.

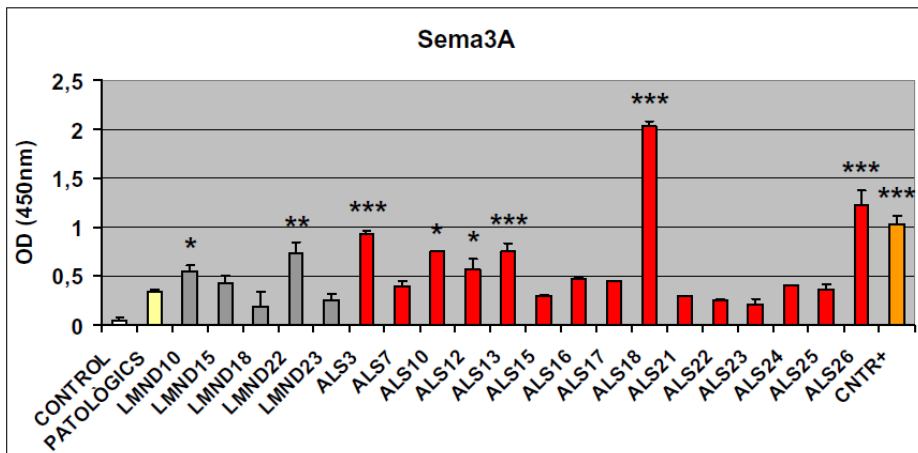


Figura R-20. Assaig d'ELISA per determinar la presència d'anticossos contra Sema3A en sèrums patològics utilitzant Sema3A recombinant purificada. Les mostres de sèrums control i control de patologia (PATOLÒGICS) es troben agrupades, mentre que cadascuna de les mostres LMND i ELA estan representades individualment. Cada barra representa el valor, mitjana de 3 determinacions, de la DO a 450 nm \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tot i que els sèrums LMND i ELA presentaven valors de DO significativament superiors als dels sèrums control, en aquest cas, es va prendre com a referència estadística el valor de DO dels sèrums control de patologia, degut a que també presentaven una diferència significativa respecte dels sèrums d'individus sans. Encara que la mitjana dels valors de sèrums LMND i ELA era superior a la dels sèrums control de patologia, no hi havia diferències significatives entre ells degut a la gran variabilitat entre les dades individuals. Fent una anàlisi individualitzada de les mostres es va comprovar que 2 dels 5 sèrums LMND i 6 dels 15 sèrums ELA presentaven un reconeixement significatiu de l'antigen, demostrant així la presència d'autoanticossos contra Sema3A en alguns sèrums de malalties de la MN. La presència d'aquest anticòs en sèrums de pacients amb aquest tipus de patologia, tot i no actuar com a marcadors específics, podria tenir un interès de tipus diagnòstic.

DISCUSSIÓ

Descrita fa més de 140 anys, la ELA és considerada avui dia la forma més comuna de malaltia degenerativa de la MN en la població adulta. Amb una evolució ràpida, progressivament incapacitant i de pronòstic mortal al cap de 3-5 anys després del diagnòstic, la ELA esdevé una malaltia devastadora que afecta tots els aspectes de la vida personal, laboral, social i familiar dels pacients. Tot i desconèixer encara les causes exactes que inicien el procés degeneratiu, s'han identificat diversos mecanismes que podrien participar en la progressió de la malaltia. És més, cada cop amb més força, la ELA és considerada una malaltia de tipus multifactorial, on els diferents processos patogènics interactuarien entre ells provocant alteracions estructurals i funcionals en les MN, i possiblement també, en les cèl·lules de la glia adjacents, que duren, ineludiblement, a la seva degeneració i mort.

D'entre tots els mecanismes proposats, l'excitotoxicitat per glutamat ha estat un dels més estudiats. Les primeres evidències que van posar de manifest la implicació de l'excitotoxicitat en la patogènia de la ELA van ser els nivells elevats dels aminoàcids excitatòrics glutamat, glicina i aspartat en sèrum i LCR de pacients (Rothstein et al, 1991; Urushitani et al, 1998). L'increment de la concentració de glutamat es va associar a un dèficit en la recaptació del NT en l'espai intersinàptic, el que es traduiria en una sobre-activació dels receptors postsinàptics de glutamat. Posteriorment, es va determinar que aquesta alteració estava relacionada a la pèrdua selectiva del transportador astrogial de glutamat EAAT2, observada en pacients amb ELA esporàdica i familiar (Rothstein et al., 1995) i en diferents models de rates i ratolins transgènics mSOD1 (Bruijn et al., 1997a; Bendotti et al., 2001). En les MN espinals de pacients amb ELA s'ha observat també una síntesi deficient de la subunitat GluR2 dels AMPARs (Kawahara et al., 2004), la qual limita la permeabilitat del receptor a Ca^{2+} , afavorint-se, així, la susceptibilitat de la cèl·lula al dany excitotòxic. Alhora, l'ús

d'antagonistes del AMPAR retarda l'aparició de les alteracions motores i augmenta la supervivència en els ratolins mSOD1^{G93A} (Tortarolo et al., 2006). En el model d'embrió de pollastre, àmpliament utilitzat en l'estudi del desenvolupament del sistema nerviós, la mort cel·lular programada i els fenòmens d'excitotoxicitat, s'ha observat que l'aplicació crònica de NMDA produeix unes alteracions estructurals en les MN similars a les observades en la ELA humana (Tarabal et al., 2005). Així mateix, el fet que el Riluzol, l'únic fàrmac utilitzat actualment en el tractament de la malaltia, actui inhibint de forma no competitiva els AMPARs i els NMDARs (Debono et al., 1993), recolzaria la participació dels receptors ionotròpics de glutamat en els processos excitotòxics que duen a la degeneració de les MN en la ELA.

L'autoimmunitat és una altra de les hipòtesis involucrades en la patogènia de la ELA. Tot i que la seva rellevància no és del tot concloent, s'ha detectat la presència de certs fenòmens autoimmunitaris en els teixits afectats per la malaltia. En sèrum de pacients amb ELA de tipus esporàdica s'ha observat la presència d'anticossos circulants contra canals de Ca²⁺ dependents de voltatge (VGCC). Aquests anticossos indueixen l'activació de corrents d'entrada de Ca²⁺ i la degeneració i mort de MN en cultiu, i, alhora, alteren l'homeòstasi intracel·lular del Ca²⁺ i produeixen canvis estructurals de les MN *in vivo*, quan són transfectats passivament a ratolins (Appel et al. 1995; Engelhardt et al. 1995). Així mateix, s'ha demostrat que les IgG purificades de pacients amb ELA i incubades amb preparacions musculars de ratolí, s'uneixen a les membranes presinàptiques de les MN a través de la interacció antigen-anticòs i modulen la transmissió sinàptica incrementant la secreció de NT (Pagani et al., 2006). Aquesta secreció de NT requeriria l'entrada de Ca²⁺ a les MN pels VGCC de tipus N i l'activació de la fosfolipasa C. En preparacions de diafragma i nervi frènic de ratolí, l'aplicació de la

fracció de IgG de pacients amb ELA indueix un increment del nombre de potencials miniatura (Uchitel et al., 1988), suggerint que els terminals presinàptics de les MN serien una diana d'acció dels factors immunològics implicats en la patologia de la ELA. La injecció intraperitoneal d'aquestes IgG en ratolins produeix la degeneració de les MN espinals (Pullen et al., 2004). Tanmateix, l'aplicació subcutània de les IgG en unió neuromuscular de ratolí indueix, inicialment, processos de plasticitat sinàptica a nivell dels terminals nerviosos, associats a una entrada de Ca^{2+} pels VGCC de tipus L (Fratantoni et al., 2000), els quals desemboquen, a la llarga, en una disfunció de la transmissió neuromuscular.

Aquestes troballes suggereixen que les IgG de pacients amb ELA estarien involucrades en la patogènia de la malaltia. Tot i això, tan la ineficàcia de la teràpia immunosupressora en pacients, com l'absència de citotoxicitat exercida per aquestes IgG en cultius organotípics de medulla espinal (Li et al., 2008), fan que la presència i significació d'aquests autoanticossos encara estigui sota discussió.

En la primera part d'aquest treball, hem mesurat i caracteritzat l'acció de 14 sèrums de pacients amb ELA esporàdica sobre l'activitat del receptor ionotròpic de glutamat de tipus NMDA GluN1/GluN2A humà, en un sistema d'expressió heteròloga com és l'oòcit de *Xenopus laevis*. Aquest model experimental ha estat àmpliament utilitzat en els estudis electrofisiològics de canals iònics i constitueix una població de cèl·lules molt homogènia que ens permet obtenir resultats comparables. La segona part del treball està focalitzada en la detecció de la presència d'autoanticossos circulants en els sèrums de pacients mitjançant tècniques d'ELISA.

1. Efecte dels sèrums patològics ELA sobre el receptor de glutamat de tipus NMDA GluN1/GluN2A expressat en oòcits de *Xenopus laevis*.

Tal com s'havia descrit en treballs anteriors (Rothstein et al, 1991; Urushitani et al, 1998), els nivells sèrics dels aminoàcids excitatòris glutamat, glicina i aspartat també es trobaven incrementats en les nostres mostres de sèrum ELA respecte de les control. Per tal d'evitar interferències en els registres electrofisiològics al tractar-se de tres agonistes del NMDAR, vam procedir a dialitzar totes les mostres. Després de realitzar el protocol de diàlisi no existien diferències significatives entre controls i ELA degut a que la majoria de les mostres no presentaven valors detectables de cap dels tres aminoàcids.

En els primers assaigs que vam realitzar vàrem comprovar que l'aplicació extracel·lular de sèrum en els oòcits de *Xenopus* activava grans corrents d'entrada de tipus oscil·latori. Aquest fet havia estat prèviament descrit en estudis anteriors i corresponia a l'acció de l'àcid lisofosfatídic o lisofosfatidat (LPA), un factor sèric que estimula la via de senyalització de la PLC, a través de proteïnes $G_{\alpha q/11}$, provocant la producció de IP_3 , la secreció de Ca^{2+} dels compartiments intracel·lulars i l'activació de la PKC (Fukushima et al., 2002). L'increment de la concentració citosòlica de Ca^{2+} indueix la generació de grans corrents oscil·latoris com a resultat de l'activació dels canals de Cl^- dependents de Ca^{2+} intracel·lular, presents de forma endògena en els oòcits de *Xenopus* (Tigyi i Miledi, 1992; Aleu et al., 2002).

Així doncs, en aquest model, la generació de corrents oscil·latoris de clorur és una mesura indirecta de la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular.

L'LPA, degut a les seves propietats termoresistents, no es veu afectat pel xoc tèrmic al qual són sotmeses les mostres, per tal de neutralitzar

el sistema del complement, i tampoc és eliminat amb la diàlisi. Els oòcits de *Xenopus* expressen en la seva membrana receptors propis per a l'LPA, XLP_{A1-1} i XLP_{A1-2}, els quals presenten un 90% d'homologia amb el receptor de mamífers LP_{A1} (Kimura et al., 2001).

Per tal de comparar les respostes generades per sèrums control, ELA i control de malaltia, vàrem mesurar la càrrega elèctrica dels corrents de membrana generats en els oòcits. Es va observar que, a baixes concentracions de sèrum (1:10000 o dilucions més grans), era possible repetir l'aplicació de la mostra sense una pèrdua significativa de la resposta. En canvi, amb mostres més concentrades (1:40), com les que finalment es van utilitzar en els nostres registres, l'oòcit es desensibilitzava i calia esperar molts minuts per una recuperació completa de la resposta. Per aquesta raó, cada rèplica es realitzava en oòcit diferent i es comparaven les respostes obtingudes amb diferents lots d'oòcits.

En provar el sèrum ELA vàrem observar que les respostes generades en els oòcits eren significativament superiors a les registrades en el cas del sèrum d'individus sans i el sèrum PBP, encara que no diferien de les respostes activades pels sèrums MG i LMND. La diferència més gran, però, apareixia en expressar en els oòcits el NMDAR. En aquest cas, l'aplicació de sèrum ELA generava uns corrents amb una càrrega elèctrica tres vegades més gran que la observada en el cas del sèrum control, i, alhora, aquesta resposta era també significativament superior a la generada per tots els sèrums control de malalties. L'activació directa del NMDAR per part del sèrum, amb el conseqüent influx de Ca²⁺ pel receptor i l'activació secundària dels canals de Cl⁻ dependents de Ca²⁺, pot ser exclosa dels nostres experiments donada la diàlisi a la que van ser sotmeses les mostres per tal d'eliminar el contingut d'aminoàcids excitatòris. Tot i que en algunes de les nostres mostres de sèrum quedaven certs remanents de glutamat, glicina i aspartat després de la diàlisi, les concentracions d'aquests aminoàcids

un cop diluït el sèrum en la solució de registre (0.0135 μM Glutamat, 0.108 μM Glicina, 0.0122 μM Aspartat) són insuficients per una correcta activació del receptor GluN1/GluN2A (Chen et al., 2005, 2008; Erreger et al., 2007). Els corrents activats per sèrum control i ELA en presència del NMDAR van ser caracteritzats mesurant el seu potencial de reversió, el qual, en ambdós casos, era proper al potencial d'equilibri de l'ió clorur descrit en oòcits de *Xenopus* (Barish, 1983), descartant-se així la participació d'altres components.

Donat que els corrents oscil·latoris generats en els oòcits de *Xenopus* són deguts a l'activació dels canals de Cl^- dependents de Ca^{2+} (Miledi, 1982), sembla ser doncs que el sèrum ELA estaria activant la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular. És més, en base als nostres resultats, proposem que el NMDAR estaria participant en un mecanisme de mobilització intracel·lular de Ca^{2+} no relacionat a l'activació del flux d'ions a través del receptor de glutamat; un mecanisme directament associat amb components presents en el sèrum de pacients amb ELA però no en els sèrums d'individus sans o d'altres malalties neuromusculars.

El Riluzol es utilitza actualment en el tractament de la ELA. Aquest fàrmac té propietats neuroprotectores ja que influeix en la transmissió glutamatèrgica a través dels seus efectes moduladors sobre la secreció de glutamat (Hebert et al., 1994), les vies de senyalització mitjançades per proteïnes G (Doble et al., 1992) i la interacció amb els NMDARs (Debono et al., 1993; Hubert et al., 1994). Donat que les mostres de sèrum ELA utilitzades en aquest estudi van ser obtingudes de pacients tractats amb Riluzol, i que les mostres van ser dialitzades, vàrem analitzar l'efecte del fàrmac per descartar completament les interferències del tractament en els nostres experiments (no presentat a la secció de resultats). El Riluzol, a concentracions similars a les descrites en sèrum de pacients amb ELA (0.05-0.300 mg/L) (Groeneveld et al., 2003), no inhibia els corrents activats per glutamat

en els oòcits injectats amb el receptor GluN1/GluN2A, ni tampoc generava cap tipus de resposta per ell mateix.

L'especificitat de les respostes ocasionades per la interacció del sèrum ELA i el NMDAR està lligada a l'exigència de la presència de les dues subunitats del receptor de glutamat i a l'efecte inhibidor de l'MK-801. Els nostres resultats indiquen que el sèrum ELA tan sols exerceix un efecte significatiu sobre la generació de corrents oscil·latoris de Cl⁻, directament relacionats a la mobilització de Ca²⁺ intracel·lular, quan el NMDAR no es troba bloquejat.

L'acció del sèrum en els oòcits de *Xenopus* que expressen el NMDAR té també un efecte addicional sobre la transmissió glutamatèrgica. Els corrents activats per glutamat es veuen significativament incrementats després de l'exposició a sèrum. Aquest efecte, però, no presenta diferències significatives entre mostres control, ELA i control de malaltia. L'efecte de potenciació glutamatèrgica, que involucra l'acció de la PKC i de la CaMKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II) per acció de l'LPA, ha estat prèviament descrit en oòcits de *Xenopus* que expressaven el receptor d'ACH i el AMPAR (Nishizaki et al. 1997).

En un intent per dilucidar mecanismes patogènics comuns entre la ELA de tipus esporàdica i la ELA de tipus familiar es varen reproduir els experiments amb el sèrum del model de rata transgènica mSOD1 G93A. Aquest model ha estat àmpliament utilitzat en l'estudi de la patogènia de la malaltia durant els últims vint anys (Pasinelli i Brown, 2006; Gurney et al., 1994; Nagai et al., 2001). La sobreexpressió de mSOD1 provoca el desenvolupament d'una malaltia neuromuscular fatal, totalment comparable a la ELA humana. Alhora, en el model transgènic de ELA familiar, el curs temporal de la progressió de la malaltia està clarament definit, classificant-se en diferents estadis segons l'edat de l'animal. Així doncs, es van obtenir mostres de sèrum WT i mSOD1 G93A a 4 edats post natalis diferents: P30, P60, P90 i P120 i es va analitzar el seu efecte sobre oòcits control i NMDAR. Tal com

haviem observat en el cas de les mostres humanes, el sèrum de rata també induïa respostes de tipus oscil·latori en el oòcits. Els nostres resultats van revelar que tan sols el sèrum de rata mSOD1 G93A, en estadis inicials de la malaltia (p30), presentava respostes significativament superiors a les observades en els cas de sèrum de rata WT en presència del NMDAR. En relació a aquest fet, diversos estudis han determinat que la transferència passiva de la fracció d'IgG del sèrum de pacients amb ELA en ratolins, provoca una potenciació sinàptica a nivell dels terminals nerviosos motors, que cursa a través de l'increment de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular (Engelhardt et al., 1997). En conseqüència, la desregulació del Ca^{2+} provocaria disfuncions mitocondrials, generació de radicals lliures i mort cel·lular (Guegan et al., 2001; Strong, 2003). Aquestes troballes, conjuntament amb l'ineficàcia de la teràpia immunosupressora en pacients en estadis avançats de la malaltia (Smith et al., 1994) recolzarien la idea de que les alteracions degudes a les IgG associades a la malaltia es donarien en etapes inicials del procés degeneratiu de les MN en la ELA.

Cal destacar, però, que el fet que les mostres de rata WT en presència del NMDAR també generin respostes incrementades respecte de les observades en oòcits control, ens fa pensar que hi podria haver un problema en el processament de les mostres. Exactament, en el procés de diàlisi, que podria haver deixat rastres d'aminoàcids excitatoris del NMDAR en les mostres de sèrum, emmascarant-se així possibles diferències entre sèrums WT i mSOD1 G93A en les altres edats post natals provades. També hem de tenir en compte que, per dificultats en l'obtenció del volum necessari per realitzar els assaigs, la n de la mostra de sèrum per cada estadi i condició era només de $n=2$. Degut a això, és impossible discernir en aquest cas si existien o no coincidències en quant a la presència de factors sèrics associats a la

malaltia entre les mostres de ELA esporàdica humana i les mostres del model animal transgènic de ELA familiar.

Les primeres referències d'alteracions autoimmunes en la ELA van aparèixer amb la detecció de grans acumulacions de IgG en MN de medul·la espinal i en cèl·lules piramidals del còrtex motor de pacients (Appel et al. 1995). Tal com hem comentat amb anterioritat, els ratolins tractats amb IgG de pacients amb ELA presenten un increment en la concentració de Ca^{2+} intracel·lular associat a canvis estructurals degenerants en les MN i a processos de plasticitat sinàptica a nivell de la transmissió neuromuscular (Engelhardt et al., 1995; Fratantoni et al., 2000; Pullen et al., 2004; Pullen i Humphreys, 2000). Al provar l'efecte de les fraccions de IgG purificades de les mostres de sèrum control i ELA sobre els oòcits de *Xenopus* varem observar que es generaven corrents transitoris d'entrada de tipus no oscil·latori, els quals diferien dels observats en el cas de les mostres de sèrum complet. En absència del NMDAR, no hi havia diferències significatives entre les respostes generades per mostres control i ELA. En canvi, quan el receptor de glutamat era expressat en els oòcits, les IgG de pacients amb ELA activaven uns corrents amb una càrrega elèctrica dues vegades superior a la dels corrents generats per les IgG control. Fins avui, no s'ha descrit encara cap acció directa de les IgG associades a ELA sobre els receptors postsinàptics de glutamat. S'ha observat però, que aquestes IgG són capaces d'incrementar la freqüència dels corrents espontanis postsinàptics excitatòris, en neurones hipocampals de rata, a través de l'estimulació de la secreció de glutamat dels terminals presinàptics d'aquestes cèl·lules (Andjus et al., 1997). Així mateix, també s'ha descrit que l'acció de les IgG de pacients amb ELA sobre els VGCC, incrementa el corrent de Ca^{2+} d'aquests canals en cèl·lules de Purkinje (Llinas et al., 1993) i en una línia cel·lular híbrida de MN (Mosier et al., 1995).

Segons els nostres resultats, sembla ser que les IgG de pacients amb ELA esporàdica, a més d'activar un mecanisme cel·lular endògen en els oòcits de *Xenopus*, podrien estar participant en l'increment de la resposta associada al NMDAR, mitjançant l'activació de vies de senyalització no canòniques mitjançant el receptor.

Les vies de senyalització no canòniques de receptors típicament ionotròpics han estat descrites amb anterioritat en el cas dels receptors de Kainat (Rodríguez-Moreno i Lerma, 1998), receptors GABA-A (Liu et al., 2000) i NMDARs (Lee et al., 2002). Encara que els receptors de Kainat desenvolupen accions ionotròpiques, en moltes regions del SNC es troben implicats en la senyalització metabotràpica, la qual involucra l'activació de proteïnes G i l'estimulació de vies de senyalització de segons missatgers associades a PKA i PKC (Rozas et al., 2003). L'aplicació de Kainat en poblacions de cèl·lules ganglionars de l'arrel dorsal induïx la secreció de Ca^{2+} dependent de proteïnes G, dels compartiments intracel·lulars (Rodríguez-Moreno i Sihra, 2004). Diversos estudis han demostrat que les funcions associades als NMDARs poden ser regulades per receptors acoblats a proteïnes G, com seria el cas del receptor de dopamina D1, mitjançant l'activació de vies de senyalització de segons missatgers dependents de PKA i PKC (revisat en Greengard, 2001). Més recentment, s'ha descrit un altre tipus de modulació que requeriria la interacció directa, proteïna a proteïna, entre el NMDAR i el receptor D1 (Lee et al., 2002). En aquest estudi, realitzat en neurones d'hipocamp en cultiu, s'ha observat que l'extrem C-terminal del receptor D1 pot unir-se de forma directa i selectiva a la subunitat GluN1 del NMDAR. L'activació del receptor D1 per part del seu agonista dona lloc a la dissociació del lligam amb GluN1, permetent llavors l'acoblament de calmodulina i IP_3 quinasa a l'extrem C-terminal d'aquesta subunitat i la subseqüent activació de vies de senyalització que promouen la supervivència cel·lular. Aquesta senyalització del receptor de glutamat, modulada pel receptor D1,

seria independent de l'activació del flux d'ions en el NMDAR. Així mateix, s'ha observat que el receptor metabotrópic de glutamat del grup I mGluR5 s'agrupa al NMDAR en neurones hipocampals (Perroy et al., 2008). mGluR5 és capaç de disminuir els corrents que flueixen pel NMDAR, i de forma recíproca, NMDAR inhibeix fortament la capacitat de mGluR5 de segregar Ca^{2+} intracel·lular. Aquest resultat suggereixen un mecanisme mutu de regulació constitutiva independent d'agonista per a mGluR5 i NMDAR. La interferència recíproca entre tots dos receptors indicaria que es tracta d'un mecanisme d'acció no canònic.

Amb la informació provinent dels nostres resultats i la descrita en la literatura, proposem un model en el qual el NMDAR seria modulats per factors presents en el sèrum de malalts amb ELA. De la mateixa manera que l'LPA actua, els factors sèrics associats a ELA podrien induir l'acoblament entre el NMDAR i els complexos de proteïnes G unides a membrana (Go, Gs), promovent l'activació de la PLC, la formació de IP_3 i la secreció de Ca^{2+} dels compartiments intracel·lulars (Figura D-1). Aquesta hipòtesi implicaria que, juntament amb la senyalització canònica ionotòpica, el NMDAR estaria involucrat en la patogènia de la ELA exercint nous modes d'acció de tipus metabotrópic, els quals durien a alteracions excitotòxiques.

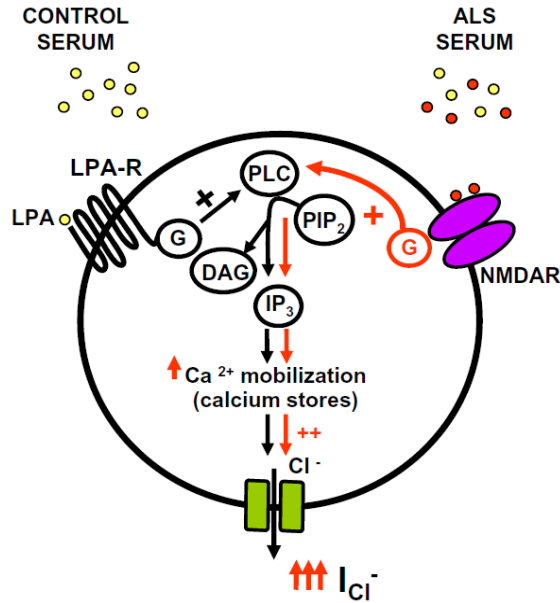


Figura D-1. Representació esquemàtica del model hipotètic d'acció del sèrum ELA en els oïcits de *Xenopus* que expressen el NMDAR. El NMDAR, un receptor típicament ionotròpic, pot ser modulats per factors solubles presents en el sèrum ELA, adquirint activitat metabotròpica. La interacció directa entre el receptor i les proteïnes G activa la via de senyalització de segons missatgers de la PLC i l'IP₃, promovent la secreció de Ca²⁺ intracel·lular i l'activació dels canals de Cl⁻ dependents de Ca²⁺. Les nostres dades recolzen la idea de la presència d'un o més factors endògens en el sèrum ELA que activarien la mobilització intracel·lular de Ca²⁺ a través d'una via de senyalització no canònica del NMDAR.

2. Detecció d'autoanticossos circulants en sèrums patològics ELA.

La identificació d'autoanticossos associats a ELA pot esdevenir una eina clau en el diagnòstic i tractament de la malaltia. La manca d'un marcador o prova diagnòstica específica per la ELA, així com, la similitud dels símptomes en etapes inicials de la malaltia amb els que es presenten en moltes altres síndromes motores i malalties de la MN, fa que, la majoria de les vegades, l'obtenció d'un diagnòstic definitiu pugui endarrerir-se varis mesos. En malalties amb una evolució tan

ràpida i progressivament incapacitant com la de la ELA és essencial trobar noves eines per tal d'agilitzar la seva diagnosi.

Fins avui, s'han descrit diferents tipus d'anticossos contra antígens neuronals en pacients de ELA de tipus esporàdica i familiar. Malgrat tot, es desconeix encara el significat de la seva presència, ja que no es troben en tots els sèrums de pacients amb ELA i, alguns d'ells, en canvi, s'han identificat també en sèrums pertanyents a pacients amb altres malalties neurològiques (Lamb i Patten, 1991; Gallardo et al., 2001).

A part de les tècniques bioquímiques clàssiques per determinar la presència d'anticossos, com seria la tècnica de ELISA, en la detecció d'anticossos presents en el sèrum de pacients amb ELA s'han utilitzat diferents sistemes d'assaig. La presència i funcionalitat dels anticossos contra canals de Ca^{2+} en aquests sèrums es va avaluar en la línia cel·lular de feocromocitoma PC12 (Offen et al., 1998). Aquestes cèl·lules poden secretar dopamina tritjada exclusivament a través de VGCCs de tipus L. En aquest treball es va descriure la inhibició de la secreció de dopamina per aquests canals per anticossos presents en el sèrum de malalts. Els cultius organotípics de medulla espinal també han estat utilitzats en l'estudi del sèrum ELA (Li et al., 2008). En aquest cas, però, l'administració de la fracció de IgG purificada del sèrum de malalts amb ELA no produïa cap tipus d'efecte neurotòxic. La presència de IgG citotòxiques en la saliva de pacients amb ELA s'ha analitzat mitjançant un assaig que mesurava la hemòlisi produïda quan es posaven en contacte eritròcits amb la saliva a analitzar (Conradi et al., 1990). Els models *in vivo* són també un bon sistema per investigar els fenòmens d'autoimmunitat en la ELA. Com hem comentat amb anterioritat, la injecció de IgG de pacients amb ELA en rates o ratolins permetia determinar, al cap de 24h, la localització d'aquests anticossos. Es va observar que les IgG de ELA es mobilitzaven a teixits del SNC, més concretament als axons terminals

de MN espinals, on provocaven una degeneració similar a la observada en els casos de pacients amb la malaltia (Engelhardt et al., 1997). En el model d'embrió de pollastre l'administració de sèrums de malalts amb ELA durant el període de la mort cel·lular programada o PCD (de E6 a E10) produïa, paradoxalment, un rescat significatiu del nombre de MN (Oppenheim, 1987).

En aquesta segona part del treball hem continuat amb un estudi iniciat al Departament de Neurobiologia Cel·lular de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida-IRBLLEIDA, amb el qual col·laborem. En aquest estudi es va observar que l'aplicació de sèrums ELA durant la PCD en el model d'embrió de pollastre, no només evitava la degeneració i mort de les MN, sinó que un nombre moderat, però significativament més alt, d'aquestes cèl·lules sobreviuen al període de la PCD. Posteriorment es va comprovar que aquest rescat era degut a l'acció d'un tipus de IgG que es trobava en els sèrums de malalts però no en el sèrum d'individus sans. Mitjançant tècniques proteòmiques es va constatar que algunes IgG de pacients amb malalties de la MN (purificades a partir de 3 mostres de sèrum ELA i 1 mostra de sèrum LMND) eren capaces d'unir-se a proteïnes del sistema nerviós de l'embrió de pollastre. Per espectrometria de masses es van identificar aquestes proteïnes reconegudes per les IgG com diferents proteïnes pertanyents a la classe 3 de la família de les Semaforines.

Les Semaforines són una família de proteïnes secretades o associades a membrana, que actuen com a molècules quimioattractants o quimiorepellents, en diferents processos com són la guia axonal (Kolodkin et al., 1993), la migració cel·lular, la sinaptogènesi o la metàstasi en el cas del càncer (Tran et al., 2007). Les Semaforines de la classe 3 han estat relacionades, majoritàriament, a l'emissió de senyals repulsives i al col·lapse del conus de creixement de l'axó (Luo et al., 1993), tot i que també poden exercir senyals d'atracció.

En el model d'embrió de pollastre es va comprovar que l'adició de l'anticòs comercial anti-Sema3A rescatava MN durant el període de la PCD tal com ho feien els sèrums. Així doncs, sembla ser que els anticossos presents en els sèrums patològics són capaços d'inhibir les proteïnes Semaforines que actuen a nivell del sistema nerviós de l'embrió de pollastre durant el desenvolupament. Al inhibir les proteïnes relacionades a la senyalització quimiorrepel·lent de la guia axonal, augmenta el nombre de cèl·lules que poden arribar a la seva diana, el múscul, fent que s'estableixin més contactes neuromusculars i augmentant així el nombre de MN al final de la PCD.

En el present estudi hem analitzat la presència d'anticossos contra Sema3A en varies mostres de sèrum control i patològic per determinar si es tracta d'un autoanticòs associat a ELA.

En els primers assaigs de ELISA vàrem utilitzar com a antigen dos pèptids comercials de la Sema3A. La majoria dels sèrums ELA, així com algun dels sèrums de LMND, una forma comuna de malaltia de la MN que pot evolucionar a ELA, presentaven anticossos que reconeixien les seqüències dels pèptids homologues a la proteïna Sema3A. Tot i això, el fet que hi hagués també cert reconeixement per part de les mostres de sèrum control, i que aquest fos superior al presentat per la mostra de sèrum PBP, ens feia dubtar de l'eficàcia dels pèptids en aquest assaig i insinuava també una possible unió inespecífica antigen-anticòs. Utilitzant com a antigen la Sema3A recombinant que havíem produït en cèl·lules COS-7, vàrem observar que, en aquest cas, no hi havia cap tipus de reconeixement inespecífic per part de les mostres de sèrum d'individus sans. Tot i això, hi havia diferències significatives entre aquests i els sèrums control de patologia, que provenien de pacients amb malalties neurodegeneratives però no relacionades a malalties de la MN. Per això es va agafar com a referència per les mostres ELA i LMND els sèrums control de patologia. Es va observar que sis de les mostres de sèrum ELA i dues de les mostres de sèrum LMND

analitzades presentaven autoanticossos contra la proteïna Sema3A. Segons aquests resultats no podríem considerar els autoanticossos contra Sema3A un marcador específic per la ELA, encara que podrien ser utilitzats com un indicatiu de malaltia. Tot i això es requeririen més estudis per determinar si aquests autoanticossos podrien actuar com una eina diagnòstica entre els diferents tipus de malalties de la MN i síndromes motores.

En aquests últims anys, diversos treballs han proposat la relació entre l'expressió i funció aberrant de proteïnes encarregades de la formació i manteniment dels circuits motoneuronals, com són les Semaforines, i algunes de les alteracions patològiques que duen a la pèrdua d'aquestes connexions observades en la ELA (revisat en Schmidt et al., 2009). Més concretament, en un treball publicat per De Winter i col·laboradors, l'any 2006, es va descriure una expressió diferencial de Sema3A en les cèl·lules de Schwann terminals de ratolins mSOD1 G93A. Aquests animals presentaven un augment en l'expressió del mRNA de Sema3A en les cèl·lules de Schwann associades a subpoblacions específiques de fibres musculars, anomenades "fast-fatigable" o fibres de tipus IIb i IIx, que no s'observava en animals WT. Aquests subtipus de fibres, que es caracteritzen per la seva poca capacitat d'estimulació de la formació de brots als terminals nerviosos, serien les primeres en perdre's en la ELA (Frey et al., 2000). La sobreexpressió de Sema3A en les cèl·lules de Schwann del ratolí transgènic causa una repulsió dels axons a nivell de la unió neuromuscular, i com a conseqüència, una denervació axonal, i, la degeneració de les MN. Un treball més recent ha descrit la capacitat de regeneració que presenta el corn anterior de la medulla espinal, en el model de ratolí mSOD1 (Miyazaki et al., 2009). Tot hi que la pèrdua de MN espinals és un fet ben establert en els models animals de ELA, aquest estudi ha determinat que durant etapes inicials de la progressió de la malaltia, entre les setmanes 15 i 18 de vida de

l'animal, es produeix un fenomen de recuperació del nombre de MN. Aquest fenomen està relacionat a un increment progressiu de gamma 1 laminina, un promotor de la regeneració, i a una disminució progressiva de Sema3A, considerada un inhibidor de la regeneració.

Tenint en compte aquest treballs, podríem pensar que, l'aparició d'anticossos contra Sema3A en alguns sèrums de ELA i LMND, tindria significat com a mecanisme de defensa de l'organisme enfront les senyals inhibidores que exerceixen aquestes molècules sobre les MN durant estadis terminals de la progressió de la malaltia.

3. Consideracions finals

Les diferents línies d'investigació en la patogènia de la ELA posen de manifest la participació de múltiples factors en el procés degeneratiu de la malaltia. Els nostres resultats mostren l'activació de la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular, dependent de la presència del NMDAR, per part del sèrum ELA, la qual, relacionaria la presència de factors immunològics associats a ELA amb els processos d'excitotoxicitat descrits en la seva patogènia. Així mateix, els anticossos contra la proteïna Sema3A estan presents en alguns sèrums ELA i LMND però no en sèrums d'individus sans o pacients amb altres tipus de malalties neurodegeneratives. Donada l'absència de cap tipus de marcador específic per la ELA i altres malalties de la MN, seria interessant la utilització d'aquests i altres autoanticossos per tal d'agilitzar el diagnòstic diferencial d'aquestes patologies.

CONCLUSIONS

1. Els sèrums control i patològics activen corrents oscil·latoris de clorur en els oòcits de *Xenopus laevis*, els quals són una mesura indirecta de la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular.
2. En presència del NMDAR GluN1/GluN2A, els corrents generats en resposta a sèrum ELA són significativament superiors als generats per sèrum provinent d'individus sans i pacients amb altres tipus de malalties de la MN.
3. La resposta generada pel sèrum ELA presenta dependència de la presència d'ambdues subunitats del NMDAR i és sensible al bloqueig amb MK-801, un antagonista no competitiu del receptor.
4. L'acció del sèrum sobre els oòcits de *Xenopus laevis* té un efecte potenciador dels corrents glutamatèrgics que flueixen a través del NMDAR.
5. El sèrum de rata mSOD1 G93A, model animal transgènic de la forma familiar de ELA, en presència del NMDAR i en etapes inicials de la progressió de la malaltia (P30), genera respostes similars a les obtingudes amb el sèrum de pacients amb ELA.
6. La fracció de IgG purificada de sèrums control i ELA activa corrents transitoris d'entrada no oscil·latoris en els oòcits de *Xenopus*, els quals difereixen dels generats en el cas del sèrum complet. La resposta activada per IgG de pacients amb ELA en presència del NMDAR és significativament superior a la generada per les IgG d'individus sans.
7. Algunes de les mostres de sèrum ELA i LMND contenen anticossos que reconeixen específicament la proteïna Semaforina 3A.

BIBLIOGRAFIA

- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R. 1997.** Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* **88**: 615-626.
- Adams RH, Lohrum M, Klostermann A, Betz H, Puschel AW. 1997.** The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J* **16**: 6077-6086.
- Aleu J, Blasi J, Solsona C, Marsal J. 2002.** Calcium-dependent acetylcholine release from *Xenopus* oocytes: simultaneous ionic currents and acetylcholine release recordings. *Eur J Neurosci* **16**: 1442-1448.
- Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG, Appel SH. 1994.** The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **36**: 846-858.
- Almer G, Guegan C, Teismann P, Naini A, Rosoklija G, Hays AP, Chen C, Przedborski S. 2001.** Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **49**: 176-185.
- Andersson MK, Stahlberg A, Arvidsson Y, Olofsson A, Semb H, Stenman G, Nilsson O, Aman P. 2008.** The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol* **9**: 37.
- Andjus PR, Stevic-Marinkovic Z, Cherubini E. 1997.** Immunoglobulins from motoneurone disease patients enhance glutamate release from rat hippocampal neurones in culture. *J Physiol* **504 (Pt 1)**: 103-112.
- Andreassen OA, Ferrante RJ, Klivenyi P, Klein AM, Shinobu LA, Epstein CJ, Beal MF. 2000.** Partial deficiency of manganese superoxide dismutase exacerbates a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **47**: 447-455.
- Andrus PK, Fleck TJ, Gurney ME, Hall ED. 1998.** Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **71**: 2041-2048.
- Aoki C, Rhee J, Lubin M, Dawson TM. 1997.** NMDA-R1 subunit of the cerebral cortex co-localizes with neuronal nitric oxide synthase at pre- and postsynaptic sites and in spines. *Brain Res* **750**: 25-40.
- Appel SH, Engelhardt JI, Garcia J, Stefani E. 1991.** Autoimmunity and ALS: a comparison of animal models of immune-mediated motor neuron destruction and human ALS. *Adv Neurol* **56**: 405-412.
- Appel SH, Smith RG, Alexianu M, Siklos L, Engelhardt J, Colom LV, Stefani E. 1995.** Increased intracellular calcium triggered by immune mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurosci* **3**: 368-374.
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida**

M, Hashizume Y, Oda T. 2006. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* **351**: 602-611.

Aran FA. 1850. Recherches sur une maladie non encore décrite du système musculaire (atrophie musculaire progressive). *Arch. Gen. Med.* **24**: 15-35.

Armon C. 2003. An evidence-based medicine approach to the evaluation of the role of exogenous risk factors in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology* **22**: 217-228.

Armon C. 2004. Excess incidence of ALS in young Gulf War veterans. *Neurology* **63**: 1986-1987; author reply 1986-1987.

Asztely F, Gustafsson B. 1996. Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* **12**: 1-11.

Atkin JD, Farg MA, Turner BJ, Tomas D, Lysaght JA, Nunan J, Rembach A, Nagley P, Beart PM, Cheema SS, Horne MK. 2006. Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J Biol Chem* **281**: 30152-30165.

Atkin JD, Farg MA, Walker AK, McLean C, Tomas D, Horne MK. 2008. Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **30**: 400-407.

Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND. 2004. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* **429**: 413-417.

Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW. 1993. Cytotoxicity of microglia. *Glia* **7**: 111-118.

Barish ME. 1983. A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J Physiol* **342**: 309-325.

Batulan Z, Taylor DM, Aarons RJ, Minotti S, Doroudchi MM, Nalbantoglu J, Durham HD. 2006. Induction of multiple heat shock proteins and neuroprotection in a primary culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **24**: 213-225.

Beal MF. 2000. Mitochondria and the pathogenesis of ALS. *Brain* **123 (Pt 7)**: 1291-1292.

Beal MF. 2002. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* **32**: 797-803.

Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, Brown RH, Jr. 1997. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **42**: 644-654.

- Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR, Appel SH. 2006.** Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16021-16026.
- Belzil VV, Valdmanis PN, Dion PA, Daoud H, Kabashi E, Noreau A, Gauthier J, Hince P, Desjarlais A, Bouchard JP, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA. 2009.** Mutations in FUS cause FALS and SALS in French and French Canadian populations. *Neurology* **73**: 1176-1179.
- Ben Younes-Chennoufi A, Rozier A, Dib M, Bouche P, Lacomblez L, Mombo N, Ben Simon G, Yu RK, Baumann N, Meininger V. 1995.** Anti-sulfoglucuronyl paragloboside IgM antibodies in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol* **57**: 111-115.
- Bendotti C, Tortarolo M, Suchak SK, Calvaresi N, Carvelli L, Bastone A, Rizzi M, Raffray M, Mennini T. 2001.** Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J Neurochem* **79**: 737-746.
- Bergmann F, Keller BU. 2004.** Impact of mitochondrial inhibition on excitability and cytosolic Ca²⁺ levels in brainstem motoneurons from mouse. *J Physiol* **555**: 45-59.
- Bigge CF. 1999.** Ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 441-447.
- Blair IP, Williams KL, Warraich ST, Durnall JC, Thoeng AD, Manavis J, Blumbergs PC, Vucic S, Kiernan MC, Nicholson GA. 2009.** FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **81**: 639-645.
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993.** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**: 31-39.
- Bogaert E, Van Damme P, Poesen K, Dhondt J, Hersmus N, Kiraly D, Scheveneels W, Robberecht W, Van Den Bosch L. 2009.** VEGF protects motor neurons against excitotoxicity by upregulation of GluR2. *Neurobiol Aging* **31**: 2185-2191
- Bogdanov MB, Ramos LE, Xu Z, Beal MF. 1998.** Elevated "hydroxyl radical" generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **71**: 1321-1324.
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. 2006b.** ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* **52**: 39-59.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. 2006a.** Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* **312**: 1389-1392.
- Borchelt DR, Wong PC, Becher MW, Pardo CA, Lee MK, Xu ZS, Thinakaran G, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL, Hoffman PN. 1998.** Axonal transport of mutant superoxide dismutase 1 and focal axonal abnormalities in the proximal axons of transgenic mice. *Neurobiol Dis* **5**: 27-35.

Bosco DA, Morfini G, Karabacak NM, Song Y, Gros-Louis F, Pasinelli P, Goolsby H, Fontaine BA, Lemay N, McKenna-Yasek D, Frosch MP, Agar JN, Julien JP, Brady ST, Brown RH, Jr. 2010. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci* **13**: 1396-1403.

Brene S, Messer C, Okado H, Hartley M, Heinemann SF, Nestler EJ. 2000. Regulation of GluR2 promoter activity by neurotrophic factors via a neuron-restrictive silencer element. *Eur J Neurosci* **12**: 1525-1533.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS. 1996. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* **84**: 757-767.

Brooke MH, Florence JM, Heller SL, Kaiser KK, Phillips D, Gruber A, Babcock D, Miller JP. 1986. Controlled trial of thyrotropin releasing hormone in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **36**: 146-151.

Brooks BR. 1994. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci* **124 Suppl**: 96-107.

Brown RH, Jr., Hauser SL, Harrington H, Weiner HL. 1986. Failure of immunosuppression with a ten- to 14-day course of high-dose intravenous cyclophosphamide to alter the progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* **43**: 383-384.

Browne CL, Werner W. 1984. Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* **230**: 105-113.

Browne CL, Wiley HS, Dumont JN. 1979. Oocyte-follicle cell gap junctions in *Xenopus laevis* and the effects of gonadotropin on their permeability. *Science* **203**: 182-183.

Bruening W, Roy J, Giasson B, Figlewicz DA, Mushynski WE, Durham HD. 1999. Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **72**: 693-699.

Brujin LI, Beal MF, Becher MW, Schulz JB, Wong PC, Price DL, Cleveland DW. 1997b. Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7606-7611.

Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW. 1997a. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* **18**: 327-338.

- Brujin LI, Cleveland DW. 1996.** Mechanisms of selective motor neuron death in ALS: insights from transgenic mouse models of motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **22**: 373-387.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. 1998.** Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* **281**: 1851-1854.
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. 2004.** Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* **27**: 723-749.
- Buratti E, Baralle FE. 2008.** Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front Biosci* **13**: 867-878.
- Cai H, Lin X, Xie C, Laird FM, Lai C, Wen H, Chiang HC, Shim H, Farah MH, Hoke A, Price DL, Wong PC. 2005.** Loss of ALS2 function is insufficient to trigger motor neuron degeneration in knock-out mice but predisposes neurons to oxidative stress. *J Neurosci* **25**: 7567-7574.
- Cai H, Shim H, Lai C, Xie C, Lin X, Yang WJ, Chandran J. 2008.** ALS2/alsin knockout mice and motor neuron diseases. *Neurodegener Dis* **5**: 359-366.
- Caldero J, Ciuatà D, Llado J, Castan E, Oppenheim RW, Esquerda JE. 1997.** Effects of excitatory amino acids on neuromuscular development in the chick embryo. *J Comp Neurol* **387**: 73-95.
- Carpenter S. 1968.** Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurology* **18**: 841-851.
- Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ, Weiss JH. 2000.** AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci* **20**: 240-250.
- Carvalho M, Schwartz MS, Swash M. 1995.** Involvement of the external anal sphincter in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **18**: 848-853.
- Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressia A, Beckman JS, Estevez AG, Barbeito L. 2002.** Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J Neurosci Res* **67**: 21-29.
- Cha CI, Chung YH, Shin CM, Shin DH, Kim YS, Gurney ME, Lee KW. 2000.** Immunocytochemical study on the distribution of nitrotyrosine in the brain of the transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation. *Brain Res* **853**: 156-161.
- Charcot JM, Joffroy A. 1869.** Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. *Arch. Physiol. Neurol. Pathol.* **2**: 744-754.
- Chedotal A, Del Rio JA, Ruiz M, He Z, Borrell V, de Castro F, Ezan F, Goodman CS,**

Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Soriano E. 1998. Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* **125**: 4313-4323.

Chen PE, Geballe MT, Katz E, Erreger K, Livesey MR, O'Toole KK, Le P, Lee CJ, Snyder JP, Traynelis SF, Wyllie DJ. 2008. Modulation of glycine potency in rat recombinant NMDA receptors containing chimeric NR2A/2D subunits expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* **586**: 227-245.

Chen PE, Geballe MT, Stansfeld PJ, Johnston AR, Yuan H, Jacob AL, Snyder JP, Traynelis SF, Wyllie DJ. 2005. Structural features of the glutamate binding site in recombinant NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors determined by site-directed mutagenesis and molecular modeling. *Mol Pharmacol* **67**: 1470-1484.

Chen W, Saeed M, Mao H, Siddique N, Dellefave L, Hung WY, Deng HX, Sufit RL, Heller SL, Haines JL, Pericak-Vance M, Siddique T. 2006. Lack of association of VEGF promoter polymorphisms with sporadic ALS. *Neurology* **67**: 508-510.

Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. 2005. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* **128**: 472-476.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Jr., Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* **302**: 113-117.

Cleveland DW, Rothstein JD. 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* **2**: 806-819.

Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M. 2009. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* **56**: 2-5.

Conradi S, Ronnevi LO. 1985. Cytotoxic activity in the plasma of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients against normal erythrocytes. Quantitative determinations. *J Neurol Sci* **68**: 135-145.

Conradi S, Ronnevi LO, Karlsson E, Sindhupak R. 1990. Immunoglobulin-mediated activity against red blood cells in the saliva of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. *Acta Neurol Scand* **81**: 103-107.

Corrado L, Del Bo R, Castellotti B, Ratti A, Cereda C, Penco S, Soraru G, Carlomagno Y, Ghezzi S, Pensato V, Colombrita C, Gagliardi S, Cozzi L, Orsetti V, Mancuso M, Siciliano G, Mazzini L, Comi GP, Gellera C, Ceroni M, D'Alfonso S, Silani V. 2009. Mutations of FUS gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Genet* **47**: 190-194.

Couillard-Despres S, Zhu Q, Wong PC, Price DL, Cleveland DW, Julien JP. 1998. Protective effect of neurofilament heavy gene overexpression in motor neuron disease induced by mutant superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9626-9630.

- Couratier P, Yi FH, Preud'homme JL, Clavelou P, White A, Sindou P, Vallat JM, Jauberteau MO. 1998.** Serum autoantibodies to neurofilament proteins in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **154**: 137-145.
- Cozzolino M, Ferri A, Ferraro E, Rotilio G, Cecconi F, Carri MT. 2006.** Apaf1 mediates apoptosis and mitochondrial damage induced by mutant human SOD1s typical of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **21**: 69-79.
- Crabtree B, Thiyagarajan N, Prior SH, Wilson P, Iyer S, Ferns T, Shapiro R, Brew K, Subramanian V, Acharya KR. 2007.** Characterization of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemistry* **46**: 11810-11818.
- Crow JP, Calingasan NY, Chen J, Hill JL, Beal MF. 2005.** Manganese porphyrin given at symptom onset markedly extends survival of ALS mice. *Ann Neurol* **58**: 258-265.
- Cudkowicz ME, Shefner JM, Schoenfeld DA, Zhang H, Andreasson KI, Rothstein JD, Drachman DB. 2006.** Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **60**: 22-31.
- Dal Canto MC, Gurney ME. 1995.** 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* **676**: 25-40.
- Danysz W, Parsons CG. 1998.** Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* **50**: 597-664.
- De Blasi A, Conn PJ, Pin J, Nicoletti F. 2001.** Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends Pharmacol Sci* **22**: 114-120.
- De Vos KJ, Chapman AL, Tennant ME, Manser C, Tudor EL, Lau KF, Brownlees J, Ackerley S, Shaw PJ, McLoughlin DM, Shaw CE, Leigh PN, Miller CC, Grierson AJ. 2007.** Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet* **16**: 2720-2728.
- De Winter F, Vo T, Stam FJ, Wisman LA, Bar PR, Niclou SP, van Muiswinkel FL, Verhaagen J. 2006.** The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol Cell Neurosci* **32**: 102-117.
- Debono MW, Le Guern J, Canton T, Doble A, Pradier L. 1993.** Inhibition by riluzole of electrophysiological responses mediated by rat kainate and NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* **235**: 283-289.
- Dickson DW, Josephs KA, Amador-Ortiz C. 2007.** TDP-43 in differential diagnosis of motor neuron disorders. *Acta Neuropathol* **114**: 71-79.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999.** The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**: 7-61.

- Doble A. 1996.** The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* **47**: S233-241.
- Doble A, Hubert JP, Blanchard JC. 1992.** Pertussis toxin pretreatment abolishes the inhibitory effect of riluzole and carbachol on D-[3H]aspartate release from cultured cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* **140**: 251-254.
- Dong Y, Benveniste EN. 2001.** Immune function of astrocytes. *Glia* **36**: 180-190.
- Drachman DB, Chaudhry V, Cornblath D, Kuncel RW, Pestronk A, Clawson L, Mellits ED, Quaskey S, Quinn T, Calkins A, et al. 1994.** Trial of immunosuppression in amyotrophic lateral sclerosis using total lymphoid irradiation. *Ann Neurol* **35**: 142-150.
- Drachman DB, Frank K, Dykes-Hoberg M, Teismann P, Almer G, Przedborski S, Rothstein JD. 2002.** Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* **52**: 771-778.
- Durham HD, Roy J, Dong L, Figlewicz DA. 1997.** Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**: 523-530.
- Dykens JA. 1994.** Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA²⁺ and Na⁺: implications for neurodegeneration. *J Neurochem* **63**: 584-591.
- Eickholt BJ. 2008.** Functional diversity and mechanisms of action of the semaphorins. *Development* **135**: 2689-2694.
- Engelhardt JI, Siklos L, Appel SH. 1997.** Altered calcium homeostasis and ultrastructure in motoneurons of mice caused by passively transferred anti-motoneuronal IgG. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**: 21-39.
- Engelhardt JI, Siklos L, Komuves L, Smith RG, Appel SH. 1995.** Antibodies to calcium channels from ALS patients passively transferred to mice selectively increase intracellular calcium and induce ultrastructural changes in motoneurons. *Synapse* **20**: 185-199.
- Engelhardt JI, Soos J, Obal I, Vigh L, Siklos L. 2005.** Subcellular localization of IgG from the sera of ALS patients in the nervous system. *Acta Neurol Scand* **112**: 126-133.
- Erreger K, Geballe MT, Kristensen A, Chen PE, Hansen KB, Lee CJ, Yuan H, Le P, Lyuboslavsky PN, Micale N, Jorgensen L, Clausen RP, Wyllie DJ, Snyder JP, Traynelis SF. 2007.** Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Mol Pharmacol* **72**: 907-920.
- Esquerda JE. 2006.** Esclerosis lateral amiotrófica. *Mente y cerebro* **17**: 83-92.
- Eymard-Pierre E, Yamanaka K, Haeussler M, Kress W, Gauthier-Barichard F, Combes P, Cleveland DW, Boespflug-Tanguy O. 2006.** Novel missense mutation in ALS2 gene results in infantile ascending hereditary spastic paralysis. *Ann Neurol* **59**: 976-980.

- Fernandez-Santiago R, Sharma M, Mueller JC, Gohlke H, Illig T, Anneser J, Munch C, Ludolph A, Kamm C, Gasser T. 2006.** Possible gender-dependent association of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene and ALS. *Neurology* **66**: 1929-1931.
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RH, Jr., Beal MF. 1997.** Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **69**: 2064-2074.
- Ferrante RJ, Klein AM, Dedeoglu A, Beal MF. 2001.** Therapeutic efficacy of EGb761 (Ginkgo biloba extract) in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Neurosci* **17**: 89-96.
- Fitzmaurice PS, Shaw IC, Kleiner HE, Miller RT, Monks TJ, Lau SS, Mitchell JD, Lynch PG. 1996.** Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **19**: 797-798.
- Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. 2002.** Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* **84**: 131-141.
- Flowers JM, Powell JF, Leigh PN, Andersen P, Shaw CE. 2001.** Intron 7 retention and exon 9 skipping EAAT2 mRNA variants are not associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **49**: 643-649.
- Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsiuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, Lazzeri G, Spalloni A, Bellio N, Lenzi P, Modugno N, Siciliano G, Isidoro C, Murri L, Ruggieri S, Paparelli A. 2008.** Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 2052-2057.
- Forsythe ID, Westbrook GL. 1988.** Slow excitatory postsynaptic currents mediated by N-methyl-D-aspartate receptors on cultured mouse central neurones. *J Physiol* **396**: 515-533.
- Fratantoni SA, Weisz G, Pardal AM, Reisin RC, Uchitel OD. 2000.** Amyotrophic lateral sclerosis IgG-treated neuromuscular junctions develop sensitivity to L-type calcium channel blocker. *Muscle Nerve* **23**: 543-550.
- Fray AE, Ince PG, Banner SJ, Milton ID, Usher PA, Cookson MR, Shaw PJ. 1998.** The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* **10**: 2481-2489.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. 2000.** Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* **20**: 2534-2542.
- Fujihara SM, Nadler SG. 1999.** Intranuclear targeted delivery of functional NF-kappaB by 70 kDa heat shock protein. *EMBO J* **18**: 411-419.
- Fujita Y, Okamoto K. 2005.** Golgi apparatus of the motor neurons in patients with amyotrophic lateral sclerosis and in mice models of amyotrophic lateral sclerosis.

Neuropathology **25**: 388-394.

Fukushima N, Ye X, Chun J. 2002. Neurobiology of lysophosphatidic acid signaling. *Neuroscientist* **8**: 540-550.

Gallardo E, Rojas-Garcia R, Belvis R, Serrano-Munuera C, Ortiz E, Ortiz N, Grau J, Illa I. 2001. [Antiganglioside antibodies: when, which and for what]. *Neurologia* **16**: 293-297.

Garden GA, Moller T. 2006. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* **1**: 127-137.

Gifondorwa DJ, Robinson MB, Hayes CD, Taylor AR, Pevette DM, Oppenheim RW, Caress J, Milligan CE. 2007. Exogenous delivery of heat shock protein 70 increases lifespan in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **27**: 13173-13180.

Giordana MT, Piccinini M, Grifoni S, De Marco G, Vercellino M, Magistrello M, Pellerino A, Buccinna B, Lupino E, Rinaudo MT. 2009. TDP-43 redistribution is an early event in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol* **20**: 351-360.

Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverly S, Mayo K, Norton JB, Levitch D, Hatanpaa KJ, White CL, 3rd, Bigio EH, Caselli R, Baker M, Al-Lozi MT, Morris JC, Pestronk A, Rademakers R, Goate AM, Cairns NJ. 2008. TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann Neurol* **63**: 535-538.

Goldknopf IL, Sheta EA, Bryson J, Folsom B, Wilson C, Duty J, Yen AA, Appel SH. 2006. Complement C3c and related protein biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **342**: 1034-1039.

Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. 2000. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* **20**: 660-665.

Good PF, Alapat D, Hsu A, Chu C, Perl D, Wen X, Burstein DE, Kohtz DS. 2004. A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *J Neurochem* **91**: 716-736.

Goodall EF, Morrison KE. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis (motor neuron disease): proposed mechanisms and pathways to treatment. *Expert Rev Mol Med* **8**: 1-22.

Greenberg DA, Jin K. 2005. From angiogenesis to neuropathology. *Nature* **438**: 954-959.

Greengard P. 2001. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* **294**: 1024-1030.

Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, Ennis S, Cashman S, Donaghy C, Patterson V, Swingle R, Kieran D, Prehn J, Morrison KE, Green A, Acharya KR, Brown RH, Jr., Hardiman O. 2006. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* **38**: 411-413.

- Groeneveld GJ, Van Kan HJ, Kalmijn S, Veldink JH, Guchelaar HJ, Wokke JH, Van den Berg LH. 2003.** Riluzole serum concentrations in patients with ALS: associations with side effects and symptoms. *Neurology* **61**: 1141-1143.
- Gros-Louis F, Laurent S, Lopes AA, Khoris J, Meininger V, Camu W, Rouleau GA. 2003.** Absence of mutations in the hypoxia response element of VEGF in ALS. *Muscle Nerve* **28**: 774-775.
- Guegan C, Vila M, Rosoklija G, Hays AP, Przedborski S. 2001.** Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **21**: 6569-6576.
- Guo H, Lai L, Butchbach ME, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, Lin CL. 2003.** Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet* **12**: 2519-2532.
- Gurney ME. 1997.** Transgenic animal models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* **244 Suppl 2**: S15-20.
- Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK, Hall ED. 1996.** Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **39**: 147-157.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. 1994.** Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**: 1772-1775.
- Hadano S, Benn SC, Kakuta S, Otomo A, Sudo K, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Shefner JM, Cox GA, Iwakura Y, Brown RH, Jr., Ikeda JE. 2006.** Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Hum Mol Genet* **15**: 233-250.
- Hadano S, Kunita R, Otomo A, Suzuki-Utsunomiya K, Ikeda JE. 2007.** Molecular and cellular function of ALS2/alsin: implication of membrane dynamics in neuronal development and degeneration. *Neurochem Int* **51**: 74-84.
- Hadano S, Yanagisawa Y, Skaug J, Fichter K, Nasir J, Martindale D, Koop BF, Scherer SW, Nicholson DW, Rouleau GA, Ikeda J, Hayden MR. 2001.** Cloning and characterization of three novel genes, ALS2CR1, ALS2CR2, and ALS2CR3, in the juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS2) critical region at chromosome 2q33-q34: candidate genes for ALS2. *Genomics* **71**: 200-213.
- Haddad JJ. 2005.** N-methyl-D-aspartate (NMDA) and the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways: a revolving neurochemical axis for therapeutic intervention? *Prog Neurobiol* **77**: 252-282.
- Haggstrom B, Andersen PM, Hjalmarsen K, Binzer M, Forsgren L. 1997.** Autoimmunity and ALS: studies on antibodies to acetylcholinesterase in sera. *Acta Neurol Scand* **95**: 111-114.

- Hall ED, Andrus PK, Oostveen JA, Fleck TJ, Gurney ME. 1998a.** Relationship of oxygen radical-induced lipid peroxidative damage to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *J Neurosci Res* **53**: 66-77.
- Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. 1998b.** Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* **23**: 249-256.
- Harraz MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schoneich C, Engelhardt JF. 2008.** SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest* **118**: 659-670.
- Hebert T, Drapeau P, Pradier L, Dunn RJ. 1994.** Block of the rat brain IIA sodium channel alpha subunit by the neuroprotective drug riluzole. *Mol Pharmacol* **45**: 1055-1060.
- Hernandez S, Texido L, Caldero J, Ciutat D, Piedrafita L, Casanovas A, Blasi J, Solsona C, Povedano M, Rojas R, Illa I, Caress J, Prevette D, Oppenheim RW, Milligan C, Esquerda JE. 2010.** Increased intramuscular nerve branching and inhibition of programmed cell death of chick embryo motoneurons by immunoglobulins from patients with motoneuron disease. *J Neuroimmunol* **229**: 157-168
- Higgins CM, Jung C, Ding H, Xu Z. 2002.** Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci* **22**: RC215.
- Honig LS, Chambliss DD, Bigio EH, Carroll SL, Elliott JL. 2000.** Glutamate transporter EAAT2 splice variants occur not only in ALS, but also in AD and controls. *Neurology* **55**: 1082-1088.
- Houenou LJ, Li L, Lei M, Kent CR, Tytell M. 1996.** Exogenous heat shock cognate protein Hsc 70 prevents axotomy-induced death of spinal sensory neurons. *Cell Stress Chaperones* **1**: 161-166.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. 2002.** Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1604-1609.
- Hubert JP, Delumeau JC, Glowinski J, Premont J, Doble A. 1994.** Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells: evidence for a dual mechanism of action. *Br J Pharmacol* **113**: 261-267.
- Ihara Y, Nobukuni K, Takata H, Hayabara T. 2005.** Oxidative stress and metal content in blood and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with and without a Cu, Zn-superoxide dismutase mutation. *Neurol Res* **27**: 105-108.
- Ilieva EV, Ayala V, Jove M, Dalfo E, Cacabelos D, Povedano M, Bellmunt MJ, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M. 2007.** Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **130**: 3111-3123.

Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. 2009. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* **187**: 761-772.

Ince P, Stout N, Shaw P, Slade J, Hunziker W, Heizmann CW, Baimbridge KG. 1993. Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **19**: 291-299.

Jaarsma D, Rognoni F, van Duijn W, Verspaget HW, Haasdijk ED, Holstege JC. 2001. CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol* **102**: 293-305.

Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR. 2000. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12571-12576.

Julien JP. 2007. ALS: astrocytes move in as deadly neighbors. *Nat Neurosci* **10**: 535-537.

Jung C, Higgins CM, Xu Z. 2002. Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **83**: 535-545.

Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA. 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* **40**: 572-574.

Kanekura K, Hashimoto Y, Niikura T, Aiso S, Matsuoka M, Nishimoto I. 2004. Alsin, the product of ALS2 gene, suppresses SOD1 mutant neurotoxicity through RhoGEF domain by interacting with SOD1 mutants. *J Biol Chem* **279**: 19247-19256.

Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S. 2004. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* **427**: 801.

Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, Tsuji S, Kwak S. 2006. Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neurosci Res* **54**: 11-14.

Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. 1992. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* **140**: 691-707.

Kieran D, Sebastia J, Greenway MJ, King MA, Connaughton D, Concannon CG, Fenner B, Hardiman O, Prehn JH. 2008. Control of motoneuron survival by angiogenin. *J Neurosci* **28**: 14056-14061.

Kimura Y, Schmitt A, Fukushima N, Ishii I, Kimura H, Nebreda AR, Chun J. 2001. Two novel *Xenopus* homologs of mammalian LP(A1)/EDG-2 function as lysophosphatidic acid receptors in *Xenopus* oocytes and mammalian cells. *J Biol Chem* **276**: 15208-15215.

Kirkinezos IG, Bacman SR, Hernandez D, Oca-Cossio J, Arias LJ, Perez-Pinzon MA, Bradley WG, Moraes CT. 2005. Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice. *J Neurosci* **25**: 164-172.

Koerner DR. 1952. Amyotrophic lateral sclerosis on Guam. *Ann Intern Med* **37**: 1204-1220.

Kohr G. 2006. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* **326**: 439-446.

Kolodkin AL, Levensgood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* **90**: 753-762.

Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. 1993. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* **75**: 1389-1399.

Kong J, Xu Z. 1998. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* **18**: 3241-3250.

Koppel AM, Feiner L, Kobayashi H, Raper JA. 1997. A 70 amino acid region within the semaphorin domain activates specific cellular response of semaphorin family members. *Neuron* **19**: 531-537.

Krieger C, Lanius RA, Pelech SL, Shaw CA. 1996. Amyotrophic lateral sclerosis: the involvement of intracellular Ca²⁺ and protein kinase C. *Trends Pharmacol Sci* **17**: 114-120.

Kruman, II, Pedersen WA, Springer JE, Mattson MP. 1999. ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp Neurol* **160**: 28-39.

Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki K, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Hadano S, Ikeda JE. 2004. Homo-oligomerization of ALS2 through its unique carboxyl-terminal regions is essential for the ALS2-associated Rab5 guanine nucleotide exchange activity and its regulatory function on endosome trafficking. *J Biol Chem* **279**: 38626-38635.

Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH, Jr. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323**: 1205-1208.

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

Lai C, Xie C, McCormack SG, Chiang HC, Michalak MK, Lin X, Chandran J, Shim H, Shimoji M, Cookson MR, Hagan RL, Rothstein JD, Price DL, Wong PC, Martin LJ, Zhu JJ, Cai H. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis 2-deficiency leads to neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis through altered AMPA receptor trafficking. *J Neurosci* **26**:

11798-11806.

Lamanauskas N, Nistri A. 2008. Riluzole blocks persistent Na⁺ and Ca²⁺ currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Eur J Neurosci* **27**: 2501-2514.

Lamb NL, Patten BM. 1991. Clinical correlations of anti-GM1 antibodies in amyotrophic lateral sclerosis and neuropathies. *Muscle Nerve* **14**: 1021-1027.

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. 2003. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* **34**: 383-394.

LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascano J, Tokito M, Van Winkle T, Howland DS, Holzbaur EL. 2002. Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* **34**: 715-727.

Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F. 2002. Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* **111**: 219-230.

Lee MK, Cleveland DW. 1996. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* **19**: 187-217.

Lee MK, Marszalek JR, Cleveland DW. 1994. A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. *Neuron* **13**: 975-988.

Lenaz G, Cavazzoni M, Genova ML, D'Aurelio M, Merlo Pich M, Pallotti F, Formiggini G, Marchetti M, Parenti Castelli G, Bovina C. 1998. Oxidative stress, antioxidant defences and aging. *Biofactors* **8**: 195-204.

Levine JB, Kong J, Nadler M, Xu Z. 1999. Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia* **28**: 215-224.

Li B, Liu XY, Li Z, Bu H, Sun MM, Guo YS, Li CY. 2008. Effect of ALS IgG on motor neurons in organotypic spinal cord cultures. *Can J Neurol Sci* **35**: 220-225.

Ligon LA, LaMonte BH, Wallace KE, Weber N, Kalb RG, Holzbaur EL. 2005. Mutant superoxide dismutase disrupts cytoplasmic dynein in motor neurons. *Neuroreport* **16**: 533-536.

Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD. 1998. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **20**: 589-602.

Lipton SA, Rosenberg PA. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* **330**: 613-622.

Liu D, Wen J, Liu J, Li L. 1999. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB J* **13**: 2318-2328.

Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB. 2000. Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* **403**: 274-280.

Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM, Brannstrom T, Gredal O, Wong PC, Williams DS, Cleveland DW. 2004. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* **43**: 5-17.

Liu J, Shinobu LA, Ward CM, Young D, Cleveland DW. 2005. Elevation of the Hsp70 chaperone does not effect toxicity in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **93**: 875-882.

Liu R, Althaus JS, Ellerbrock BR, Becker DA, Gurney ME. 1998. Enhanced oxygen radical production in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **44**: 763-770.

Liu R, Li B, Flanagan SW, Oberley LW, Gozal D, Qiu M. 2002. Increased mitochondrial antioxidative activity or decreased oxygen free radical propagation prevent mutant SOD1-mediated motor neuron cell death and increase amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mouse survival. *J Neurochem* **80**: 488-500.

Llinas R, Sugimori M, Cherksey BD, Smith RG, Delbono O, Stefani E, Appel S. 1993. IgG from amyotrophic lateral sclerosis patients increases current through P-type calcium channels in mammalian cerebellar Purkinje cells and in isolated channel protein in lipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 11743-11747.

Low CM, Wee KS. New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Mol Pharmacol* **78**: 1-11.

Luo Y, Raible D, Raper JA. 1993. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* **75**: 217-227.

Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H, Eisen A, McClusky L, Kretzschmar HA, Monoranu CM, Highley JR, Kirby J, Siddique T, Shaw PJ, Lee VM, Trojanowski JQ. 2007. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* **61**: 427-434.

Mahoney DJ, Kaczor JJ, Bourgeois J, Yasuda N, Tarnopolsky MA. 2006. Oxidative stress and antioxidant enzyme upregulation in SOD1-G93A mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve* **33**: 809-816.

- Manfredi G, Xu Z. 2005.** Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion* **5**: 77-87.
- Marconi S, De Toni L, Lovato L, Tedeschi E, Gaetti L, Acler M, Bonetti B. 2005.** Expression of gangliosides on glial and neuronal cells in normal and pathological adult human brain. *J Neuroimmunol* **170**: 115-121.
- Martin LJ. 1999.** Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**: 459-471.
- Martin LJ, Liu Z, Chen K, Price AC, Pan Y, Swaby JA, Golden WC. 2007.** Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *J Comp Neurol* **500**: 20-46.
- Mayer ML, Westbrook GL. 1987.** The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* **28**: 197-276.
- Meng W, Tobin JR, Busija DW. 1995.** Glutamate-induced cerebral vasodilation is mediated by nitric oxide through N-methyl-D-aspartate receptors. *Stroke* **26**: 857-862; discussion 863.
- Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Dong L, Figlewicz DA, Shaw PJ. 2002.** Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **125**: 1522-1533.
- Miledi R. 1982.** A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **215**: 491-497.
- Miledi R, Parker I. 1989.** Latencies of membrane currents evoked in *Xenopus* oocytes by receptor activation, inositol trisphosphate and calcium. *J Physiol* **415**: 189-210.
- Miledi R, Parker I, Woodward RM. 1989.** Membrane currents elicited by divalent cations in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **417**: 173-195.
- Millecamps S, Salachas F, Cazeneuve C, Gordon P, Bricka B, Camuzat A, Guillot-Noel L, Russaouen O, Bruneteau G, Pradat PF, Le Forestier N, Vandenberghe N, Danel-Brunaud V, Guy N, Thauvin-Robinet C, Lacomblez L, Couratier P, Hannequin D, Seilhean D, Le Ber I, Corcia P, Camu W, Brice A, Rouleau G, LeGuern E, Meininger V. 2010.** SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* **47**: 554-560.
- Miyazaki K, Nagai M, Morimoto N, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Abe K. 2009.** Spinal anterior horn has the capacity to self-regenerate in amyotrophic lateral sclerosis model mice. *J Neurosci Res* **87**: 3639-3648.
- Mizutani K, Oka N, Kusunoki S, Kaji R, Kanda M, Akiguchi I, Shibasaki H. 2003.** Amyotrophic lateral sclerosis with IgM antibody against gangliosides GM2 and GD2. *Intern Med* **42**: 277-280.

- Montoliu C, Llansola M, Monfort P, Corbalan R, Fernandez-Marticorena I, Hernandez-Viadel ML, Felipo V. 2001.** Role of nitric oxide and cyclic GMP in glutamate-induced neuronal death. *Neurotox Res* **3**: 179-188.
- Mosier DR, Baldelli P, Delbono O, Smith RG, Alexianu ME, Appel SH, Stefani E. 1995.** Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins increase Ca²⁺ currents in a motoneuron cell line. *Ann Neurol* **37**: 102-109.
- Munch C, Sedlmeier R, Meyer T, Homberg V, Sperfeld AD, Kurt A, Prudlo J, Peraus G, Hanemann CO, Stumm G, Ludolph AC. 2004.** Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology* **63**: 724-726.
- Munoz DG, Neumann M, Kusaka H, Yokota O, Ishihara K, Terada S, Kuroda S, Mackenzie IR. 2009.** FUS pathology in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathol* **118**: 617-627.
- Murakami N, Yoshida M. 1995.** [Reappraisal of amyotrophic lateral sclerosis with dementia]. *Rinsho Shinkeigaku* **35**: 1560-1562.
- Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH, Jr., Itoyama Y. 2001.** Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci* **21**: 9246-9254.
- Nakamura T, Lipton SA. 2007.** S-Nitrosylation and uncompetitive/fast off-rate (UFO) drug therapy in neurodegenerative disorders of protein misfolding. *Cell Death Differ* **14**: 1305-1314.
- Nathan C. 1992.** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* **6**: 3051-3064.
- Neumann M. 2009.** Molecular neuropathology of TDP-43 proteinopathies. *Int J Mol Sci* **10**: 232-246.
- Neumann M, Kwong LK, Truax AC, Vanmassenhove B, Kretzschmar HA, Van Deerlin VM, Clark CM, Grossman M, Miller BL, Trojanowski JQ, Lee VM. 2007.** TDP-43-positive white matter pathology in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**: 177-183.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM. 2006.** Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **314**: 130-133.
- Nguyen KT, Garcia-Chacon LE, Barrett JN, Barrett EF, David G. 2009.** The Psi(m) depolarization that accompanies mitochondrial Ca²⁺ uptake is greater in mutant SOD1 than in wild-type mouse motor terminals. *Proc Natl Acad Sci U SA* **106**: 2007-2011.

- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. 2001b.** Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: no requirement for proapoptotic interleukin-1beta in neurodegeneration. *Ann Neurol* **50**: 630-639.
- Nguyen MD, Lariviere RC, Julien JP. 2001a.** Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron* **30**: 135-147.
- Niebroj-Dobosz I, Jamrozik Z, Janik P, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kwiecinski H. 1999.** Anti-neural antibodies in serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. *Acta Neurol Scand* **100**: 238-243.
- Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, Kok F, Oliveira JR, Gillingwater T, Webb J, Skehel P, Zatz M. 2004.** A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* **75**: 822-831.
- Nishizaki T, Matsuoka T, Nomura T, Sumikawa K. 1997.** A serum factor potentiates ACh and AMPA receptor currents via differential signal transduction pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 565-568.
- Nishizaki T, Sumikawa K. 1997.** Lysophosphatidic acid potentiates ACh receptor currents by G-protein-mediated activation of protein kinase C. *Brain Res Mol Brain Res* **50**: 121-126.
- Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, Doyu M, Murata S, Tanaka K, Taniguchi N, Sobue G. 2002.** Dofrin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J Biol Chem* **277**: 36793-36798.
- Offen D, Halevi S, Orion D, Mosberg R, Stern-Goldberg H, Melamed E, Atlas D. 1998.** Antibodies from ALS patients inhibit dopamine release mediated by L-type calcium channels. *Neurology* **51**: 1100-1103.
- Okuyama Y, Mizuno T, Inoue H, Kimoto K. 1997.** Amyotrophic lateral sclerosis with anti-acetylcholine receptor antibody. *Intern Med* **36**: 312-315.
- Olney JW. 1969.** Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**: 719-721.
- Oosthuysen B, Moons L, Störkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudénbach V, Vermynen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. 2001.** Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* **28**: 131-138.
- Oppenheim RW. 1987.** Muscle activity and motor neuron death in the spinal cord of the chick embryo. *Ciba Found Symp* **126**: 96-112.
- Pagani MR, Reisin RC, Uchitel OD. 2006.** Calcium signaling pathways mediating synaptic

potentiation triggered by amyotrophic lateral sclerosis IgG in motor nerve terminals. *J Neurosci* **26**: 2661-2672.

Panzeri C, De Palma C, Martinuzzi A, Daga A, De Polo G, Bresolin N, Miller CC, Tudor EL, Clementi E, Bassi MT. 2006. The first ALS2 missense mutation associated with JPLS reveals new aspects of alsin biological function. *Brain* **129**: 1710-1719.

Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D, Brown RH, Jr. 2004. Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* **43**: 19-30.

Pasinelli P, Brown RH. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* **7**: 710-723.

Patel YJ, Payne Smith MD, de Bellerocche J, Latchman DS. 2005. Hsp27 and Hsp70 administered in combination have a potent protective effect against FALS-associated SOD1-mutant-induced cell death in mammalian neuronal cells. *Brain Res Mol Brain Res* **134**: 256-274.

Patten BM, Harati Y, Acosta L, Jung SS, Felmus MT. 1978. Free amino acid levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **3**: 305-309.

Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman JS, Estevez AG, Barbeito L. 2004. Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **89**: 464-473.

Perroy J, Raynaud F, Homburger V, Rousset MC, Telley L, Bockaert J, Fagni L. 2008. Direct interaction enables cross-talk between ionotropic and group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* **283**: 6799-6805.

Perry VH. 2004. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun* **18**: 407-413.

Pestronk A, Adams RN, Clawson L, Cornblath D, Kuncel RW, Griffin D, Drachman DB. 1988. Serum antibodies to GM1 ganglioside in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **38**: 1457-1461.

Polleux F, Giger RJ, Ginty DD, Kolodkin AL, Ghosh A. 1998. Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* **282**: 1904-1906.

Pramatarova A, Laganiere J, Rousset J, Brisebois K, Rouleau GA. 2001. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* **21**: 3369-3374.

Pullen AH, Demestre M, Howard RS, Orrell RW. 2004. Passive transfer of purified IgG from patients with amyotrophic lateral sclerosis to mice results in degeneration of motor neurons accompanied by Ca²⁺ enhancement. *Acta Neuropathol* **107**: 35-46.

Pullen AH, Humphreys P. 2000. Ultrastructural analysis of spinal motoneurons from mice

treated with IgG from ALS patients, healthy individuals, or disease controls. *J Neurol Sci* **180**: 35-45.

Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, Mann E, Floeter MK, Bidus K, Drayna D, Oh SJ, Brown RH, Jr., Ludlow CL, Fischbeck KH. 2003. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* **33**: 455-456.

Rao SD, Weiss JH. 2004. Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci* **27**: 17-23.

Raoul C, Barker SD, Aebischer P. 2006. Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther* **13**: 487-495.

Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH, Green DR. 2004. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* **117**: 773-786.

Rippon GA, Scarneas N, Gordon PH, Murphy PL, Albert SM, Mitsumoto H, Marder K, Rowland LP, Stern Y. 2006. An observational study of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* **63**: 345-352.

Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor AR, Newbern JM, Graves J, Tytell M, Milligan CE. 2005. Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival. *J Neurosci* **25**: 9735-9745.

Rodriguez-Moreno A, Lerma J. 1998. Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron* **20**: 1211-1218.

Rodriguez-Moreno A, Sihra TS. 2004. Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *J Physiol* **557**: 733-745.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**: 59-62.

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**: 675-686.

Rothstein JD, Kuncl R, Chaudhry V, Clawson L, Cornblath DR, Coyle JT, Drachman DB. 1991. Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Ann Neurol* **30**: 224-225.

Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. 1992. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* **326**: 1464-1468.

- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB. 2005.** Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* **433**: 73-77.
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. 1990.** Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **28**: 18-25.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. 1995.** Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **38**: 73-84.
- Rozas JL, Paternain AV, Lerma J. 2003.** Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors. *Neuron* **39**: 543-553.
- Sasaki S, Komori T, Iwata M. 2000.** Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* **100**: 138-144.
- Schiffer D, Cordera S, Cavalla P, Migheli A. 1996.** Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **139 Suppl**: 27-33.
- Schmidt ER, Pasterkamp RJ, van den Berg LH. 2009.** Axon guidance proteins: novel therapeutic targets for ALS? *Prog Neurobiol* **88**: 286-301.
- Schmidt ML, Zhukareva V, Perl DP, Sheridan SK, Schuck T, Lee VM, Trojanowski JQ. 2001.** Spinal cord neurofibrillary pathology in Alzheimer disease and Guam Parkinsonism-dementia complex. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**: 1075-1086.
- Sengun IS, Appel SH. 2003.** Serum anti-Fas antibody levels in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol* **142**: 137-140.
- Shaw PJ, Ince PG, Falkous G, Mantle D. 1995.** Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol* **38**: 691-695.
- Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S, Kobayashi M. 2001.** Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* **917**: 97-104.
- Shinder GA, Lacourse MC, Minotti S, Durham HD. 2001.** Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins have altered solubility and interact with heat shock/stress proteins in models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* **276**: 12791-12796.
- Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH. 1996.** Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **39**: 203-216.
- Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH. 2004.** Increased lipid peroxidation

in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* **62**: 1758-1765.

Simpson EP, Yen AA, Appel SH. 2003. Oxidative Stress: a common denominator in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* **15**: 730-736.

Sive HL, Grainger RM, Harland RM. 2000. Early Development of *Xenopus laevis*; A Laboratory Manual.

Smith RA, Miller TM, Yamanaka K, Monia BP, Condon TP, Hung G, Lobsiger CS, Ward CM, McAlonis-Downes M, Wei H, Wancewicz EV, Bennett CF, Cleveland DW. 2006. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* **116**: 2290-2296.

Smith RG, Alexianu ME, Crawford G, Nyormoi O, Stefani E, Appel SH. 1994. Cytotoxicity of immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients on a hybrid motoneuron cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3393-3397.

Smith RG, Siklos L, Alexianu ME, Engelhardt JI, Mosier DR, Colom L, Habib Mohamed A, Appel SH. 1996. Autoimmunity and ALS. *Neurology* **47**: S40-45; discussion S45-46.

Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Le Forestier N, Marouan A, Dib M, Meininger V. 2002. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci* **193**: 73-78.

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Bellerocche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE. 2008. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **319**: 1668-1672.

Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmans S, Oh H, Van Damme P, Rutten B, Man WY, De Mol M, Wyns S, Manka D, Vermeulen K, Van Den Bosch L, Mertens N, Schmitz C, Robberecht W, Conway EM, Collen D, Moons L, Carmeliet P. 2005. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* **8**: 85-92.

Strong MJ. 2000. Exogenous neurotoxins. London, UK: In Amyotrophic Lateral Sclerosis (eds. Brown, R.H.J., Meininger, V. and Swash, M.) Publisher: Martin Dunitz. 279-287.

Strong MJ. 2003. The basic aspects of therapeutics in amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmacol Ther* **98**: 379-414.

Strong MJ, Kesavapany S, Pant HC. 2005. The pathobiology of amyotrophic lateral sclerosis: a proteinopathy? *J Neuropathol Exp Neurol* **64**: 649-664.

Swanson CJ, Bures M, Johnson MP, Linden AM, Monn JA, Schoepp DD. 2005. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 131-144.

Sweatt JD. 2001. Protooncogenes subserve memory formation in the adult CNS. *Neuron*

31: 671-674.

Swerdlow RH, Parks JK, Cassarino DS, Trimmer PA, Miller SW, Maguire DJ, Sheehan JP, Maguire RS, Pattee G, Juel VC, Phillips LH, Tuttle JB, Bennett JP, Jr., Davis RE, Parker WD, Jr. 1998. Mitochondria in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* **153**: 135-142.

Takeuchi H, Kobayashi Y, Yoshihara T, Niwa J, Doyu M, Ohtsuka K, Sobue G. 2002. Hsp70 and Hsp40 improve neurite outgrowth and suppress intracytoplasmic aggregate formation in cultured neuronal cells expressing mutant SOD1. *Brain Res* **949**: 11-22.

Tarabal O, Caldero J, Casas C, Oppenheim RW, Esquerda JE. 2005. Protein retention in the endoplasmic reticulum, blockade of programmed cell death and autophagy selectively occur in spinal cord motoneurons after glutamate receptor-mediated injury. *Mol Cell Neurosci* **29**: 283-298.

Tateishi T, Hokonohara T, Yamasaki R, Miura S, Kikuchi H, Iwaki A, Tashiro H, Furuya H, Nagara Y, Ohyagi Y, Nukina N, Iwaki T, Fukumaki Y, Kira JI. 2009. Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with FUS mutation. *Acta Neuropathol* **119**: 355-364.

Ticozzi N, Silani V, LeClerc AL, Keagle P, Gellera C, Ratti A, Taroni F, Kwiatkowski TJ, Jr., McKenna-Yasek DM, Sapp PC, Brown RH, Jr., Landers JE. 2009. Analysis of FUS gene mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis within an Italian cohort. *Neurology* **73**: 1180-1185.

Tidwell JL, Houenou LJ, Tytell M. 2004. Administration of Hsp70 in vivo inhibits motor and sensory neuron degeneration. *Cell Stress Chaperones* **9**: 88-98.

Tigyi G, Dyer D, Matute C, Miledi R. 1990. A serum factor that activates the phosphatidylinositol phosphate signaling system in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1521-1525.

Tigyi G, Miledi R. 1992. Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* **267**: 21360-21367.

Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C. 1999. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **46**: 129-131.

Tortarolo M, Grignaschi G, Calvaresi N, Zennaro E, Spaltro G, Colovic M, Fracasso C, Guiso G, Elger B, Schneider H, Seilheimer B, Caccia S, Bendotti C. 2006. Glutamate AMPA receptors change in motor neurons of SOD1G93A transgenic mice and their inhibition by a noncompetitive antagonist ameliorates the progression of amyotrophic lateral sclerosis-like disease. *J Neurosci Res* **83**: 134-146.

Tran TS, Kolodkin AL, Bharadwaj R. 2007. Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 263-292.

- Trotti D, Danbolt NC, Volterra A. 1998.** Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* **19**: 328-334.
- Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA. 1999.** SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* **2**: 848.
- Tsang YM, Chiong F, Kuznetsov D, Kasarskis E, Geula C. 2000.** Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments: cross-species comparison and alterations in ALS. *Brain Res* **861**: 45-58.
- Turner BJ, Talbot K. 2008.** Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* **85**: 94-134.
- Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB. 2004.** Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* **15**: 601-609.
- Uchitel OD, Appel SH, Crawford F, Sczupak L. 1988.** Immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients enhance spontaneous transmitter release from motor-nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7371-7374.
- Urushitani M, Shimohama S, Kihara T, Sawada H, Akaike A, Ibi M, Inoue R, Kitamura Y, Taniguchi T, Kimura J. 1998.** Mechanism of selective motor neuronal death after exposure of spinal cord to glutamate: involvement of glutamate-induced nitric oxide in motor neuron toxicity and nonmotor neuron protection. *Ann Neurol* **44**: 796-807.
- Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP. 2006.** Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* **9**: 108-118.
- Van Damme P, Bogaert E, Dewil M, Hersmus N, Kiraly D, Scheveneels W, Bockx I, Braeken D, Verpoorten N, Verhoeven K, Timmerman V, Herijgers P, Callewaert G, Carmeliet P, Van Den Bosch L, Robberecht W. 2007.** Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14825-14830.
- Van Damme P, Braeken D, Callewaert G, Robberecht W, Van Den Bosch L. 2005.** GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**: 605-612.
- Van Damme P, Robberecht W. 2009.** Recent advances in motor neuron disease. *Curr Opin Neurol* **22**: 486-492.
- Van Damme P, Van Den Bosch L, Van Houtte E, Callewaert G, Robberecht W. 2002.** GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective vulnerability of motor neurons to excitotoxicity. *J Neurophysiol* **88**: 1279-1287.

Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, Elman LB, Clay D, Wood EM, Chen-Plotkin AS, Martinez-Lage M, Steinbart E, McCluskey L, Grossman M, Neumann M, Wu IL, Yang WS, Kalb R, Galasko DR, Montine TJ, Trojanowski JQ, Lee VM, Schellenberg GD, Yu CE. 2008. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol* **7**: 409-416.

Van Den Bosch L, Storkebaum E, Vleminckx V, Moons L, Vanopdenbosch L, Scheveneels W, Carmeliet P, Robberecht W. 2004. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* **17**: 21-28.

Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* **1762**: 1068-1082.

Van Den Bosch L, Vandenberghe W, Klaassen H, Van Houfte E, Robberecht W. 2000. Ca²⁺-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci* **180**: 29-34.

Van Langenhove T, van der Zee J, Slegers K, Engelborghs S, Vandenberghe R, Gijssels I, Van den Broeck M, Matheijssens M, Peeters K, De Deyn PP, Cruts M, Van Broeckhoven C. 2010. Genetic contribution of FUS to frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* **74**: 366-371.

Van Vught PW, Sutedja NA, Veldink JH, Koeleman BP, Groeneveld GJ, Wijmenga C, Uifdehaag BM, de Jong JM, Baas F, Wokke JH, Van den Berg LH. 2005. Lack of association between VEGF polymorphisms and ALS in a Dutch population. *Neurology* **65**: 1643-1645.

Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE. 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* **323**: 1208-1211.

Vande Velde C, Miller TM, Cashman NR, Cleveland DW. 2008. Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 4022-4027.

Vandenberghe W, Robberecht W, Brorson JR. 2000. AMPA receptor calcium permeability, GluR2 expression, and selective motoneuron vulnerability. *J Neurosci* **20**: 123-132.

Varela-Echavarria A, Tucker A, Puschel AW, Guthrie S. 1997. Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* **18**: 193-207.

Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H, Heinze HJ, Elger CE, Schubert W, Kunz WS. 2000. Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **123 (Pt 7)**: 1339-1348.

von Lewinski F, Keller BU. 2005. Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron

vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci* **28**: 494-500.

Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ. 1997. cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* **89**: 73-82.

Waltreit R, Weller M. 2003. Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* **27**: 99-106.

Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD. 2001. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* **8**: 933-941.

West M, Mhatre M, Ceballos A, Floyd RA, Grammas P, Gabbita SP, Hamdheydari L, Mai T, Mou S, Pye QN, Stewart C, West S, Williamson KS, Zemlan F, Hensley K. 2004. The arachidonic acid 5-lipoxygenase inhibitor nordihydroguaiaretic acid inhibits tumor necrosis factor alpha activation of microglia and extends survival of G93A-SOD1 transgenic mice. *J Neurochem* **91**: 133-143.

Weydt P, Yuen EC, Ransom BR, Moller T. 2004. Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice. *Glia* **48**: 179-182.

Williams TL, Day NC, Ince PG, Kamboj RK, Shaw PJ. 1997. Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **42**: 200-207.

Williamson TL, Cleveland DW. 1999. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* **2**: 50-56.

Winberg ML, Noordermeer JN, Tamagnone L, Comoglio PM, Spriggs MK, Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1998. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* **95**: 903-916.

Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM. 2008. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J Biol Chem* **283**: 13302-13309.

Wollmuth LP, Sobolevsky AI. 2004. Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* **27**: 321-328.

Wong NK, He BP, Strong MJ. 2000. Characterization of neuronal intermediate filament protein expression in cervical spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neuropathol Exp Neurol* **59**: 972-982.

Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* **14**: 1105-1116.

Wood JD, Beaujeux TP, Shaw PJ. 2003. Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* **29**: 529-545.

Wood-Allum C, Shaw PJ. 2010. Motor neurone disease: a practical update on diagnosis and management. *Clin Med* **10**: 252-258.

Woulfe J, Gray DA, Mackenzie IR. 2009. FUS-immunoreactive intranuclear inclusions in neurodegenerative disease. *Brain Pathol* **20**: 589-597.

Wu AS, Kiaei M, Aguirre N, Crow JP, Calingasan NY, Browne SE, Beal MF. 2003. Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **85**: 142-150.

Wu D, Yu W, Kishikawa H, Folkerth RD, Iafate AJ, Shen Y, Xin W, Sims K, Hu GF. 2007. Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **62**: 609-617.

Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland DW. 1993. Involvement of neurofilaments in motor neuron disease. *J Cell Sci Suppl* **17**: 101-108.

Yamashita H, Kawamata J, Okawa K, Kanki R, Nakamizo T, Hatayama T, Yamanaka K, Takahashi R, Shimohama S. 2007. Heat-shock protein 105 interacts with and suppresses aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase: clues to a possible strategy for treating ALS. *J Neurochem* **102**: 1497-1505.

Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T. 2001. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* **29**: 160-165.

Yasojima K, Tourtellotte WW, McGeer EG, McGeer PL. 2001. Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: implications for therapy. *Neurology* **57**: 952-956.

Yoshida S, Mulder DW, Kurland LT, Chu CP, Okazaki H. 1986. Follow-up study on amyotrophic lateral sclerosis in Rochester, Minn., 1925 through 1984. *Neuroepidemiology* **5**: 61-70.

Zhang B, Tu P, Abtahian F, Trojanowski JQ, Lee VM. 1997. Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J Cell Biol* **139**: 1307-1315.

Zhang F, Strom AL, Fukada K, Lee S, Hayward LJ, Zhu H. 2007. Interaction between familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked SOD1 mutants and the dynein complex. *J Biol Chem* **282**: 16691-16699.

Zhang Y, Zhang H, Fu Y, Song H, Wang L, Zhang J, Fan D. 2006. VEGF C2578A polymorphism does not contribute to amyotrophic lateral sclerosis susceptibility in sporadic Chinese patients. *Amyotroph Lateral Scler* **7**: 119-122.

Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP, Appel SH. 2010. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* **58**: 231-243.

Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM. 2002. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* **417**: 74-78.

ANNEX



Increased intramuscular nerve branching and inhibition of programmed cell death of chick embryo motoneurons by immunoglobulins from patients with motoneuron disease

Sara Hernández^a, Laura Teixidó^b, Jordi Calderó^a, Dolors Ciutat^a, Lúdia Piedrafità^a, Anna Casanovas^a, Joan Blasi^b, Carles Solsona^b, Mònica Povedano^c, Ricardo Rojas^d, Isabel Illa^d, James Caress^{e,g}, David Prevette^f, Ronald W. Oppenheim^{f,g}, Carol Milligan^{f,g}, Josep E. Esquerda^{a,*}

^a Universitat de Lleida, Facultat de Medicina, Departament de Medicina Experimental, and IRBLLLEIDA, Montserrat Roig 2, Lleida, Catalonia, Spain

^b Universitat de Barcelona, Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, and IDIBELL, Spain

^c Hospital de Bellvitge, Servei de Neurologia, C. Feixa Llarga s/n, Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

^d Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Departament de Neurologia, C. Sant Antoni Maria Claret 167, Barcelona, Catalonia, Spain

^e Department of Neurology, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC 27157, USA

^f Department of Neurobiology and Anatomy and Neuroscience Program, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC 27157, USA

^g ALS Center, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC 27157, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 March 2010

Received in revised form 27 July 2010

Accepted 28 July 2010

Keywords:

Amyotrophic lateral sclerosis

Immunoglobulins

Semaphorin

Programmed cell death

Motoneuron

Chick embryo

Cerebrospinal fluid

ABSTRACT

Massive programmed cell death (PCD) of developing chick embryo motoneurons (MNs) occurs in a well defined temporal and spatial sequence between embryonic day (E) 6 and E10. We have found that, when administered *in ovo*, either circulating immunoglobulins G (IgGs) or cerebrospinal fluid from patients with MN disease can rescue a significant number of chick embryo MNs from normally occurring PCD. An increase of branching of intramuscular nerves was also observed that may account for the rescuing effects of pathologic IgGs. Proteomic analysis and further analysis by ELISA indicated that these effects may be mediated by the interaction of circulating human immunoglobulins with proteins of the semaphorin family.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset disease characterized by degeneration and loss of upper and lower motoneurons (MNs) in the cortex, brainstem and spinal cord. Consequently, a progressive neuromuscular deficit occurs that includes muscle atrophy, spasticity, MN loss and paralysis with an average survival of 2–3 years after clinical disease onset. Clinical variants of the disease have been described affecting only spinal lower MNs, upper MNs or MNs innervating the bulbar muscles (Barber and Shaw, 2007). About 10% of cases are familial (FALS) with 20% of these caused by a toxic gain-of-function induced by mutations of the Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) (Rosen et al., 1993), whereas the remaining ~90% are considered sporadic. The pathogenic mechanisms that cause

selective MN degeneration, in ALS remain largely unknown. Much of our knowledge regarding pathogenesis comes from studies of in transgenic rodents that overexpress mutant SOD1 and develop a motor pathology similar to human ALS (Gurney et al., 1994). Some of the proposed mechanisms involved in MN degeneration, include glutamate-mediated excitotoxicity, protein aggregation, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, cytoskeletal and axonal transport alteration, lack of growth factors, dysfunction in non-neural cells and activation of neuroinflammatory cascades (Cleveland and Rothstein, 2001; Bruijn et al., 2004; Shaw, 2005; Pasinelli and Brown, 2006). Autoimmune mechanisms have also been proposed as important in sporadic ALS but its significance is still not clear (Appel et al., 1991; Drachman et al., 1995; Zhang et al., 2005). Activation of microglia and T lymphocytes is a commonly observed aspect of ALS pathology in rodent and also in human spinal cord tissue (Troost et al., 1989; Kawamata et al., 1992; Alexianu et al., 2001; Henkel et al., 2004), and treatment with the anti-inflammatory drug minocycline delays the progression of the disease in mice (Kriz et al., 2002; Zhu et al., 2002). It has also been suggested that adaptive humoral immune response

* Corresponding author. Unitat de Neurobiologia Cel·lular, Departament de Medicina Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, C. Montserrat Roig 2, 25008 Lleida, Catalonia, Spain. Tel.: +34 973 702427; fax: +34 973 702426. E-mail address: josep.esquerda@mex.udl.cat (J.E. Esquerda).

could be involved in ALS (Saleh et al., 2009). A variety of auto-antibodies have been described in ALS patients' sera or cerebrospinal fluid (CSF). These are mainly directed to gangliosides (Pestronk et al., 1989; Yoshino et al., 1992; Stevens et al., 1993; Niebroj-Dobosz et al., 2004), neurofilaments (Couratier et al., 1998) and voltage-dependent calcium channels (VDCCs) (Delbono et al., 1991; Smith et al., 1992; Llinás et al., 1993; Magnelli et al., 1993; Kimura et al., 1994; Grassi et al., 1999). Although controversial, there are some reports that describe neurotoxic antibodies in the sera of ALS patients (Demestre et al., 2005) that may deregulate intracellular calcium (Alexianu et al., 1994; Smith et al., 1994) or activate cell death receptors like Fas (Yi et al., 2000; Tikka et al., 2002; Sengun and Appel, 2003). However, other studies have failed to demonstrate the induction of neuronal death by ALS immunoglobulins (Martí-Fabregas et al., 1992; Drachman et al., 1995; Li et al., 2008).

The chick embryo is a good *in vivo* model system for studying molecules that promote the survival or death of spinal cord MNs. In this paradigm the substances are applied onto the vascularised chorioallantoic membrane and their effects on MN survival are evaluated (Houenou et al., 1994; Calderó et al., 1998). Normally, chick embryo MNs undergo developmentally regulated programmed cell death (PCD) in a well defined time window between embryonic day (E) 6 and E10 in which MNs interact with their target muscle cells. Pilot studies suggest that the injection of sera from ALS patients into the chick embryo during the normal period of MN death results in the rescue of a significant number of spinal MNs (Oppenheim, 1987). Based on these initial reports, we have undertaken further investigations to replicate and expand these experiments. First, we have confirmed the survival promoting effect of ALS IgGs and we have additionally found that this rescue may be related to the presence of antibodies that promote the branching of intramuscular axons by their ability to interfere with semaphorin signaling.

2. Material and methods

2.1. Human sera, *in ovo* treatments and chick embryo histology

Sera from 12 different patients with MN disease were used for testing their effects on MN numbers in the chick embryo spinal cord. These sera include: 6 ALS (2 males and 4 females), 5 lower MN disease (LMD; 4 males and 1 females) and 1 progressive bulbar paralysis (PBP, 1 male) (Table 1). Sera from apparently healthy adults were used as controls. Sera from 18 patients affected by neurological disorders other than ALS (Parkinson's and Alzheimer's disease and, myasthenia gravis) were also used. Individuals were diagnosed at the Servei de Neurologia of the Hospital de Sant Pau and Servei de Neurologia of the Hospital de Bellvitge (Barcelona, Catalonia, Spain). ALS was diagnosed and classified according to the El Escorial criteria (Brooks, 1994) on the basis of clinical and electrophysiological data.

Blood samples were collected, and used according patient's information and consent, and sera were immediately frozen at -80°C . Before use, sera were decemented by heating 30 min 56°C and dialyzed against 0.1 M phosphate buffered saline (pH = 7.4).

IgGs were isolated by using GammaBind Plus (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), with the standard manufacturer protocol. Briefly, 2 ml of protein G were washed twice with 8 ml of PBS and coated with 500 μl of human sera for 2 h at room temperature. After that, the mixture was centrifuged and the supernatant was stored as human sera fraction without IgGs. The protein G was washed twice with PBS and 2.5 ml of 0.2 M glycine, pH = 8, were added. After centrifugation, the eluted fraction was stored with 1.5 ml of 1 M Tris, pH = 8. This was the sera fraction with IgGs, which was dialyzed against 0.1 M phosphate buffered saline (pH = 7.4) for 48 h. The protein concentration of purified IgGs was 4–10 mg/ml.

Some studies were performed also with ALS cerebrospinal fluid (CSF). Eighteen patients (11 males and 7 females) were identified from

Table 1

Study subject sera and summary of results. ND=not determined; += significant promoting activity. In the duration column: --=alive, ND=patient missing after diagnosis.

Patient subject reference	Diagnosis	Duration (months)	MN survival	Axonal branching	Growth cone collapse	ELISA anti-sema 3A
1	LMD	114	+	+	+	+
2	PBP	ND	–	–	ND	ND
3	ALS	54	+	+	ND	ND
4	ALS	61	+	+	+	+
5	LMD	ND	+	+	+	+
6	ALS	–	–	–	ND	–
7	ALS	56	+	+	ND	ND
8	LMD	–	+	+	ND	+
9	ALS	84	–	–	ND	ND
10	ALS	ND	+	+	ND	ND
11	LMD	ND	+	+	ND	–
12	ALS	ND	ND	ND	ND	+
13	ALS	ND	ND	ND	ND	–
14	ALS	ND	ND	ND	ND	–
15	ALS	ND	ND	ND	ND	–
16	ALS	ND	ND	ND	ND	–
17	ALS	ND	ND	ND	ND	–
18	ALS	ND	ND	ND	ND	–
19	ALS	ND	ND	ND	ND	+
20	ALS	ND	ND	ND	ND	–
21	ALS	ND	ND	ND	ND	–
22	ALS	ND	ND	ND	ND	–
23	ALS	ND	ND	ND	ND	–
24	ALS	19	ND	ND	ND	–
25	ALS	ND	ND	ND	ND	–
26	ALS	28	ND	ND	ND	–
27	ALS	90	ND	ND	ND	–
28	ALS	49	ND	ND	ND	–
29	ALS	44	ND	ND	ND	–
30	ALS	ND	ND	ND	ND	–
31	ALS	58	+	+	+	+
32	ALS	18	ND	ND	ND	–
33	ALS	36	ND	ND	ND	–
34	ALS	–	ND	ND	ND	–

the population of the Wake Forest University Baptist Medical Center (WFUBMC) ALS Center that met strict research criteria for classical ALS with upper and lower motor neuron findings localized to the same limbs (Brooks, 1994). Patients were recruited in a 2:1 ratio of limb-onset to bulbar onset patients to reflect the naturally occurring clinical presentation of the disease (Murray and Mitsumoto, 2002). Fifteen control participants were screened with a general health questionnaire and were excluded if any significant medical or neurologic conditions were present including prominent headaches and/or back pain. All participants underwent manual motor testing of the limbs and strength was graded according to the Medical Research Council (MRC) scale. The WFUBMC Institutional Review Board approved this study, and all participants provided informed consent. Twenty milliliters of CSF was collected by lumbar puncture and 30 ml of venous blood was drawn from each subject. Spinal fluid was analyzed for glucose, protein, and cell count at the WFUBMC laboratory and immunoglobulin profiles were performed by a commercial laboratory (Specialty Laboratory, Santa Monica, CA). The concentration of IgG, IgA, IgM, and albumin in the CSF and serum was measured by nephelometry, and the referral laboratory calculated CSF:serum indices for albumin and IgG. Oligoclonal banding was evaluated by isoelectric focusing. The remaining CSF was stored at -80°C and the remaining blood was allowed to clot for 30–45 min at room temperature. The sample was centrifuged (10,000 g for 10 min. at 4°C); serum collected (10–15 ml) and stored at -80°C .

Fertilized chicken eggs were incubated in the laboratory at 37.5°C and 45% relative humidity. Chick embryos were treated daily from E5 to E9 by applying different doses of dialyzed and heat-inactivated serum *in ovo*, through a window in the shell. On E10, embryos were

fixed with either Carnoy or Bouin solution and processed for paraffin embedding. MNs were blind counted in thionin-stained serial transverse (16 µm thick) sections throughout the lumbosacral segment of spinal cord. Apparently, healthy cells located in the lumbar lateral motor column (LMC) were counted in every 10th section according to previously established criteria (Clarke and Oppenheim, 1995; Calderó et al., 1997). Each individual serum was tested in 4–8 chick embryos. In another set of experiments, purified IgGs were tested by using a similar protocol. For testing CSF collected from ALS patients and healthy control subjects, similar protocol was used. Each embryo was treated with 5 µg protein, as determined by protein assays of the CSF, between E6 and E9.

For examination of intramuscular branching in muscle whole mounts, a previously described protocol was followed (Calderó et al., 1998). In brief, embryos were first fixed for 4 h in Dent's fixative at –20 °C. Afterwards, samples were rehydrated through a graded methanol series and washed in PBS, and iliofibularis (IFIB) muscles were dissected. Whole muscles were blocked for 2 h in PBS containing 0.4% Triton X-100 (PBST) and 20% horse serum, and incubated with the mouse anti-class III β-tubulin monoclonal antibody (1/1000 diluted, TuJ-1, R&D Systems; Minneapolis, MN, USA) for 24–48 h at 4 °C. After several washes in PBS, samples were incubated with Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse IgG and imaged under a FluoView 500 Olympus confocal microscope (Olympus, Hamburg, Germany).

Quantitative measurements of the density and complexity of innervation were made by means of image analysis after digital skeletonization of whole IFIB muscle under Visilog 6.3 software (Noesis, Orsay, France). Each individual serum was tested in 4–6 muscles from different chick embryos.

2.2. SDS PAGE–Western blotting

Samples were homogenized using an insulin syringe in 10 volumes of ice-cold buffer (2% SDS, 125 mM Tris–HCl pH = 6.8, 10% sacrose, 0.02% bromophenol blue) containing the protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO, ref. P8340) and were size separated through denaturing SDS-PAGE. An equal amount of protein for each sample was heated at 100 °C for 5 min with an equivalent volume of sample buffer (containing 8% SDS and 2% mercaptoethanol) and loaded onto 10% polyacrylamide gels. The proteins were electro-transferred to a nitrocellulose membrane in Tris–glycine–methanol buffer. The membranes were blocked for 1 h at room temperature in a blocking solution mixture of 5% nonfat dry milk, 0.1% Tween 20, and TBS. The membranes were then incubated for 2 h at room temperature with the anti-Semaphorin 3A (sema 3A) (Abcam, Cambridge, UK) antibody (1/500 dilution) or with the human sera (1/100 dilution). The membranes were rinsed with TBS–Tween20 and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences) for 1 h at room temperature. The blots were then washed and processed for analysis using a Supersignal ChemiLuminescence detection kit (Pierce, Rockford, IL) as described by the manufacturer.

2.3. 2D electrophoresis

The volume carrying 100 µg of total soluble protein was mixed with a rehydration buffer containing: 8 M urea, 0.5% (v/v) CHAPS, 50 mM DTT, 0.5% (v/v) Biolytes (Biorad, Hercules, CA) to bring to a final volume of 200 µl. A trace of bromophenol blue was added to the sample, which was placed into 11 cm strip holder. The IPG strip (pH 3–10; 11 cm, Biorad) was carefully placed over the protein sample and overlaid with mineral oil as a cover fluid. The IPG strip was allowed to actively rehydrate with the protein sample for 2 h. This was directly linked to a five-step focusing protocol (6 h 30 V, 3 h 60 V, 1 h 200 V, 1 h 500 V, 1 h 5000 V, and 1 h 8000 V). The whole procedure was controlled at 20 °C. The strip gel was incubated in equilibration buffer [1.5 M Tris–HCl (pH 8.8), 6 M urea, 20% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS]

containing 130 mM DTT for 10 min with gentle agitation, followed by incubation in the same equilibration buffer supplemented with 135 mM iodoacetamide for 10 min at room temperature. The IPG strip was then placed onto a 10% SDS-PAGE. The protein standards were loaded adjacent to the pH 3.0 end of the IPG strip. Electrophoresis was carried out at 100 mA. The western blotting was carried out as described above. To visualize protein spots, the PAG was subsequently stained with Flamingo Fluorescent Gel Stain (Biorad) or silver nitrate (Silver Staining Kit, GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

2.4. Identification of proteins by MALDI-TOF MS

The bands were sliced manually from the gel and individually digested with 100–150 ng of trypsin (Promega, Alcobendas, Spain) at 37 °C overnight, using a Montage In-Gel DigestZP (Millipore, Billerica, MA) following the standard manufacturer protocol. The resulting peptides were dried and resuspended in 0.1% trifluoroacetyl acid. 0.5 µl of them were mixed with the same amount of α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (3 mg/ml). Next, they were analyzed by a MALDI-TOF Voyager DE Pro mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA) operated in delayed extraction reflector mode at 20 kV as accelerating voltage, 90 ns of pulse delay time, 75% of a grid voltage, and a guide wire voltage of 0.005%. Spectra were accumulated for 100 laser shots and were visualized and analyzed using Data Explorer software version 4.2 (Applied Biosystems). Monoisotopic peaks were used for identification using the Protein Prospector MS-Fit software version 3.2 using Swiss-Prot as database search according the following search parameters: taxonomy, *Gallus gallus*; min. # peptides required to match, 4; MOWSE on 1; MOWSE P factor, 0.4; monoisotopic masses; MW search from 1000–100 000 Da; pl 3–10; constant modifications, carbamidomethyl (C); possible modifications, peptide N-terminal Gln to pyroGlu, oxidation of M, protein N-terminus acetylated.

2.5. Cell culture and transfection

Simian COS7 cells were transfected using a 1/1 ratio of Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) with a soluble AP-tagged Sema-3A pBK-CMV encoding vector (from Dr. Kolodkin, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, U.S.A.). The supernatants were harvested 72 h post-transfection and concentrated on Amicon Ultra columns (Millipore). Sema 3A was purified using AP Affinity Chromatography (Biogene Ltd, Kimbolton, UK, ref. Q330) and protein concentration was calculated.

2.6. ELISA

Sera 29 from MN disease patients, 9 from pathological controls and 10 from healthy controls were assayed. One microgram of Semaphorin 3A in bicarbonate/carbonate coating buffer (100 mM) was added to each well on a 96-well flat-bottom Maxisorp plate (Nunc, Langensfeld, Germany), and the wells were coated overnight at 4 °C. The plates were washed automatically in the ELISA plate washer (Das, Rome, Italy) with 0.04% Tween in PBS. PBS buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) was added as blocking solution. After incubation for 2 h at 25 °C, the plates were washed using 0.04% Tween in PBS and 50 µl of a solution of human sera (1/25) in blocking buffer was added to each well. The plates were incubated overnight at 4 °C and, subsequently, washed twice with 0.04% Tween in PBS. Fifty microliters of peroxidase-conjugated secondary antibody anti-human IgG (Amersham, 1/2000) in blocking buffer was added to each well and incubated for 2 h at 25 °C. The plates were washed using 0.04% Tween in PBS and 100 µl OPD (Sigma) substrate was added to each well. After incubation for 15 min at 25 °C, the reaction was stopped by adding 50 µl of 2.5 M H₂SO₄. The absorbance was measured at 492 nm.

2.7. Dorsal root ganglion (DRG) culture and collapse assay

DRG from E7 chick embryos were dissected and cultured in F12H medium supplemented as described in Bottenstein et al. (1980) plus 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 ng/ml streptomycin, 20 ng/ml 7 S nerve growth factor (NGF, Sigma), 10–5 myctosine arabinofuranoside (Sigma), 10–5 M fluorodeoxy uridine (Sigma), 5% fetal calf serum and 5% chicken serum. DRG were cultured for 24 h (5% CO₂, 37 °C) on poli-lysin-laminin coated wells of 6-well dishes. For the collapse assay, 40 min before application of Sema 3A, the culture medium was switched to low NGF (10 ng/ml). The growth cone collapse assay was essentially performed as described elsewhere (Raper and Kapfhammer, 1990). Different concentrations of Sema 3A pre-incubated with human sera or anti-Sema 3A antibody (Abcam) were added. Incubation with medium containing Sema 3A was maintained for 1 h, and then the cultures were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, stained with phalloidin-TRITC (Sigma), and observed with a FluoView 500 Olympus (Hamburg, Germany) confocal microscope.

2.8. Statistical analysis

Data were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was carried out using either one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-hoc test, the Student's t test or Mann–Whitney U-test. Differences were considered to be significant if $p < 0.05$. In order to normalize the effect of human variability, all statistical analysis of CSF studies were determined using the log transformation of data.

3. Results

3.1. Sera and CSF from patients with MN disease rescue chick embryo MNs from normally occurring programmed cell death

To assess whether the regulation of chick embryo MN death can be altered by the influence of factors present in sera of patients with MN disease, distinct doses (5, 10 and 20 μ l) of sera taken from one ALS, one LMD and one healthy control were daily injected from E5 to E9, and the number of lumbosacral MNs were evaluated at E10. It was found that MN numbers were moderately, although significantly, increased in embryos treated with either ALS or LMD sera (about 114% vs. saline, 100%) (Fig. 1A–C). Based on these data we used a 20 μ l dose in subsequent tests of sera. Five out of the 6 ALS sera and 4 out of the 4 LMD sera produced a similar effect. In addition, after testing 8 pathological control sera (affected with Parkinson's or Alzheimer's disease) we have not observed any increase in MN numbers (Fig. 1D–E).

To further analyze whether the MN survival promoting effect obtained was associated with a specific sera fraction, the same experiment was performed after IgGs isolation. It was found that the injection of purified IgGs resulted in a similar MN rescuing effect that was not obtained with the remaining sera fraction (Fig. 2A and B).

The interaction of MNs with their target muscle cells is a key factor in the regulation of developmental PCD. During development, MNs compete for access to limited amounts of trophic factors derived from target tissue (Oppenheim, 1991). PCD may be experimentally reduced in chick embryo MNs by increasing the availability of trophic factors after pharmacological overloading *in ovo* (Oppenheim et al., 1995; Calderó et al., 1998). Alternatively, MNs can be also experimentally rescued from PCD if their access to target-derived trophic factors is enhanced by increasing intramuscular axonal branching and synapse formation (i.e. by activity blockade; Oppenheim et al., 1989; Oppenheim et al., 2003).

Because previous studies have failed to observe neurotrophic activity in ALS serum (Martí-Fàbregas et al., 1992; Carter and Mylnieff, 2003; Li et al., 2008), we explored the possibility that the MN survival-promoting effects of these sera may be due to increased axonal

branching sufficient to provide increased access to muscle-derived neurotrophic factors. Chick embryos were then treated from E5 to E7 with either control (apparently healthy and from patients with non-ALS neurological diseases) or MN disease sera, and the pattern of intramuscular axonal branching was analyzed on E8 in immunostained whole mounts of IFIB muscle (Fig. 3A–F). After digital skeletonization of confocal-imaged whole muscle innervation (Fig. 3G), the following parameters indicative of the extent of axonal branching were quantified: a) the number nerve intervals between branches (segments); b) the number of nerve end points, and c) the number of points in which three or more branches arise. Fig. 3H–J shows the results obtained after pooling the data from 6 ALS, 5 LMD, 1 PBP, 5 healthy control, and 8 pathological control sera. All the parameters indicative of axonal branching were significantly increased in muscles from embryos treated with ALS or LMD sera, in a positive correlation with MN survival promoting activity (Table 1).

Embryonic chicks were also treated daily with CSF collected from ALS patients (either from limb or bulbar onset) and healthy control subjects. The results shown in Fig. 1F, indicate that ALS CSF was able to rescue MNs from PCD in a similar extend that was observed with sera.

3.2. Proteomic analysis of chick embryo CNS proteins recognized by MN disease IgGs indicate that semaphorin family proteins are a target

In order to further investigate the molecular mechanism by which MN disease sera promotes chick embryo MN survival and increased axonal branching, the binding of human IgGs to E10 chick embryo proteins obtained from different tissues was analyzed by western blotting. It was found that, in contrast to healthy control IgGs, which do not recognize chick embryo proteins, most sera from MN disease patients detected protein bands in brain, spinal cord and muscle tissue extracts. Moreover, no significant binding was observed in extracts from liver, kidney, heart, lungs or intestine (Fig. 4A).

To identify the recognized protein bands, we performed a proteomic analysis using MALDI-TOF mass spectrometry. Proteins were separated by 2D electrophoresis, and spots immunolabeled by western blotting using 4 distinct pathological sera were located in parallel silver-stained gels (Fig. 4B–C). After spectrum analysis (Fig. 4D), it was found that immunoreactive spots contained either proteins of the semaphorin family (3 cases) or proteins related with semaphorin signaling (1 case) (see Table 2). As semaphorins are axonal guidance molecules that induce the collapse of growth cones, we next asked whether their inhibition by antibody binding may block their functional activity, and stimulate axonal branching and MN survival (Kolodkin, 1996; Huber et al., 2005). For this reason the ability of anti-semaphorin antibodies to rescue chick embryo MNs from normal PCD was assessed. It was found that a commercial antibody against sema 3A was able to prevent MN death to a similar extent as human MN disease sera (Fig. 5A). In addition, the whole sera or IgGs from three assayed ALS patients, but not those from three pathological controls, were able to recognize recombinant sema 3A by western blotting (see some examples in Fig. 5B).

In order to test the functional activity of MN disease sera in inhibiting semaphorin signaling, a DRG growth cone collapse assay was performed (Raper and Kapfhammer, 1990). E7 chick embryo DRG explants cultured in presence of NGF were treated with several doses of recombinant sema 3A and the number of collapsed growth cones was evaluated after cytoskeletal actin labeling by fluorescent phalloidin (Fig. 6A and B). It was observed that 25 ng/ml of sema 3A was able to induce about 30% of the maximum collapsing effect obtained with 50 ng/ml or higher doses (Fig. 6C). We next assayed whether a commercial anti-sema 3A antibody and MN disease sera were able to prevent, in a dose–response manner, the collapsing effect of 25 ng/ml of sema 3A. We found that 80 μ g/ml of the commercial antibody results in about 35% reduction of growth cone collapse (Fig. 6D), whereas the ALS sera reduced about 40% the growth cone

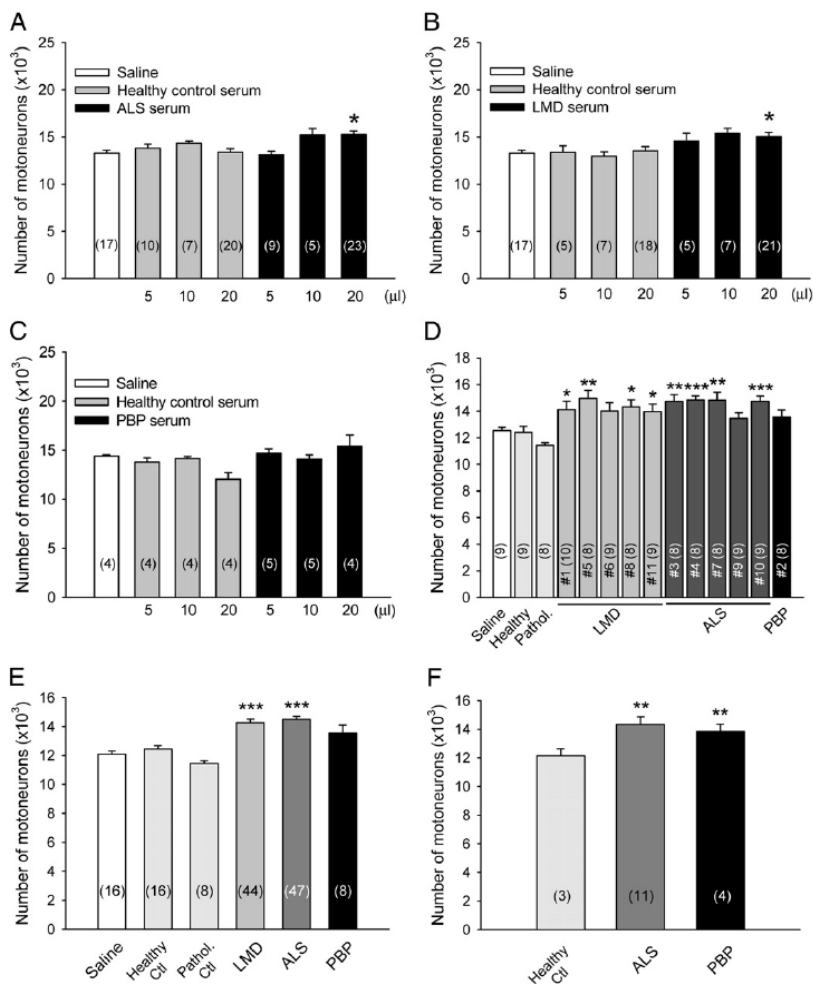


Fig. 1. Sera or CSF from patients with MN disease promote MN survival in chick embryo spinal cord during normally occurring PCD. MN numbers in the lumbar LMC of E10 chick embryo spinal cord are represented after distinct *in ovo* daily treatments (from E5 to E9 for sera or E6 to E9 for CSF). Several doses of a single ALS serum (A), LMD serum (B) or PBP serum (C) were compared with either healthy control serum or saline; note that MN numbers are significantly increased after treatment with 20 µl of either ALS or LMD. (D) MN counts after treatment with 20 µl of distinct ALS (n=5), LMD (n=5) and PBP (n=1) sera; note that most of MN disease sera show a rescue effect on MNs when compared with either saline, healthy control sera or pathological (Pathol.) control sera; # indicates patient's sera code. (E) Data from (D) were pooled for each condition. (F) MN counts after treatment with CSF. Numbers in parentheses indicate the number of embryos tested. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. saline (one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni's test).

collapse when assayed at 1/10 dilution (control healthy sera did not produce any effect at the same dilution). Fig. 6E shows the results obtained from a dose–response assay performed with ALS serum #31. Further testing of three additional ALS sera resulted in a similar inhibitory effect (Fig. 6F). The serum #31 was able to recognize recombinant sema 3A by western blot; other sera giving positive inhibitory activity on growth cone collapse were not tested.

3.3. Determination of anti-semaphorin antibodies by ELISA in sera from patients with MN disease

Recombinant sema 3A was produced in transfected COS 7 cells purified by affinity chromatography and used to coat ELISA plates. Nineteen control sera (9 healthy and 10 from neurological disorders

other than MN disease) and 29 sera from patients with MN disease (15 ALS and 4 LMD) were assayed at 1/25 dilution. The anti-sema 3A commercial antibody was used as a positive control. The analysis of the pooled data showed that OD from pathological control was significantly higher than healthy control sera, and sera from MN disease had OD significantly increased compared to healthy controls (Fig. 7). Although MN disease sera had values higher than pathological controls, they did not show significant differences due to the variability of the individual data. For individual analysis of MN disease sera we established the mean (\pm twice SD) OD of pathological controls as a cut off. It was found that 4 ALS and 3 LMD sera (about 23% of total MN disease sera) surpassed this value. The dilution curve showed a good linearity ($r^2 = 0.89$) in the range in which the tests were performed. Correlation between ELISA and chick embryo assays

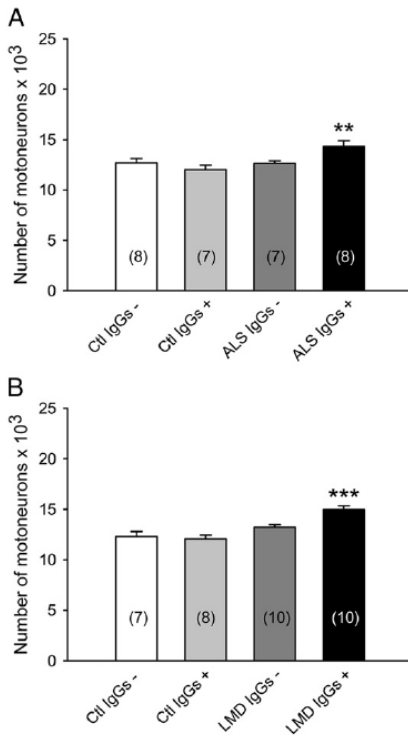


Fig. 2. IgGs purified from ALS (A) or LMD (B) patients promote MN survival in chick embryo spinal cord during normally occurring PCD. MN numbers in the lumbar LMC of E10 chick embryo spinal cord are represented after distinct *in ovo* daily treatments from E5 to E9. Numbers in parentheses indicate the number of embryos tested. Ctl = control sera, IgGs - = IgGs depleted fraction, IgGs + = fraction containing IgGs. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. IgG-depleted MN disease sera (one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni's test).

was analyzed according to sera availability: 5 ALS sera with positive MN survival and axonal branching promoting activity, were also positive after ELISA testing (Table 1). Since many patients were missed after diagnosis, correlation between ELISA test and survival or disease progression was only possible for 11 cases. Although the mean of survival tended to be increased in cases with positive ELISA test (survival [in months]: ELISA positive = 76.3 ± 18.9 , $n = 3$; ELISA negative = 42.7 ± 8.3 , $n = 8$), differences were not significant.

3.4. ALS patients have increased CSF protein and CSF: serum albumin index

There were no statistical differences between the patient and control subjects with regard to serum or CSF glucose, or white blood cell counts (data not shown). There was not a significant difference between patient and control serum protein concentrations, but significantly increased CSF protein concentration was found in the patient group ($p = .039$). Seven of the patients (39%) had elevated CSF protein levels >50 mg/dL with 2 patients >75 mg/dL and 1 patient >100 mg/dL. There

was no correlation between disease duration and CSF protein concentrations. While levels of CSF albumin were not significantly different between patients and controls, there was a significant increase in the CSF: serum albumin index of patients as compared to controls ($p = 0.042$). There were no statistically significant correlations between disease duration and CSF albumin ($p = 0.6597$), serum albumin ($p = 0.6146$) or albumin index ($p = 0.726$).

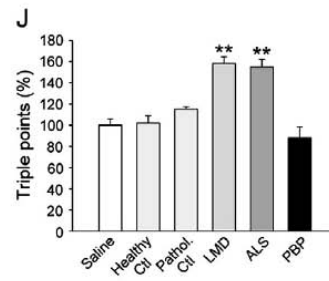
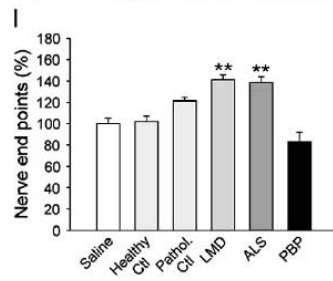
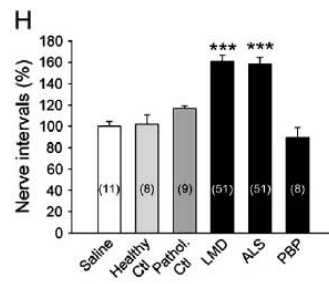
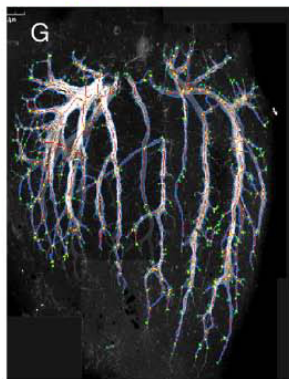
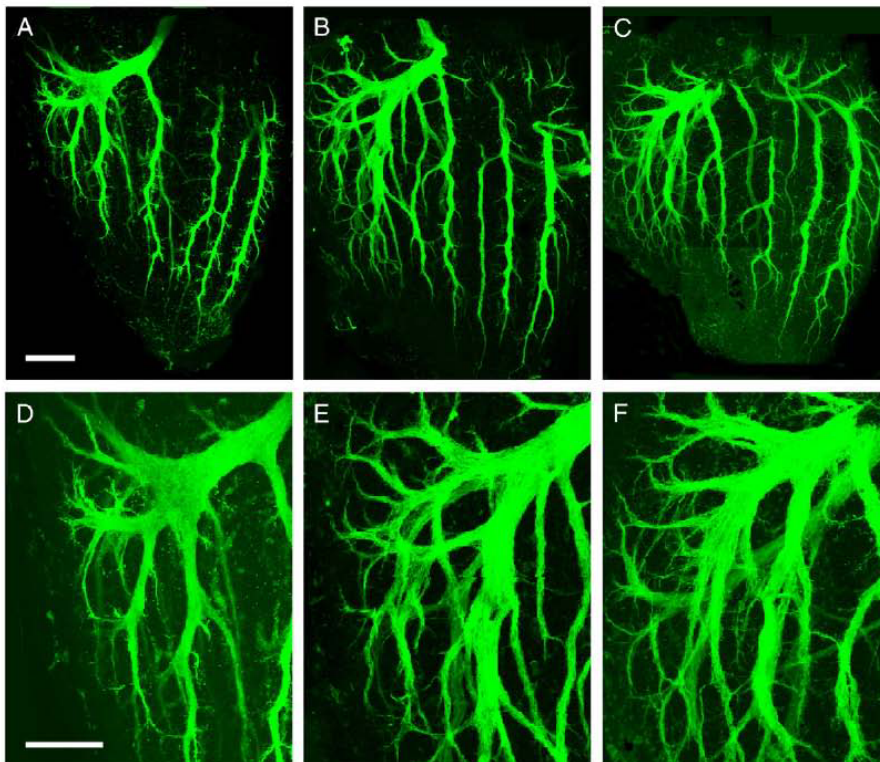
3.5. Serum and CSF IgG correlate with disease duration

No patients had an elevated CSF serum IgG index or oligoclonal bands. While serum levels of IgG were the same, CSF IgG levels demonstrated a strong trend towards elevation in the patient group but did not reach statistical significance ($p = 0.07$). However, a statistically significant correlation between disease duration and both serum and CSF IgG levels was noted (Fig. 8). There was no significant difference between patient and control group with regard to CSF IgM or IgA levels. As well, there was no significant correlation of these levels with disease duration.

4. Discussion

Although the pathogenic contribution of autoimmune mechanisms to ALS is still an unsolved question, many reports have found distinct autoantibodies in sera of ALS patients. VDCCs autoantibodies have been most commonly found, although a few studies failed to detect them (Arsac et al., 1996; Thomas and Dunn, 1997). These autoantibodies have been considered important in altering intracellular Ca^{2+} homeostasis in MNs and in promoting neurodegeneration (Smith et al., 1992, 1994; Mosier et al., 1995; Andjus et al., 1996; Colom et al., 1997; Engelhardt et al., 1997; Offen et al., 1998; Fratantoni et al., 2000; Carter and Mynlieff, 2003). By their interaction with calcium channels, ALS Igs induce sustained increased cytoplasmic calcium concentration in presynaptic nerve endings through VDCCs (Uchitel et al., 1988; Llinás et al., 1993; Mosier et al., 1995; Andjus et al., 1997; Pagani et al., 2006). It is known that moderate increases in the levels of intracellular calcium makes neurons less sensitive to neurotrophic factor deprivation (Johnson et al., 1992), an effect that has been confirmed in chick embryo MNs (Soler et al., 1998). For this reason, we cannot exclude that calcium channel activation by ALS Igs may contribute to the promotion of MN survival in our experiments. However, we have revealed another mechanism that may also explain the counterintuitive action of ALS Igs on MN survival: namely, the promotion of axonal branching by modifying semaphorin signaling and growth cone collapse in the chick embryo. Axonal branching in muscles appears to play a role in determining ALS severity. For example, the neuritic outgrowth inhibitor Nogo-A is increased in patients with ALS (Jokic et al., 2005; Pradat et al., 2007), and Nogo-A deletion improves the survival of ALS mice (Jokic et al., 2006). Furthermore, as a compensatory mechanism for muscle denervation, sprouting of intramuscular axons is common both in human ALS (Stålberg et al., 1975) and in animal models of ALS (Millecamps et al., 2001). Axon sprouting is mainly confined to MN slow twitch muscle subtypes, which are less vulnerable to ALS pathology (Frey et al., 2000; Schaefer et al., 2005; Pun et al., 2006). Sema 3A is selectively expressed in terminal Schwann cells at the neuromuscular junctions of more vulnerable fast-fatigable muscle fibers, mediating the suppression of terminal plasticity in these synapses and contributing to their selective loss in ALS (de Winter et al., 2006). How the semaphorin antibodies arise in

Fig. 3. (A–C) Confocal microscope imaging of intramuscular nerve branching in whole mounts of IFIB muscle from E8 chick embryos treated with different sera. Samples were immunostained with the TUJ1 antibody against β -III-tubulin; the fast region is enlarged in (D–F). Representative images of muscles after treatment with control healthy (A, D), pathological control (B, E) and ALS (C, F) sera are shown. (G) Image processing for quantitative analysis of branching in which an image resulting from digital skeletisation and end points identification is displayed. Results of measurements of nerve intervals (H), nerve end points (I) and triple points (J) after distinct sera treatments are represented. Numbers in parentheses in (H) indicate the number of muscles measured (the same for [I] and [J]). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. saline (one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni's test). Scale bar = 200 μ m.



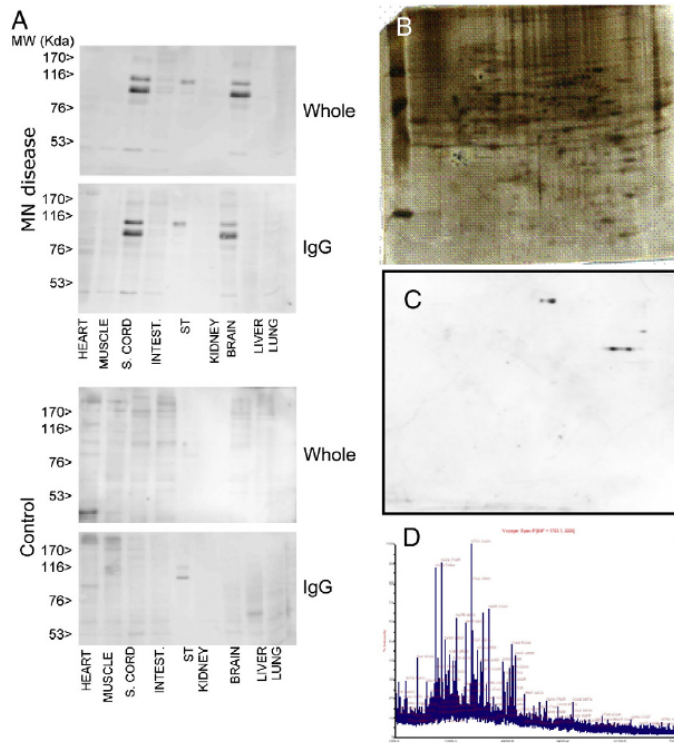


Fig. 4. (A) LMD IgGs but not healthy control IgGs bind to chick embryo proteins. E10 chick embryo extracts of different tissues were subjected to western blotting after SDS-PAGE separation using either whole sera or isolated IgGs from either a LMD patient or a healthy control donor. Protein identification was performed after 2D electrophoresis (B) and the immunolabeled spots (C) were subjected to a MALDI-TOF spectrum analysis (D). For more details see Table 2.

ALS and whether they could disrupt the sema 3A pathway and promote reactive neuromuscular sprouting is not clear. Low levels of anti-semaphorin antibodies were detected in sera from patients with non-ALS neurological diseases, suggesting that they be a non-specific response to nerve tissue damage. However, the sera from 7 out of 29 patients with MN disease (ALS and LMD) showed high levels of anti-sema 3A antibodies after using restrictive cut off criteria, it is possible that anti-sema 3A antibodies may be related more to muscle denervation than CNS defects.

In one of our sera, proteomic analysis detected CMRP1b as the main spot recognized by ALS patients' IgGs. Anti-CRMP antibodies are not infrequently detected in several autoimmune neurological disorders and also in small cell lung carcinoma. For example, anti CMRP5 antibodies are associated with autoimmune myelopathy, cranial (optic) or peripheral neuropathy, chorea and other disorders (Yu et al., 2001; Keegan et al., 2008), and anti-CRMP4 antibodies have been described in association with limbic encephalitis and thymoma

(Knudsen et al., 2007). However, although anti-CRMP antibodies have not been described in association with MN disease, it is interesting to note that CMRP4a is upregulated in MNs during disease progression in mutant SOD1 mice and promotes MN death and muscle denervation (Duplan et al., 2010).

This study and previous investigations have shown that ALS patients frequently have mild to moderate CSF protein elevations (Guiloff et al., 1980; Younger et al., 1990; Guiloff, 2002). As our data show that there was no difference between patients and controls for serum protein and because serum albumin levels were actually lower in patients, the most likely reason for elevated CSF protein levels in ALS patients is increased permeability of blood brain barrier (BBB). This explanation is further supported by the significant elevation of the CSF:serum albumin index we found in ALS patients. The reasons for the alteration of the BBB could be mechanical or inflammatory although, pathological studies of the meninges of ALS patients do not reveal overt inflammation (Guiloff, 2002). Previous studies have suggested an inverse relationship between age and CSF protein levels in ALS patients (Leonardi et al., 1984; Guiloff, 2002) but our study did not confirm that observation.

We found no oligoclonal bands present in our patients, although other investigators have reported these in 0–12% of ALS patients (Leonardi et al., 1984; Younger et al., 1990; Apostolski et al., 1991; Stevens et al., 1993; Westarp et al., 1995). Oligoclonal bands represent the immunoglobulin products from clones of plasma cells and, when found in the CSF without a matching band in the serum, reflect intrathecal immunoglobulin synthesis. However, we did observe increased CSF IgG levels in ALS patients compared to controls,

Table 2

Protein identification by means of MALDI-TOF analysis after 2D electrophoresis and western blotting. The four sera tested are included. All the identified proteins are members of Semaphorin family or proteins related with its signaling pathway.

Serum	Identified protein
#5 (LMD)	Collapsin response mediator protein 1B
#4 (ELA)	Semaphorin 3A precursor (Collapsin 1)
#6 (ELA)	Semaphorin 3D precursor (Collapsin 2)
#7 (ELA)	Semaphorin 3E precursor (Collapsin 5)

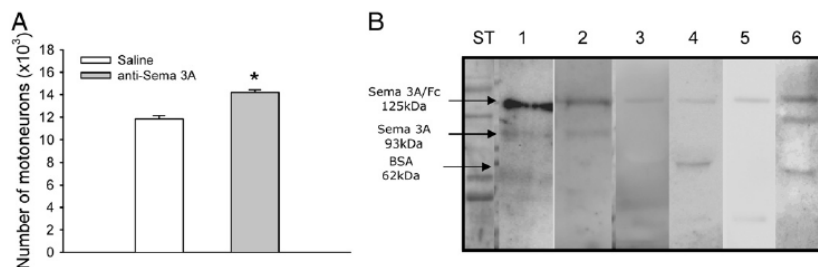


Fig. 5. (A) Polyclonal anti-Sema 3A antibody promotes MN survival in chick embryo spinal cord during normally occurring PCD. MN numbers in the lumbar LMC of E10 chick embryo spinal cord are represented after *in ovo* treatment daily from E5 to E9; * $p < 0.05$ vs. saline (one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni's test). (B) ALS serum #4 (1), purified ALS IgGs from serum #1 (2), and polyclonal anti-Sema 3A antibody (6) are able to recognize recombinant Sema 3A after SDS-PAGE western blotting. Conversely, pathological control serum (3), peroxidase anti goat IgG antibody (4) and peroxidase anti goat IgG antibody (5) do not bind recombinant Sema 3A.

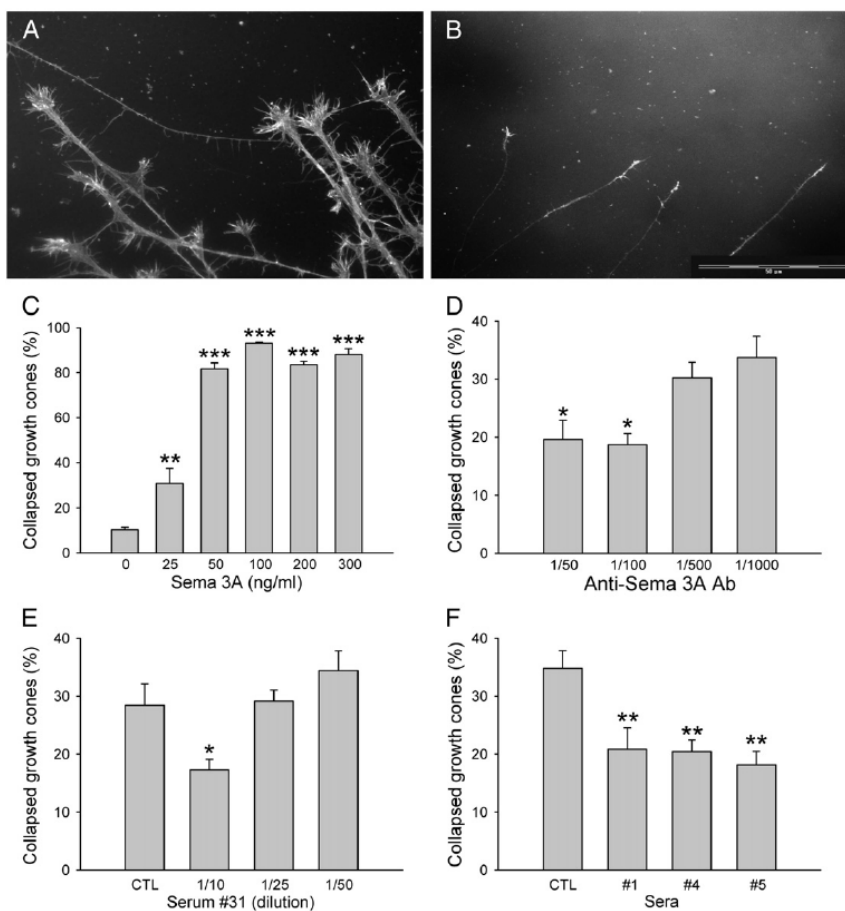


Fig. 6. Growth cone collapse assay on E7 chick embryo DRG. (A, B) Detail of growth cones after 24 h *in vitro* maintained without (A) or with (B) Sema 3A. Note the appearance of growth cones in A, which contrasts with their collapsed phenotype in B. (C) Percentage of collapsed growth cones after a dose–response Sema 3A treatment. (D) Polyclonal anti-Sema 3A antibody induces a significant growth cone collapse when applied at 1/50 and 1/100 dilutions. (E) ALS serum at 1/10 (but not at 1/25 or 1/50) produces a significant growth cone collapse. (F) Other MN disease sera tested are also able to induce growth cone collapse when applied at 1/10 dilution. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. 0 ng/ml Sema 3A, in C; * $p < 0.05$ vs. 1/1000, in D; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. CTL, in E and F (one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni's test; except for D, in which post-hoc DMS test was performed).

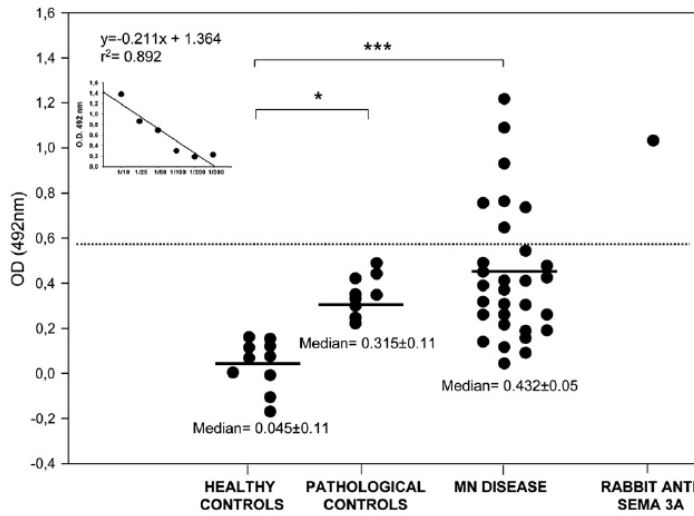


Fig. 7. ELISA analysis for the determination of anti-Sema 3A antibodies in LMD and ALS sera. Each point represents an individual value (mean of 3 determinations) of the optical density (OD, 492 nm). Short lines represent the mean of different groups; the values of the mean ± SEM for each group are indicated. Dashed line represents the cut off we established as twice the SD of pathological control values. A dilution curve of ELISA test corresponding to serum #31 is shown in the graph in the inset. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. healthy controls (one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni's test).

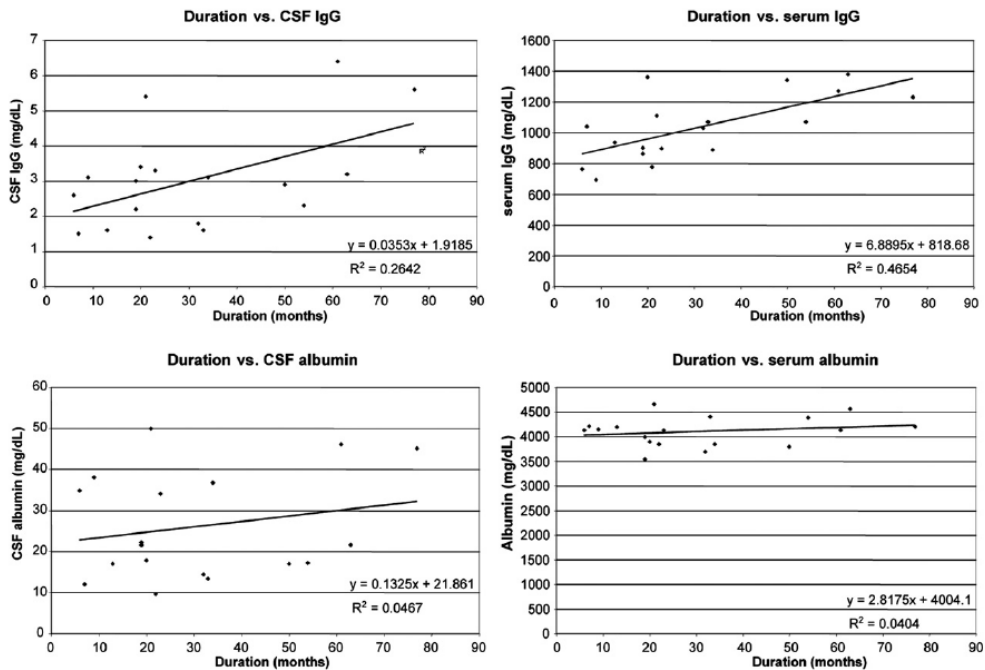


Fig. 8. CSF and serum IgG levels increase with increased disease duration. Data were analyzed by Pearson Partial Correlation Coefficients following log transformation. There was a statistically significant correlation of increased CSF IgG levels with increased disease duration ($p = 0.0487$). To determine if this represented a general disruption of BBB and passive transfer of protein, CSF albumin levels were compared with disease duration. There was no correlation ($p = 0.6597$). Serum IgG levels also increased with disease duration ($p = 0.0005$). Serum albumin levels showed no correlation with disease duration ($p = 0.6146$). There was also no correlation with disease duration and albumin index ($p = 0.726$; not shown).

although these values did not reach statistical significance ($p=0.07$) in agreement with previous studies (Leonardi et al., 1984). We also found that IgG levels in both serum and CSF correlated positively with disease duration. We did not observe a correlation between disease duration and CSF protein, CSF albumin or albumin index values. The increased immunoglobulin levels in the serum may reflect response to degeneration of peripheral nerves and muscle that increases as the disease progresses. While it could be surmised that intercurrent infections may be more likely to be present in patients that have had ALS longer and that this might also account for higher IgG levels in those patients, clinical signs or symptoms of infection were not present in patients and there was no other serologic evidence for infection. The increased levels of CSF IgG are more likely to be due to increased permeability of BBB of ALS patients. Disruption of BBB as a cause or effect in ALS may allow access of peripheral antibodies to CNS antigens that are normally not available introducing an autoimmune component into disease progression. Whether or not the neuroprotective effects of ALS CSF on chick embryo MNs are associated with immunoglobulins should be further investigated.

Acknowledgments

This work was supported by: the *Ministerio de Ciencia y Tecnología* jointly with FEDER (SAF2008-03001; SAF2008-00732; and SAF2009-07166), the *Fundació La Marató de TV3* (063030), and the CGRC and Brian White Funds from the Wake Forest University School of Medicine.

We thank Marta Hereu and Imma Montoliu for the technical assistance, Dr. Josep Maria Estanyol for helpful suggestions, and Dr. Gerard Piñol for providing sera from non-ALS neurological diseases. We also thank Carolyn Ashburn, RN, MSN and Terrie Walker, RN for patient coordination, and Dr. Timothy Morgan for performing the statistical analysis.

References

- Alexianu, M.E., Mohamed, A.H., Smith, R.G., Colom, L.V., Appel, S.H., 1994. Apoptotic cell death of a hybrid motoneuron cell line induced by immunoglobulins from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 63, 2365–2368.
- Alexianu, M.E., Kozovska, M., Appel, S.H., 2001. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57, 1282–1289.
- Andjus, P.R., Khiroug, L., Nistri, A., Cherubini, E., 1996. ALS IgGs suppress $[Ca^{2+}]_i$ rise through P/Q-type calcium channels in central neurones in culture. *Neuroreport* 7, 1914–1916.
- Andjus, P.R., Stevic-Marinkovic, Z., Cherubini, E., 1997. Immunoglobulins from motoneurone disease patients enhance glutamate release from rat hippocampal neurones in culture. *J. Physiol.* 504, 103–112.
- Apostolski, S., Nikolic, J., Bugarski-Prokopljivic, C., Miletic, V., Pavlovic, S., Filipovic, S., 1991. Serum and CSF immunological findings in ALS. *Acta Neurol. Scand.* 83, 96–98.
- Appel, S.H., Engelhardt, J.L., Garcia, J., Stefani, E., 1991. Immunoglobulins from animal models of motor neuron disease and from human amyotrophic lateral sclerosis patients passively transfer physiological abnormalities to the neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 647–651.
- Arsac, C., Raymond, C., Martin-Moutot, N., Dargent, B., Couraud, F., Pouget, J., Seagar, M., 1996. Immunossays fail to detect antibodies against neuronal calcium channels in amyotrophic lateral sclerosis serum. *Ann. Neurol.* 40, 695–700.
- Barber, S.C., Shaw, P.J., 2007. Molecular mechanisms of motor degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. In: Eisen, A.A., Shaw, P.J. (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology. Motor Neuron Disorders and Related Diseases*, Vol. 82 (3rd series). Elsevier, Amsterdam, pp. 57–87.
- Bottenstein, J.E., Skaper, S.D., Varon, S.S., Sato, G.H., 1980. Selective survival of neurons from chick embryo sensory ganglionic dissociates utilizing serum-free supplemented medium. *Exp. Cell Res.* 125, 183–190.
- Brooks, B.R., 1994. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J. Neurol. Sci.* 124, 96–107 Suppl.
- Bruijn, L.I., Miller, T.M., Cleveland, D.W., 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 723–749.
- Calderó, J., Ciutat, D., Lladó, J., Castán, E., Oppenheim, R.W., Esquerda, J.E., 1997. Effects of excitatory amino acids on neuromuscular development in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 387, 73–95.
- Calderó, J., Prevet, D., Mei, X., Oakley, R.A., Li, L., Milligan, C., Houenou, L., Burek, M., Oppenheim, R.W., 1998. Peripheral target regulation of the development and survival of spinal sensory and motor neurons in the chick embryo. *J. Neurosci.* 18, 356–370.
- Calderó, J., Tarabal, O., Casanovas, A., Ciutat, D., Casas, C., Lladó, J., Esquerda, J.E., 2007. Excitotoxic motoneuron disease in chick embryo evolves with autophagic neurodegeneration and deregulation of neuromuscular innervation. *J. Neurosci. Res.* 85, 2726–2740.
- Carter, J.R., Mynlieff, M., 2003. Amyotrophic lateral sclerosis patient IgG alters voltage dependence of Ca^{2+} channels in dissociated rat motoneurons. *Neurosci. Lett.* 353, 221–225.
- Clarke, P.G.H., Oppenheim, R.W., 1995. Neuron death in vertebrate development: in vivo methods. In: Schwartz, L.M., Osborne, B.A. (Eds.), *Methods in cell biology: cell death*, Vol. 46. Academic, New York, pp. 277–321.
- Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 806–819.
- Colom, L.V., Alexianu, M.E., Mosier, D.R., Smith, R.G., Appel, S.H., 1997. Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins increase intracellular calcium in a motoneuron cell line. *Exp. Neurol.* 146, 354–360.
- Couratier, P., Yi, F.H., Preud'Homme, J.L., Clavelou, P., Whit, A., Sindou, P., Vallat, J.M., Jauberteau, M.O., 1998. Serum autoantibodies to neurofilament proteins in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 154, 137–145.
- De Winter, F., Vo, T., Stam, F.J., Wisman, L.A., Bär, P.R., Niclou, S.P., van Muiswinkel, F.L., Verhaagen, J., 2006. The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 102–117.
- Delbono, O., Garcia, J., Appel, S.H., Stefani, E., 1991. Calcium current and charge movement of mammalian muscle: action of amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins. *J. Physiol.* 444, 723–742.
- Demestre, M., Pullen, A., Orrell, R.W., Orth, M., 2005. ALS-IgG-induced selective motor neurone apoptosis in rat mixed primary spinal cord cultures. *J. Neurochem.* 94, 268–275.
- Drachman, D.B., Fishman, P.S., Rothstein, J.D., Motomura, M., Lang, B., Vicent, A., Mellits, E.D., 1995. Amyotrophic lateral sclerosis. An autoimmune disease? In: Sematrace, G., Munsat, T. (Eds.), *Pathogenesis and therapy of amyotrophic lateral sclerosis*. Advances in Neurology, Vol. 68. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 59–65.
- Duplan, L., Bernard, N., Casseron, W., Dudley, K., Thouvenot, E., Honnorat, J., Rogemond, V., De Bovis, B., Aebischer, P., Marin, P., Raoul, C., Henderson, C.E., Pettmann, B., 2010. Collapsin response mediator protein 4a (CRMP4a) is upregulated in motoneurons of mutant SOD1 mice and can trigger motoneuron axonal degeneration and cell death. *J. Neurosci.* 30, 785–796.
- Engelhardt, J.L., Siklos, L., Appel, S.H., 1997. Altered calcium homeostasis and ultrastructure in motoneurons of mice caused by passively transferred anti-motoneuronal IgG. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 21–39.
- Fratantoni, S.A., Weisz, G., Pardal, A.M., Reisin, R.C., Uchitel, O.D., 2000. Amyotrophic lateral sclerosis IgG-treated neuromuscular junctions develop sensitivity to L-type calcium channel blocker. *Muscle Nerve* 23, 543–550.
- Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., Caroni, P., 2000. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J. Neurosci.* 20, 2534–777.
- Grassi, C., Martire, M., Altobelli, D., Azzena, G.B., Preziosi, P., 1999. Characterization of Ca^{2+} -channels responsible for K^{+} -evoked $[Ca^{2+}]_i$ noradrenergic release from rat brain cortex synaptosomes and their response to amyotrophic lateral sclerosis IgGs. *Exp. Neurol.* 159, 520–527.
- Gulloff, R.J., 2002. Functional scales in ALS: cons. Amyotroph. Lateral Scler. Other Mot. Neuron Disord. 3 (Suppl 1), S11–2.
- Gulloff, R.J., McGregor, B., Thompson, E., Blackwood, W., Paul, E., 1980. Motor neurone disease with elevated cerebrospinal fluid protein. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 43, 390–396.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R.L., Siddique, T., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–1775.
- Henkel, J.S., Engelhardt, J.L., Siklós, L., Simpson, E.P., Kim, S.H., Pan, T., Goodman, J.C., Siddique, T., Beers, D.R., Appel, S.H., 2004. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann. Neurol.* 55, 221–235.
- Houenou, L.J., Li, L., Lo, A.C., Yan, Q., Oppenheim, R.W., 1994. Naturally occurring and axotomy-induced motoneuron death and its prevention by neurotrophic agents: a comparison between chick and mouse. *Prog. Brain Res.* 102, 217–226.
- Huber, A.B., Kania, A., Tran, T.S., Gu, C., De Marco Garcia, N., Lieberam, L., Johnson, D., Jessell, T.M., Ginty, D.D., Kolodkin, A.L., 2005. Distinct roles for secreted semaphorin signaling in spinal motor axon guidance. *Neuron* 48, 949–964.
- Johnson Jr., E.M., Koike, T., Franklin, J., 1992. A "calcium set-point hypothesis" of neuronal dependence on neurotrophic factor. *Exp. Neurol.* 115, 163–166.
- Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J.L., Pradat, P.F., Dupuis, L., Echaniz-Laguna, A., Muller, A., Dubourg, O., Selhean, D., Hauw, J.J., Loeffler, J.P., Meininger, V., 2005. Nogo expression in mouse correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann. Neurol.* 57, 553–556.
- Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J.L., Dimou, L., Lin, S., Fergani, A., Ruegg, M.A., Schwab, M.E., Dupuis, L., Loeffler, J.P., 2006. The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep.* 7, 1162–1167.
- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T., McGeer, P.L., 1992. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am. J. Pathol.* 140, 691–707.
- Keegan, B.M., Pittcock, S.J., Lennon, V.A., 2008. Autoimmune myelopathy associated with collapsin response-mediator protein-5 immunoglobulin G. *Ann. Neurol.* 63, 531–534.
- Kimura, F., Smith, R.G., Delbono, O., Nyomoi, O., Schneider, T., Nastainczyk, W., Hofmann, F., Stefani, E., Appel, S.H., 1994. Amyotrophic lateral sclerosis patient antibodies label Ca^{2+} channel alpha 1 subunit. *Ann. Neurol.* 35, 164–171.

- Knudsen, A., Bredholt, G., Storstein, A., Oldedal, I., Davanger, S., Krossnes, B., Honnorat, J., Vedeler, C.A., 2007. Antibodies to CRMP3-4 associated with limbic encephalitis and thymoma. *Clin. Exp. Immunol.* 149, 16–22.
- Koldkin, A.L., 1996. Semaphorins: mediators of repulsive growth cone guidance. *Trends Cell Biol.* 6, 15–22.
- Kriz, J., Nguyen, M.D., Julien, J.P., 2002. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 10, 268–278.
- Leonardi, A., Abbruzzese, G., Arata, L., Cocito, L., Vische, M., 1984. Cerebrospinal fluid (CSF) findings in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 231, 75–238.
- Li, B., Liu, X.Y., Li, Z., Bu, H., Sun, M.M., Guo, Y.S., Li, C.Y., 2008. Effect of ALS IgG on motor neurons in organotypic spinal cord cultures. *Can. J. Neurol. Sci.* 35, 220–225.
- Linás, R., Sugimori, M., Cherksey, B.D., Smith, R.G., Delbono, O., Stefani, E., Appel, S.H., 1993. IgG from amyotrophic lateral sclerosis patients increases current through P-type calcium channels in mammalian cerebellar Purkinje cells and in isolated channel protein in lipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11743–11747.
- Magnelli, V., Sawada, T., Delbono, O., Smith, R.G., Appel, S.H., Stefani, E., 1993. The action of amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins on mammalian single skeletal muscle Ca²⁺ channels. *J. Physiol.* 461, 103–118.
- Martí-Fabregas, J., Soler, R., Esquerda, J.E., Grau, J.M., Pradas, J., Illa, I., 1992. Clinical status of motoneuron disease does not correlate with serum neurotoxicity on cultured neurons. *Acta Neurol. Scand.* 85, 219–223.
- Millécamps, S., Nicole, D., Ceballos-Picot, I., Mallet, J., Barkats, M., 2001. Synaptic sprouting increases the uptake capacities of motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7582–7587.
- Mosier, D.R., Baldelli, P., Delbono, O., Smith, R.G., Alexianu, M.E., Appel, S.H., Stefani, E., 1995. Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins increase Ca²⁺ currents in a motoneuron cell line. *Ann. Neurol.* 37, 102–109.
- Murray, B., Mitsumoto, H., 2002. Amyotrophic lateral sclerosis. In: Katirji, B., Kaminski, H.J., Preston, D.C., Ruff, R.L., Shapiro, B.E. (Eds.), *Neuromuscular Disorders in Clinical Practice*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 417–444.
- Niebroj-Dobosz, I., Janik, P., Kwieciński, H., 2004. Serum IgM anti-GM1 ganglioside antibodies in lower motor neuron syndromes. *Eur. J. Neurol.* 11, 13–16.
- Offen, D., Halevi, S., Orion, D., Mosberg, R., Stern-Goldberg, H., Melamed, E., Atlas, D., 1998. Antibodies from ALS patients inhibit dopamine release mediated by L-type calcium channels. *Neurology* 51, 1100–1103.
- Oppenheim, R.W., 1987. Muscle activity and motor neuron death in the spinal cord of the chick embryo. *Selective Neuronal Death*, Ciba Foundation Symposium, n° 126. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 96–112.
- Oppenheim, R.W., 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453–501.
- Oppenheim, R.W., Bursztajn, S., Prevet, D., 1989. Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord: acetylcholine receptors and synaptogenesis in skeletal muscle following the reduction of motoneuron death by neuromuscular blockade. *Development* 107, 331–341.
- Oppenheim, R.W., Houenou, L.J., Johnson, J.E., Lin, L.F., Li, L., Lo, A.C., Newsome, A.L., Prevet, D.M., Wang, S., 1995. Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* 373, 344–346.
- Oppenheim, R.W., Calderó, J., Ciutat, D., Esquerda, J.E., Ayala, V., Prevet, D., Wang, S., 2003. Rescue of developing spinal motoneurons from programmed cell death by the GABA(A) agonist muscimol acts by blockade of neuromuscular activity and increased intramuscular nerve branching. *Mol. Cell. Neurosci.* 22, 331–343.
- Pagani, M.R., Reisin, R.C., Uchitel, O.D., 2006. Calcium signaling pathways mediating synaptic potentiation triggered by amyotrophic lateral sclerosis IgG in motor nerve terminals. *J. Neurosci.* 26, 2661–2672.
- Pasinelli, P., Brown, R.H., 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 710–723.
- Pestronk, A., Adams, R.N., Cornblath, D., Kund, R.W., Drachman, D.B., Clawson, L., 1989. Patterns of serum IgM antibodies to GM1 and GD1a gangliosides in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 25, 98–102.
- Pradat, P.F., Bruneteau, G., Gonzalez de Aguilar, J.L., Dupuis, L., Jokic, N., Salachas, F., Le Forestier, N., Echaniz-Laguna, A., Dubourg, O., Hauw, J.J., Tranchant, C., Loeffler, J.P., Meininger, V., 2007. Muscle Nogo-A expression is a prognostic marker in lower motor neuron syndromes. *Ann. Neurol.* 62, 15–20.
- Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L., Caroni, P., 2006. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat. Neurosci.* 9, 408–419.
- Raper, J.A., Kapfhammer, J.P., 1990. The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron* 4, 21–29.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.M., Berger, R., Tanzi, R.E., Halperin, J.J., Herzfeldt, B., Van den Berghe, R., Wu-Yen, H., Thomas, B., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-Vance, Parallels, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, P., Brown, Jr., R.H., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Saleh, I.A., Zesiewicz, T., Xie, Y., Sullivan, K.L., Miller, A.M., Kuzmin-Nichols, N., Sanberg, P.R., Garbuzova-Davis, S., 2009. Evaluation of humoral immune response in adaptive immunity in ALS patients during disease progression. *J. Neuroimmunol.* 215, 96–101.
- Schaefer, A.M., Sanes, J.R., Lichtman, J.W., 2005. A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Comp. Neurol.* 490, 209–219.
- Sengun, I.S., Appel, S.H., 2003. Serum anti-Fas antibody levels in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 142, 137–140.
- Shaw, P.J., 2005. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neuron disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76, 1046–1057.
- Smith, R.G., Hamilton, S., Hofmann, F., Schneider, T., Nastainczyk, W., Birnbaumer, L., Stefani, E., Appel, S.H., 1992. Serum antibodies to L-type calcium channels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 327, 1721–1728.
- Smith, R.G., Alexianu, M.E., Crawford, G., Nyormoi, O., Stefani, E., Appel, S.H., 1994. Cytotoxicity of immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients on a hybrid motoneuron cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3393–3397.
- Soler, R.M., Egea, J., Mintenig, G.M., Sanz-Rodríguez, C., Iglesias, M., Comella, J.X., 1998. Calmodulin is involved in membrane depolarization-mediated survival of motoneurons by phosphatidylinositol-3 kinase- and MAPK-independent pathways. *J. Neurosci.* 18, 1230–1239.
- Stålberg, E., Schwartz, M.S., Trontelj, J.V., 1975. Single fibre electromyography in various processes affecting the anterior horn cell. *J. Neurol. Sci.* 24, 403–415.
- Stevens, A., Weller, M., Wiethöltter, H., 1993. A characteristic ganglioside antibody pattern in the CSF of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 56, 361–364.
- Thomas, M.M., Dunn, S.M., 1997. Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins are ineffective in altering calcium influx through presynaptic voltage-sensitive calcium channels. *Neurosci. Res.* 119, 129–134.
- Tikka, T.M., Vartiainen, N.E., Goldsteins, G., Oja, S.S., Andersen, P.M., Marklund, S.L., Koistinaho, J., 2002. Minocycline prevents neurotoxicity induced by cerebrospinal fluid from patients with motor neuron disease. *Brain* 125, 722–731.
- Troost, D., van den Oord, J.J., de Jong, J.M., Swaab, D.F., 1989. Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neuropath.* 8, 289–294.
- Uchitel, O.D., Appel, S.H., Crawford, F., Szczupak, L., 1988. Immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients enhance spontaneous transmitter release from motor-nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7371–7374.
- Westarp, M.E., Schreiber, H., Westarp, M.P., Westphal, K.P., Mauch, E., Kornhuber, H.H., 1995. Cerebral magnetic resonance imaging pathology and cerebrospinal fluid protein in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *Clin. Neuropathol.* 14, 228–232.
- Yi, F.H., Lautrette, C., Vermot-Desroches, C., Bordesoule, D., Couratier, P., Wijdenes, J., Preud'homme, J.L., Jauberteau, M.O., 2000. In vitro induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 109, 211–220.
- Yoshino, H., Miyatani, N., Saito, M., Ariga, T., Lugaresi, A., Latov, N., Kushi, Y., Yu, R.K., 1992. Isolated bovine spinal motoneurons have specific ganglioside antigens recognized by sera from patients with motor neuron disease and motor neuropathy. *J. Neurochem.* 59, 1684–1691.
- Younger, D.S., Rowland, L.P., Latov, N., Sherman, W., Pesce, M., Lange, D.J., Trojaborg, W., Miller, J.R., Lovelace, R.E., Hays, A.P., et al., 1990. Motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis: relation of high CSF protein content to paraproteinemia and clinical syndromes. *Neurology* 40, 595–599.
- Yu, Z., Kryzer, T.J., Griesmann, G.E., Kim, K., Benanoch, E.E., Lennon, V.A., 2001. CRMP-5 neuronal autoantibody: marker of lung cancer and thymoma-related autoimmunity. *Ann. Neurol.* 49, 146–154.
- Zhang, R., Gascon, R., Miller, R.G., Gelinas, D.F., Mass, J., Hadlock, K., Jin, X., Reis, J., Narvaez, A., McGrath, M.S., 2005. Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J. Neuroimmunol.* 159, 215–224.
- Zhu, S., Stavrovskaya, I.G., Drozda, M., Kim, B.Y., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A.S., Hartley, D.M., Wu, D.C., Gullans, S., Ferrante, R.J., Przedborski, S., Kristal, B.S., Friedlander, R.M., 2002. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417, 74–78.

Association of Kv1.5 and Kv1.3 Contributes to the Major Voltage-dependent K⁺ Channel in Macrophages*

Received for publication, June 12, 2006, and in revised form, September 28, 2006. Published, JBC Papers in Press, October 11, 2006, DOI 10.1074/jbc.M605617200

Rubén Vicente^{†1,2}, Artur Escalada^{§1,3}, Nuria Villalonga^{‡4}, Laura Teixidó[§], Meritxell Roura-Ferrer^{‡5}, Mireia Martín-Satué[§], Carmen López-Iglesias[¶], Concepció Soler^{||6}, Carles Solsona^{§7}, Michael M. Tamkun^{**1,8}, and Antonio Felipe^{†1,9}

From the [†]Molecular Physiology Laboratory, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, ^{||}Departament de Fisiologia, and [§]Unitat de Reconeixement Molecular in situ, Serveis Científicotècnics Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain, [‡]Cellular and Molecular Neurobiology Laboratory, Departament de Patologia i Terapèutica Experimental (IDIBELL), Universitat de Barcelona-Campus de Bellvitge, E-08907 Hospitalet de Llobregat, Spain, and ^{**}Department of Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523

Voltage-dependent K⁺ (Kv) currents in macrophages are mainly mediated by Kv1.3, but biophysical properties indicate that the channel composition could be different from that of T-lymphocytes. K⁺ currents in mouse bone marrow-derived and Raw-264.7 macrophages are sensitive to Kv1.3 blockers, but unlike T-cells, macrophages express Kv1.5. Because *Shaker* subunits (Kv1) may form heterotetrameric complexes, we investigated whether Kv1.5 has a function in Kv currents in macrophages. Kv1.3 and Kv1.5 co-localize at the membrane, and half-activation voltages and pharmacology indicate that K⁺ currents may be accounted for by various Kv complexes in macrophages. Co-expression of Kv1.3 and Kv1.5 in human embryonic kidney 293 cells showed that the presence of Kv1.5 leads to a positive shift in K⁺ current half-activation voltages and that, like Kv1.3, Kv1.3/Kv1.5 heteromers are sensitive to r-margatoxin. In addition, both proteins co-immunoprecipitate and co-localize. Fluorescence resonance energy transfer studies further demonstrated that Kv1.5 and Kv1.3 form heterotetramers. Electrophysiological and pharmacological studies of different ratios of Kv1.3 and Kv1.5 co-expressed in *Xenopus* oocytes suggest that various hybrids might be responsible for K⁺ currents in macrophages. Tumor necrosis factor- α -induced activation of macrophages increased Kv1.3 with no changes in Kv1.5, which is consistent with a hyperpolarized shift in half-activation voltage and a lower IC₅₀ for margatoxin. Taken together, our results demonstrate that Kv1.5 co-associates with Kv1.3, generating functional heterotet-

ramers in macrophages. Changes in the oligomeric composition of functional Kv channels would give rise to different biophysical and pharmacological properties, which could determine specific cellular responses.

Voltage-dependent potassium channels (Kv)¹⁰ have a crucial function in excitable cells of determining resting membrane potential and controlling action potentials (1). In addition, they are involved in the activation and proliferation of leukocytes (2). Functional Kv complexes are formed by four transmembrane α subunits and up to four cytoplasmic β subunits (3). The mammalian *Shaker* family (Kv1) contains at least eight different genes (Kv1.1–Kv1.8), coding for α subunits, which form functional homo- and heterotetrameric complexes. Thus, Kv1 proteins can assemble promiscuously, yielding a wide variety of biophysically and pharmacologically distinct channels (4, 5). However, although a number of studies have demonstrated that specific Kv heteromeric complexes predominate in nerve and muscle, many other possible combinations go undetected (6, 7). Therefore, this mechanism of channel assembly may underlie some of the functional diversity of potassium currents found in the brain and the cardiovascular system.

Bone marrow-derived macrophages (BMDM) are fully differentiated cells. In response to different growth factors and cytokines, macrophages can proliferate, become activated, or differentiate. These cells have a key function at inflammatory loci, where they arrive 24–48 h after lesion and remain until inflammation disappears. However, the persistence of macrophages at inflammatory loci is associated with the pathogenesis of a wide range of inflammatory diseases. Kv are tightly regulated during proliferation and activation in macrophages, and their functional activity is important for cellular responses (8). Proliferation and activation trigger an induction of the outward K⁺ current that is under transcriptional and translational control (8). Several lines of evidence indicate that post-translational events are involved in Kv regulation. In this context,

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[†] These authors contributed equally to this work.

² Holds a fellowship from the Universitat de Barcelona.

³ Supported by a fellowship from the Fundació Marató TV3.

⁴ Holds a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia.

⁵ Hold a fellowship from the Generalitat de Catalunya.

⁶ Supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI021192) and the Ramón y Cajal program of the Ministerio de Educación y Ciencia.

⁷ Supported by the Fundació August Pi i Sunyer, Generalitat de Catalunya, and the Ministerio de Educación y Ciencia (BF12001-3331, SAF2005-00736).

⁸ Supported by National Institutes of Health Grants HL49330 and NS41542.

⁹ Supported by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (BF12002-00764, BFU2005-00695). To whom correspondence should be addressed: Molecular Physiology Laboratory, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: 34-93-4034616; Fax: 34-93-4021559; E-mail: afelipe@ub.edu.

¹⁰ The abbreviations used are: Kv, voltage-dependent potassium channels; BMDM, bone marrow-derived macrophages; MgTx, rMargatoxin; HEK, human embryonic kidney 293; RT, reverse transcription; PBS, phosphate-buffered saline; FRET, fluorescence resonance energy transfer; TNF, tumor necrosis factor.

Role of Kv1.5 in Macrophages

assigning specific K^+ channel clones to native currents is difficult, since this complexity is further enhanced by heteromultimeric assembly of different Kv subunits. Lymphocytes express several voltage-dependent K^+ currents (n , n' , and l -type channels). Although Kv1.3, the major Kv channel in leukocytes, is associated with the n -type channel and Kv3.1 accounts for the l -type, the proteins responsible for the n' -type are unknown (2). Electrophysiological properties such as activation and inactivation of Kv1.3 expressed in T-cells and heterologous expression systems (Refs. 9 and 10 and references herein) are significantly different from those described in macrophages (8, 10, 11). In addition, unlike T-lymphocytes, brain and bone marrow macrophages also express Kv1.5 (8, 10, 11–15). Kv1.3 and Kv1.5 differ in their biophysical and pharmacological properties and show distinct regulation in a number of cell types (8, 16–18). Thus, different K^+ channel subunit composition could lead to specific alteration of cellular excitability, thus determining specific cell responses.

The aim of the present study was to explore whether Kv1.5 has a function in the major voltage-dependent K^+ current in macrophages. Our results suggest that Kv1.5 co-associates with Kv1.3, generating functional Kv1.3/Kv1.5 heterotetrameric channels. Upon different physiological stimuli, changes in the oligomeric composition of functional Kv could have a crucial effect on intracellular signals, determining the specific macrophage response.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and Cell Culture—BMDM and Raw 264.7 macrophages, human embryonic kidney 293 (HEK-293) cells, EL-4 T cell line, and *Xenopus laevis* oocytes were used. BMDM from 6–10-week-old BALB/c mice (Charles River Laboratories) were isolated and cultured as described elsewhere (8). Briefly, animals were killed by cervical dislocation, and both femurs were dissected with adherent tissue removed. The ends of bones were cut off, and the marrow tissue was flushed by irrigation with medium. The marrow plugs were passed through a 25-gauge needle for dispersion. The cells were cultured in plastic dishes (150 mm) in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 20% fetal bovine serum and 30% L-cell-conditioned media as a source of macrophage-colony stimulating factor. Macrophages were obtained as a homogeneous population of adherent cells after 7 days of culture and maintained at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Raw 264.7 macrophages and EL-4 and HEK-293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium culture media containing 10% fetal bovine serum supplemented with 10 units/ml penicillin and streptomycin and 2 mM L-glutamine. Cells were grown in 100-mm tissue culture dishes for sample collection and on non-coated glass coverslips for electrophysiology and confocal imaging. In some experiments Raw 264.7 cells were incubated with 100 ng/ml recombinant TNF- α (PreproTech E) for 24 h. All animal handling was approved by the ethics committee of the University of Barcelona and was in accordance with European Union regulations.

RNA Isolation and RT-PCR Analysis—Total RNA from tissues (brain, liver) and cell lines was isolated using the Tripure isolation reagent (Roche Diagnostics). To avoid DNA contam-

ination, the obtained RNA was treated with DNase I, and additional PCR controls were performed in the absence of reverse transcriptase. Ready-to-Go RT-PCR beads (Amersham Biosciences) were used in a one-step RT-PCR reaction. Total RNA and Kv1.3 and Kv1.5 primers were added to the beads as described (8, 11, 19). Forward and reverse oligonucleotide sequences and accession numbers were as follows: Kv1.3 (accession number M30441; forward, 5'-CTCATCTCCATTGTCATCTTCTGA-3', base pairs 741–765; reverse, 5'-TTGAAGTTGGAAACAATCAC-3', base pairs 1459–1440); Kv1.5 (accession number AF302768, forward, 5'-GGATCACTCCATCACCAG-3', base pairs 3003–3020; reverse, 5'-GGCTTCCTCCTCCTTCCTTG-3', base pairs 3337–3320). The RT reaction was initiated by incubating the mixture at 42 °C for 30 min. Once the first-strand cDNA was synthesized, the conditions were set for further PCR: 92 °C for 30 s, 58 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. These settings were applied for 30 cycles.

Protein Extracts, Immunoprecipitation, and Western Blot—Cells were washed twice in cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed on ice with lysis solution (1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 50 mmol/liter HEPES, pH 7.5, 150 mmol/liter NaCl) supplemented with 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 86 μ g/ml iodoacetamide, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as protease inhibitors. To obtain enriched membrane preparations, homogenates were centrifuged at 3,000 \times g for 10 min, and the supernatant was further centrifuged at \sim 150,000 \times g for 90 min. The pellet was resuspended in 30 mM HEPES, pH 7.4, and protein content was determined by Bio-Rad protein assay. Samples were separated into aliquots and stored at -80 °C.

Crude membrane protein samples (50 μ g) were boiled in Laemmli SDS loading buffer and separated on 10% SDS-PAGE. They were transferred to nitrocellulose membranes (Immobilon-P, Millipore) and blocked in 5% dry milk-supplemented 0.2% Tween 20 PBS before immunoreaction. Filters were immunoblotted with antibodies against Kv1.3 (1/200, Alomone) and Kv1.5 (1/500, Alomone). As a loading and transfer control, a monoclonal anti- β -actin antibody (1/5000, Sigma) was used. The specificity of Kv1.3 and Kv1.5 commercial antibodies was tested with control antigen peptides provided by the manufacturer.

For immunoprecipitation studies, membrane pellets were resuspended in 1% Triton, 10% glycerol, 50 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM NaCl incubated in the presence of protein A-Sepharose, and pelleted. Supernatants incubated overnight with anti-Kv1.3 antibody (Alomone) were further incubated with protein A-Sepharose, washed with 0.1% Triton/PBS, and centrifuged. Pellets were re-suspended in Laemmli SDS-loading buffer, boiled at 95 °C, and separated on 8% SDS-PAGE. To detect immunoprecipitated Kv1.5, an anti-Kv1.5 antibody (1/250) produced and characterized in the Tamkun laboratory was used. Densitometric analysis of the filters was performed by Phoretix software (Nonlinear Dynamics). Results are the mean \pm S.E. of each experimental group.

DNA Constructs, Cell Transfection, and Microinjection—Rat Kv1.3 cDNA, kindly donated by T. C. Holmes (New York University), was amplified by PCR and ligated into pEYFP-C1 (Clontech) by using BglII and HindIII restriction sites. Human

Role of Kv1.5 in Macrophages

Kv1.5 cDNA was amplified by PCR and ligated into pECFP-C1 (Clontech) by using BglII and EcoRI. Both constructs were verified by sequencing.

Raw 264.7 and HEK cells were grown on glass coverslips in 35-mm dishes, and transient transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) to near 80% confluency. Twenty-four hours after transfection, cells were washed with PBS, fixed, and mounted with Aqua Poly/Mount from Polysciences, Inc.

X. laevis oocytes were prepared and injected by standard methods. Mature female frogs were purchased from the Centre d'Elevage de Xenopes (Montpellier, France). Animals were anesthetized in cold distilled water containing 1.7 g/liter tricaine(ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonic acid; Sigma). Ovarian sacs were extracted by sterile surgical procedures and placed in sterile Barth's solution (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 2.40 mM NaHCO₃, and 20 mM HEPES at pH 7.5 supplemented with penicillin 100 IU/ml and streptomycin 0.1 mg/ml). Oocytes at stages V and VI were dissected out and kept at 15–16 °C in sterile Barth's solution.

Full-length Kv1.3 and Kv1.5 were subcloned into pcDNA3. cRNAs were generated with T7 RNA polymerase by using the mMESSAGE mMACHINE kit according to manufacturer's instructions (Ambion). Oocytes were injected with 10 ng of Kv1.3 or Kv1.5 of *in vitro* transcribed cRNAs to form homotetramers. Heterotetramers were expressed in oocytes injected with 10 ng of total cRNA of Kv1.3 and Kv1.5 in the proportions of 1:1, 3:1, and 1:3 using a Variable Nanoject (Drummond Scientific Co). Twenty-four hours after injection, the follicular cell layer was partially removed by incubation for 30 min with 0.25 mg/ml type-1A collagenase (Sigma). Oocytes were maintained at 15–16 °C in sterile Barth's solution, and recordings were made 3 days later.

Confocal Imaging and Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Experiment—Transiently transfected cells were fixed with 4% paraformaldehyde, PBS for 10 min. Acceptor photobleaching method was used to measure the FRET. Fluorescent proteins from fixed cells were excited with the 458-nm or the 514-nm lines by low excitation intensities and 475–495-nm bandpass and >530-nm longpass emission filters, respectively. Subsequently, YFP protein was bleached by using maximum laser power, obtaining around 80% of acceptor intensity bleaching. After photobleaching images of the donor and acceptor were taken, FRET efficiency was calculated as $(F_{CFP_{after}} - F_{CFP_{before}})/F_{CFP_{after}} \times 100$, where $F_{CFP_{after}}$ is the intensity of fluorescence of donor after bleaching, and $F_{CFP_{before}}$ is before bleaching. Loss of fluorescence intensity was corrected by measuring CFP intensity in the non-bleached part of the cell. The FRET values are expressed as the means \pm S.E. of $n > 10$ cells for each population.

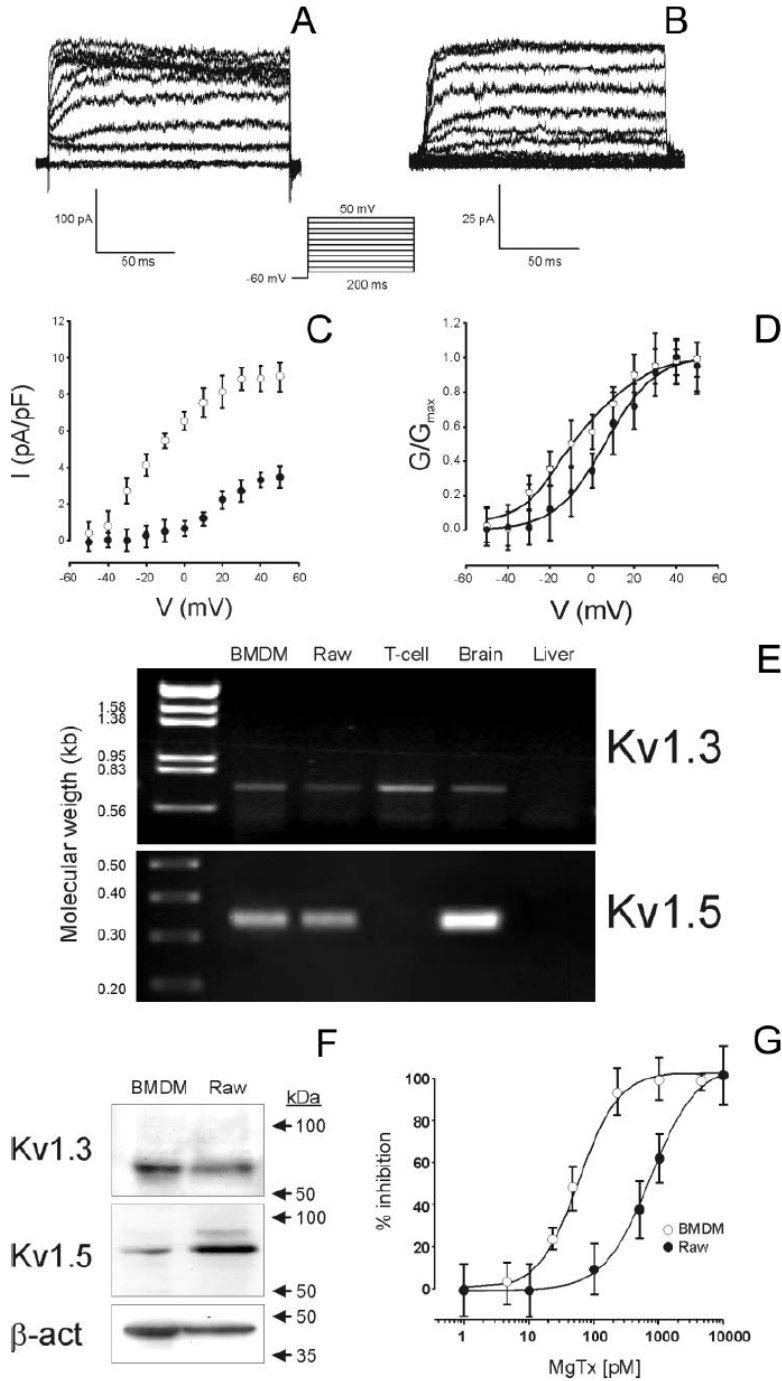
Electron Microscopy—Cells were fixed in 4% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in PBS for 30 min at room temperature and then replaced with 2% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde in PBS overnight at 4 °C. Fixation was removed by washing with 0.02 M glycine in PBS. Cells were scraped and collected in Eppendorf tubes with 12% gelatin. After solidifying on ice, gelatin blocks were infiltrated in 2.3 M sucrose in PBS

overnight at 4 °C. Blocks were frozen in liquid nitrogen. Ultrathin cryosections were obtained using Leica ULTRACUT EM FCS at –118 °C and subjected to immunogold labeling. Cryosections were incubated at room temperature on drops of 2% gelatin in phosphate buffer for 20 min at 37 °C followed by 50 mM glycine in PBS for 15 min and 5% normal goat serum in PBS for 10 min. Then they were incubated with anti-Kv1.5 or anti-Kv1.3 polyclonal antibodies in 5% normal goat serum in PBS for 30 min. After 3 washes with drops of 5% normal goat serum in PBS for 20 min, sections were incubated for 60 min using IgG anti-rabbit coupled to 10-nm or to 15-nm diameter colloidal gold particles (Aurion) using a 1:60 dilution in 5% normal goat serum in PBS. This was followed by 3 washes with drops of PBS for 10 min and 2 washes with distilled water. As a control for nonspecific binding of the colloidal gold-conjugated antibody, the primary polyclonal antibody was omitted. Finally, the cryosections were contrasted and embedded in a mixture of methylcellulose and uranyl acetate. At the double immunogold, an immunolabeling with one of the primary antibodies was done. In the first immunolabeling procedure we used the secondary antibody conjugated with the small gold (10 nm). Then the inactivation of the anti-IgG binding sites, using 3% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde in PBS for 2 h, was performed (20). After inactivation the immunolabeling with the other primary antibody was done using in this case the secondary antibody conjugated to 15-nm gold particles. Primary antibody dilutions were 1:50 in both cases. Samples were viewed with a Jeol 1010 electron microscope.

Electrophysiological Recordings—Whole-cell currents were measured with the patch clamp technique. An EPC-9 (HEKA) amplifier with the appropriate software was used for data recording and analysis. Currents were filtered at 2.9 kHz. Series resistance compensation was always above 70%. Patch electrodes of 2–4 megaohms were fabricated in a P-97 puller (Sutter Instruments Co.) from borosilicate glass (outer diameter of 1.2 mm and inner diameter of 0.94 mm; Clark Electromedical Instruments Co). Electrodes were filled with the 120 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 11 mM EGTA, 20 mM D-glucose adjusted to pH 7.3 with KOH. The extracellular solution contained 120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 25 mM D-glucose adjusted to pH 7.4 with NaOH. After establishment of a whole-cell configuration, macrophages were clamped to a holding potential of –60 mV, with seal resistances of at least 2.5 gigaohms. All recordings were routinely subtracted for leak currents at –50 mV online. Only cells with a series resistance compensation of 80–90% were selected for analysis. Uncompensated series resistances were 4–8 megaohms, as currents evoked were less than 1 nA; voltage errors from uncompensated series resistance were less than 2 mV.

To determine voltage dependence of steady-state activation, currents were elicited by 200-ms voltage pulses (–50 to +50 mV, V_h) from a holding potential V_h of –60 mV with 10-mV increments. To ensure complete recovery from inactivation, cells were repolarized for 45 s at –60 mV. After converting the steady-state peak outward currents (I_k) into conductances, G_k ($G_k = I_k/(V_h - E_k)$; E_k , Nernst potential of K⁺ –79 mV), conductances at various membrane potentials were normalized to

Role of Kv1.5 in Macrophages



Role of Kv1.5 in Macrophages

maximal conductance G_{\max} . G/G_{\max} was plotted versus V_p . The normalized G/G_{\max} versus voltage curve was fitted using the Boltzmann equation, $G/G_{\max} = 1/(1 + \exp^{-(V_p - V_{1/2})/k})$, where $V_{1/2}$ is the voltage at which the current is half-activated, and k is the slope factor of the activation curve. To calculate inactivation time, constants (τ) cells were held at -60 mV, and pulse potentials of 4 s were applied. Inactivation adjustment was calculated from the peak of the current at 50 mV to the steady-state inactivation, and traces were fitted with Sigma Plot (SPSS Inc.). To analyze the cumulative inactivation, currents were elicited by a train of 8 depolarizing voltage steps of 200 ms to $+50$ mV once every 400 ms.

Oocytes were voltage-clamped with a two-electrode system, Gene Clamp 500 (Axon Instruments). The voltage and the current microelectrodes were filled with KCl (3 M) and had resistances ranging from 0.5 to 1 megaohms. The volume of the oocyte recording chamber was 200 μ l. Recordings were done under constant bath perfusion (1 ml/min). The bath electrode was an Ag-AgCl pellet that made contact with the recording solution (115 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , and 10 mM HEPES at pH 7.4) through an agar bridge. Membrane potential and current were digitized through a PCI-MIO-16E-4 Multifunction I/O Board and NI-DAQ (National Instruments). The board was controlled by the Whole Cell Analysis Program (kindly provided by John Dempster, University of Strathclyde). The signal was filtered at twice the acquisition frequency. Oocytes were clamped to a holding potential of -60 mV. To evoke voltage-gated currents, all oocytes were stimulated with 1-s square pulses ranging from -80 mV to $+80$ mV in 10-mV steps. To ensure complete recovery from inactivation, oocytes were repolarized for 60 s at -60 mV. To calculate inactivation time constants (τ), pulse potentials of 5 s were applied. Inactivation adjustment was calculated from the peak of the current at $+80$ mV to the steady-state inactivation, and traces were fitted with Sigma Plot (SPSS Inc.). Data were leak-subtracted using hyperpolarizing P/4 subtraction pulses. Data were analyzed by the Whole Cell Analysis program.

To characterize the voltage-dependent outward K^+ current pharmacologically, recombinant margatoxin (MgTx) was added to the external solution (8, 11). Toxin was reconstituted at 10 μ M in Tris buffer (0.1% bovine serum albumin, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5). Solutions were perfused by gravity and controlled by electrovalves (ALA, Scientific Instruments). All recordings were performed at room temperature (20–23 °C).

Statistics—Values are expressed as the mean \pm S.E. The significance of differences was established by Student's *t* test or by analysis of variance (GraphPad, PRISM 4.0) where indicated. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Macrophages Express Kv1.3 and Kv1.5 Channels—Voltage-dependent potassium currents were evoked in macrophages by depolarizing pulses. Fig. 1, A and B, show representative potassium currents in BMDM and Raw 264.7 macrophages, respectively. The current density (picoamperes/picofarads)/voltage relationships depicted in Fig. 1C indicate that currents in BMDM were 3-fold higher than in Raw cells. Fig. 1D shows the normalized conductance against the test potential. Although the threshold for activation was about -40 mV in BMDM, channels opened at -20 mV in Raw macrophages. Whereas k slopes were similar for both groups (18.3 \pm 3 and 11.9 \pm 2 for BMDM and Raw, respectively, $n = 10$), $V_{1/2}$ values were significantly different (-7.2 ± 2 and 6.3 ± 2 mV for BMDM and Raw, respectively, $p < 0.001$, $n = 10$).

Kv1.3 is the main voltage-dependent K^+ channel in leukocytes (2). This was confirmed by RT-PCR analysis in our cells. Fig. 1E shows that not only EL-4, a murine T-cell line, but also macrophages (BMDM and Raw) expressed Kv1.3. However, the presence of Kv1.5 was only observed in macrophages. Mouse brain and liver RNAs were used as positive and negative controls, respectively. The presence of Kv1.5 protein in both myeloid cell lines was further confirmed by Western blot analysis performed in crude membrane preparations (Fig. 1F).

Contrary to Kv1.5, Kv1.3 is highly sensitive to specific toxins (21). K^+ currents in BMDM are blocked by Kv1.3 inhibitors such as MgTx and ShK-Dap²² (8, 11). However, the presence of Kv1.5 indicates that either Kv1.5 forms homotetrameric complexes or Kv1.5 subunits are assembled with Kv1.3 in heterotetrameric structures that are sensitive to Kv1.3 toxins. Fig. 1G shows that K^+ currents in both macrophage cell lines are inhibited by the presence of MgTx. The IC_{50} values were 50 ± 5.1 and 772 ± 40 μ M for BMDM and Raw, respectively ($p < 0.001$, $n = 10$). MgTx does not block Kv1.5 (21). Therefore, these results indicate that, although Kv1.5 is expressed, this subunit does not form homomeric channels in macrophages. However, Raw and BMDM may differ in the K^+ channel complex composition since biophysical and pharmacological differences were evident.

Co-localization experiments supported the pharmacological and biophysical data. Unfortunately, immunocytochemistry studies with anti-Kv1.3 and anti-Kv1.5 antibodies were unsuccessful, probably due to high levels of Fc receptors expressed in macrophages. However, since Raw cells have the different Kv1.3 and Kv1.5 intracellular processing and trafficking programs, we transfected these cells with Kv1.3-YFP and Kv1.5-CFP. In general, cells were poorly transfected, but confocal analysis of double-transfected Raw cells demonstrated that Kv1.5 co-localized with Kv1.3 at the macrophage plasma mem-

FIGURE 1. Macrophages express voltage-dependent K^+ channels. Shown are representative traces of K^+ currents evoked in BMDM (A) and Raw 264.7 macrophages (B). Cells were held at -60 mV, and currents were elicited by depolarizing pulses in 10-mV steps (200-ms duration) from -50 to $+50$ mV. To ensure completely recovery from inactivation, cells were repolarized for 45 s at -60 mV. C, current density versus voltage relationship of K^+ currents. D, normalized conductance plotted versus voltage. E, mRNA expression of Kv1.3 and Kv1.5. Raw, Raw 264.7 cells; T-cell, EL-4 T-lymphocytes. 1 μ g of total RNA was used in RT-PCR reactions, as described under "Experimental Procedures." kb, kilobases. F, Kv1.3 (67 kDa) and Kv1.5 (90 and 74 kDa) protein expression in BMDM and Raw 264.7 macrophages. G, dose-dependent inhibition curves of the K^+ current by MgTx. Currents were evoked at $+50$ mV from a holding potential of -60 mV during a pulse potential of 200 ms. The percentage inhibition was calculated by comparing the current at a given concentration of toxin versus that obtained in its absence. Symbols for panels C, D, and G are: \circ , BMDM; \bullet , Raw 264.7 macrophages. Values are the mean \pm S.E.

Role of Kv1.5 in Macrophages

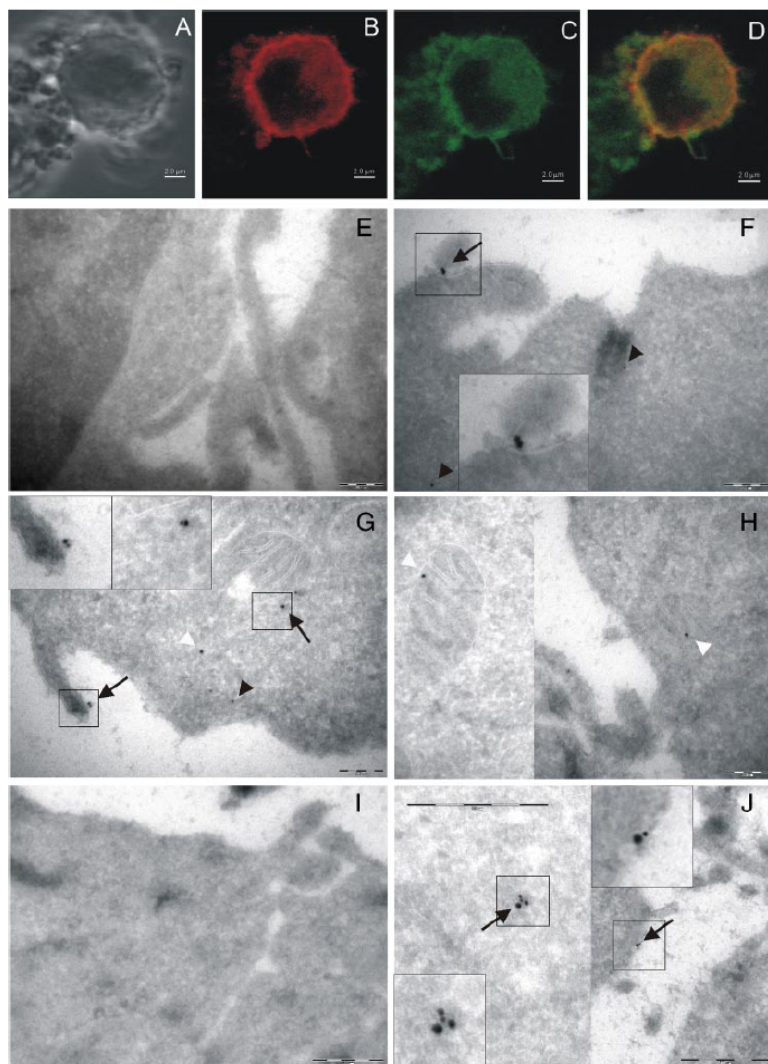


FIGURE 2. Kv1.3 and Kv1.5 co-localize at the macrophage membrane. Shown is confocal imaging of Kv1.3-YFP and Kv1.5-CFP co-transfected Raw 264.7 cells. *A*, phase image of a Raw macrophage. Kv1.3-YFP (*B*) and Kv1.5-CFP (*C*) are expressed on the cell surface. *D*, overlay of the two images demonstrating co-localization of both proteins at the macrophage membrane. Bars indicate a 2- μ m scale. *Panel E–J*, electron microscopy of Kv1.3 (15-nm gold) and Kv1.5 (10-nm gold) in non-transfected Raw 264.7 (*E–H*) and HEK-293 (*I–J*) cells. *E*, negative control using secondary antibodies. *F*, Raw cells expressing Kv1.3 and Kv1.5. *G*, hybrid channel detection. *H*, Kv1.3 channel detection at mitochondria. *I–J*, HEK cells transfected with Kv1.3 and Kv1.5. *I*, negative control using secondary antibodies. *J*, hybrid channel detection. Bars indicate 200 nm and 500 nm in Raw and HEK cells, respectively. Boxes are magnified for detail. Black arrowhead, Kv1.5; white arrowhead, Kv1.3; arrows, homo- and heteromeric channels.

brane (Fig. 2, *A–D*). In this context heteromeric channels could be immuno-detected by electron microscopy. Using this approach we detected oligomeric complexes both at the membrane and inside the cell (Fig. 2, *E–H*). Interestingly, some immunogold staining was also present at mitochondria (Fig. 2*H*), in which Kv1.3 has been previously described (22). Although a similar heteromeric pattern was obtained in dou-

ble-transfected HEK cells (Fig. 2, *I* and *J*), no Kv1.5 immunogold labeling was observed in HEK cells expressing homomeric Kv1.3 channels (data not shown).

Kv1.3 and Kv1.5 Form Functional Heterotetrameric Kv Channels in HEK-293 Cells—If heterotetramer formation occurs in macrophages, the electrophysiological and pharmacological profiles of heterologously expressed hybrid channels should be consistent with those present in native cells. To explore this hypothesis, we studied the expression of Kv1.3 and Kv1.5 in HEK-293 cells (Fig. 3). We first analyzed whether our constructs were fully functional and generated K^+ currents. Fig. 3, *A–C*, shows that HEK cells transfected with Kv1.3-YFP evoked K^+ currents. Similar results were obtained with Kv1.5-CFP (Fig. 3, *D–F*). In addition, Kv1.3 and Kv1.5 co-localized in double-transfected HEK cells, and as a result, K^+ currents were a mixture of those generated by homomeric channels (Fig. 3, *G–J*). Although the threshold voltage for activation was about -40 mV in homomeric Kv1.3 and hybrid Kv1.3/Kv1.5 channels, in Kv1.5 channels it was -20 mV. Plots of normalized conductance against membrane potential for Kv1.3-, Kv1.5-, and Kv1.3/Kv1.5-expressing cells are shown in Fig. 3*K*. Although $V_{1/2}$ values were -23.6 ± 0.9 and -6.7 ± 0.7 mV for Kv1.3 and Kv1.5, respectively, the heterotetramer showed a half-activation voltage of -20.1 ± 1.2 mV. Furthermore, k slope values were 10.6 ± 1 , 7.2 ± 1 , and 10.7 ± 1 for Kv1.3, Kv1.5, and the Kv1.3/Kv1.5 heterotetramer, respectively ($n = 10$).

Although Kv1.5 is resistant to MgTx, both homomeric Kv1.3 and heterotetrameric Kv1.3/Kv1.5 channels are highly sensitive to this toxin (Fig. 3, *L* and *M*). However, although Kv1.3 was inhibited with an IC_{50} of ~ 336 pM, hybrid Kv1.3/Kv1.5 channels were fully blocked but were much less sensitive to MgTx ($IC_{50} \sim 25$ nM). As observed in macrophages (see above), sensitivity to the toxin indicates that Kv1.5 is not expressed as a homomultimeric channel in HEK cells rather than forming heteromeric complexes with Kv1.3. The characteristic C-type inactivation of Kv1.3 is absent in Kv1.5 (21, 23).

Role of Kv1.5 in Macrophages

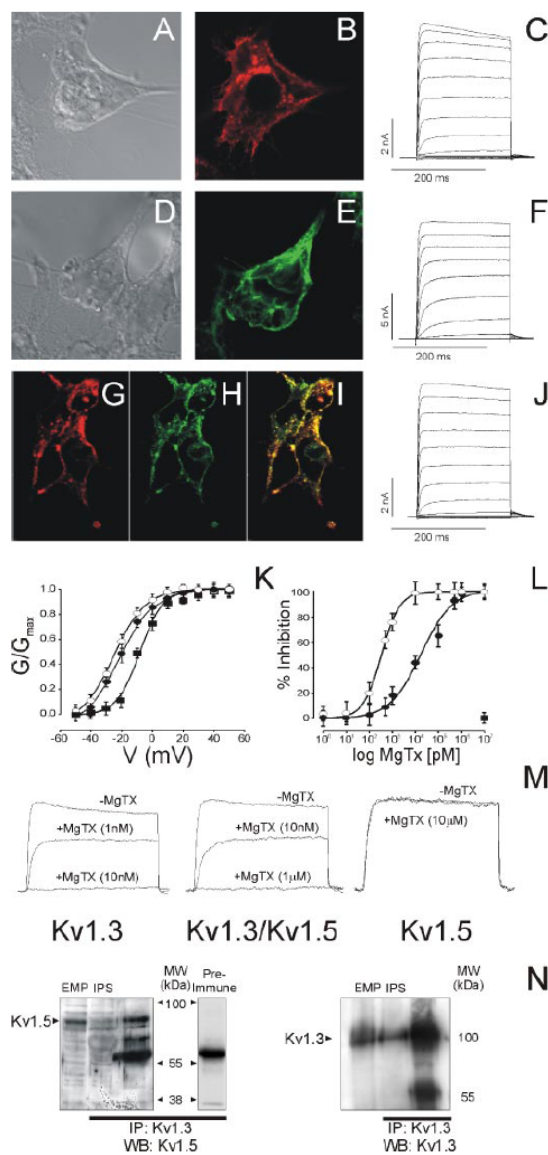


FIGURE 3. Kv1.3 and Kv1.5 heterotetramers are functional voltage-dependent potassium channels when expressed in HEK-293 cells. A–C, Kv1.3-YFP generates K^+ currents. A, phase image of a representative HEK cell. B, a confocal image demonstrating that the Kv1.3 channel targets the membrane. C, outward-delayed rectifier K^+ currents in Kv1.3-YFP transfected cells. D–F, Kv1.5-CFP also generates K^+ currents when expressed in HEK-293 cells. D, phase micrograph of a HEK cell. E, expression of Kv1.5-CFP. F, outward-delayed rectifier K^+ currents in Kv1.5-CFP transfected cells. G–J, Kv1.3-YFP and Kv1.5-CFP co-localize in doubly-transfected HEK cells. G, Kv1.3-YFP. H, Kv1.5-CFP. I, overlay of the two images. Yellow signifies co-localization. J, K^+ currents generated in doubly transfected HEK cells. To evoke K^+ currents, HEK cells were held at -60 mV, and pulse potentials were applied as described in Fig. 1. K, plot of normalized conductance versus test potential. Conductance was normalized to the peak current at $+50$ mV. L, dose-dependent inhibition curves of the K^+ current by MgTx. Peak currents were evoked at $+50$ mV, and the percentage inhibition was calculated as described in Fig. 1. M, representative normalized traces obtained upon depolarization from -60 mV to $+50$ mV of Kv1.3 (left), Kv1.3/Kv1.5 (center), and Kv1.5 (right) expressed in HEK cells. After establishing the patch clamp configuration, currents were evoked at $+50$ mV. MgTx was further added to the bath chamber, and recordings were obtained after 1 min. Symbols for panels K and L are: \circ , Kv1.3; \bullet , Kv1.3/Kv1.5; \blacksquare , Kv1.5. Values are the mean \pm S.E. N, Kv1.3 and Kv1.5 co-associate in HEK cells. Immunoprecipitation experiments were performed in doubly transfected cells. Enriched membrane preparations (EMP) were immunoprecipitated (IP) with anti-Kv1.3 antibodies. The starting material (enriched membrane preparations (EMP) and the immune-precipitated supernatant (IPS) were further immunoblotted with anti-Kv1.5. Immunoprecipitates (IP) with anti-Kv1.3 were immunoblotted (WB) with anti-Kv1.3, anti-Kv1.5 serum and preimmune serum.

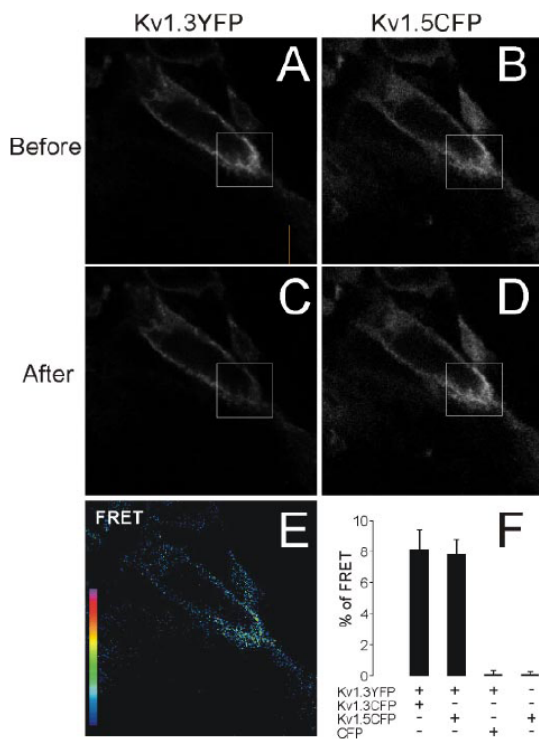


FIGURE 4. Molecular association of Kv1.3 and Kv1.5. HEK cells were doubly transfected with Kv1.3-YFP and Kv1.5-CFP, and FRET was performed. A representative experiment is shown. A–D, fluorescence signal of Kv1.3-YFP and Kv1.5-CFP before (A and B) and after (C and D) photobleaching of YFP, respectively. The region studied is delimited by the box. E, FRET panel representing the difference in CFP fluorescence intensity before and after photobleaching. F, FRET efficiency of different combinations. Kv1.3-YFP/Kv1.3-CFP was used as a positive control. Negative controls were performed with cells expressing Kv1.3-YFP/CFP and Kv1.5-CFP alone.

Thus, the presence of the latter in MgTx-sensible hybrid channels increased the time constant of inactivation in HEK cells (555 ± 40 ms and 832 ± 100 ms for Kv1.3 and Kv1.3/Kv1.5 at $+50$ mV, respectively, $p < 0.05$), further demonstrating heteromeric Kv1.3/Kv1.5 association. In addition, panels on Fig. 3N show that, although the immunoprecipitation with anti-Kv1.3 antibody was not fully effective, Kv1.5 co-immunoprecipitated with Kv1.3 in double-transfected HEK cells. Thus, confocal imaging, immunoprecipitation, and immunogold detection by electron microscope (see Fig. 2J) indicated that Kv1.3 and Kv1.5

Role of Kv1.5 in Macrophages

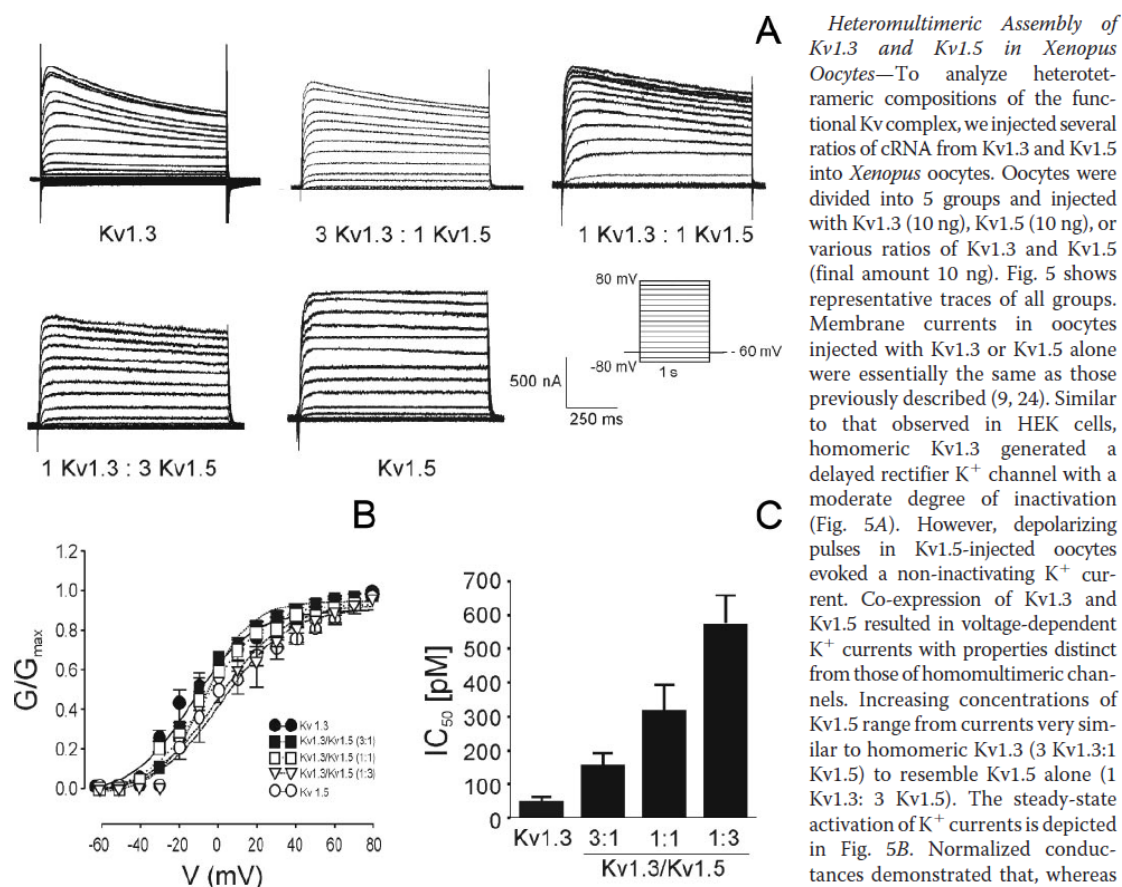


FIGURE 5. Expression of different ratios of Kv1.3 and Kv1.5 in *Xenopus* oocytes. *A*, representative traces of K⁺ currents evoked in oocytes injected with different ratios of Kv1.3 and Kv1.5. Pulse protocols are shown. To ensure complete recovery from inactivation, cells were repolarized for 60 s at -60 mV. Maximum conductance values (+80 mV) were always between 5 and 10 microsiemens, with a mean of 9.3 ± 2.2 microsiemens. *B*, plot of normalized conductance against test potential. *C*, IC₅₀ for margatoxin-sensitive K⁺ currents in homo- (Kv1.3) and various heterotetrameric (Kv1.3/Kv1.5) channels. Currents were evoked at +80 mV from a holding potential of -60 mV during a pulse potential of 1 s. Values are mean ± S.E. of at least five independent oocytes.

co-localized at the membrane and co-assembled, forming a functional heteromeric complex. However, to further confirm this physical association, we undertook FRET analysis (Fig. 4). A confocal section of doubly labeled cells before photobleaching is shown in *panels A* and *B*. Once the long-wavelength fluorescence of the acceptor was eliminated (*panel C*), the donor intensity was measured again (*panel D*), and FRET efficiency was calculated (*panels E* and *F*). The mean FRET efficiency of homotetrameric Kv1.3 channels (Kv1.3-CFP/Kv1.3-YFP) indicated an increment significantly greater than 0% (8%). Similar results were obtained with hybrid Kv1.3/Kv1.5 channels. However, neither Kv1.3-YFP with CFP nor Kv1.5-CFP gave FRET efficiency different from 0%. Our results confirm molecular proximity between Kv1.3 and Kv1.5, as reported by co-immunoprecipitation, co-localization, and electron microscopy.

voltage to more positive potentials. Thus, V_{1/2} values were -11.3 ± 3, -9.8 ± 1, -6.4 ± 2, 0.1 ± 3, and 2 ± 3 mV for Kv1.3, hybrids Kv1.3/Kv1.5 (3:1, 1:1, 1:3), and Kv1.5, respectively (*p* < 0.001, analysis of variance). In addition, *k* slope values were almost similar in all groups, 15.6 ± 2, 11.8 ± 1, 15.2 ± 2, 17.1 ± 3, and 16.9 ± 9 for Kv1.3, hybrids Kv1.3/Kv1.5 (3:1, 1:1, 1:3), and Kv1.5, respectively. Pharmacological studies indicate that, similar to what was observed in HEK cells, the presence of Kv1.5 led to less MgTx-sensitive K⁺ currents (Fig. 5C). Thus, higher IC₅₀ were obtained as a result of increasing Kv1.5 ratios, which were 47 ± 10 (Hill coefficient 1.1), 153 ± 40 (Hill coefficient 0.51), 313 ± 80 (Hill coefficient 0.54), and 568 ± 90 (Hill coefficient 0.54) pM for Kv1.3 and hybrids Kv1.3/Kv1.5 (3:1, 1:1, 1:3), respectively (*p* < 0.001, analysis of variance). Finally, the time constant of inactivation at +80 mV also increased and were

Role of Kv1.5 in Macrophages

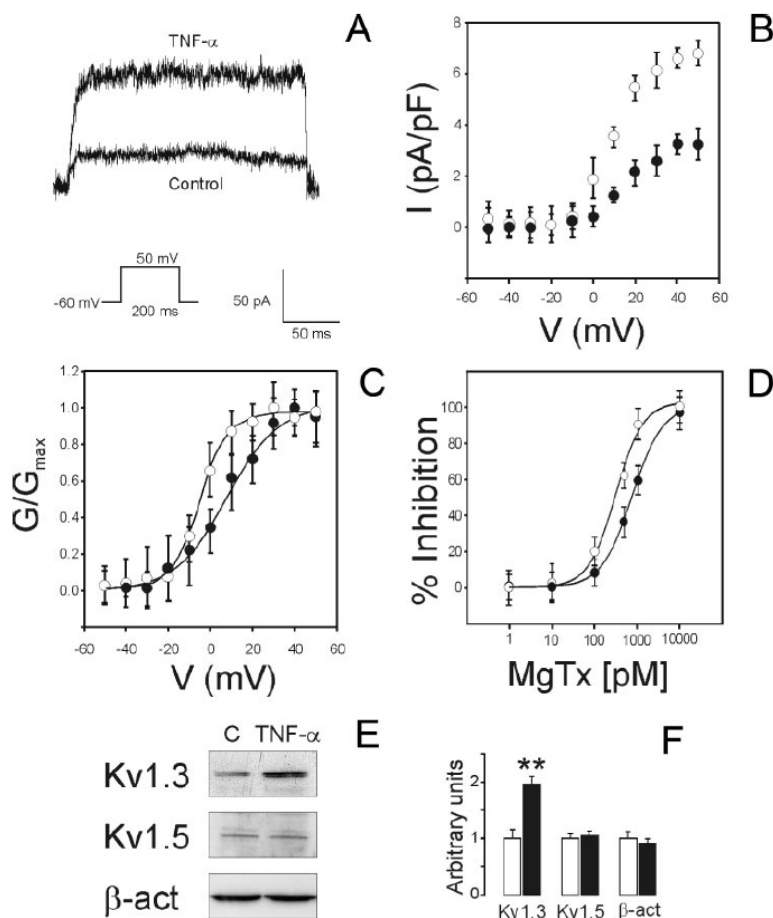


FIGURE 6. TNF- α differentially regulates Kv1.3 and Kv1.5 concomitantly to biophysical and pharmacological changes of K⁺ currents in Raw 264.7 macrophages. Cells were incubated for 24 h in the presence or absence of TNF- α . *A*, representative traces of K⁺ currents elicited by a +50-mV depolarizing pulse (200 ms) in control and TNF- α -treated Raw cells. *B*, current density versus voltage relationship of K⁺ currents. *C*, normalized conductance plotted against test potential. *D*, dose-dependent inhibition curves of the K⁺ current by MgTx. Currents were evoked, and the percentage inhibition was calculated as described in Fig. 1. Symbols in panels *B–D* are: ●, control; ○, TNF- α . *E*, Kv1.3 and Kv1.5 Western blot analysis of enriched membrane preparations from Raw macrophages in the absence (Control) or the presence (TNF- α) of the cytokine. Representative blots are shown. β -actin, β -actin. *F*, Kv1.3 and Kv1.5 protein expression values derived from panel *E*. In all cases arbitrary units are standardized to the control value in the absence of TNF- α . Open bars, control; closed bars, TNF- α . Values are the mean \pm S.E. of at least three independent experiments. **, $p < 0.01$ versus control (Student's *t* test).

526 \pm 50, 833 \pm 70, 963 \pm 50, 1470 \pm 250, and >5000 ms for Kv1.3, hybrids Kv1.3/Kv1.5 (3:1, 1:1, 1:3), and Kv1.5, respectively ($p < 0.001$, analysis of variance).

Kv heteromeric Composition Changes in Macrophages Altering Pharmacology and Biophysics—Our results have physiological significance because Kv channels in leukocytes are considered pharmacological targets, and the composition of the channel complex could impair potential therapies. Thus, differential regulation of Kv1.3 and Kv1.5 could modify the subunit composition of the channel, altering the biophysical and pharmacological properties. To ascertain this, we cultured Raw

macrophages in the presence of TNF- α (Fig. 6). This cytokine, produced by leukocytes under a systemic inflammatory response, activates macrophages and regulates Kv (8, 25). The addition of TNF- α for 24 h increased outward-delayed rectifier K⁺ currents up to 3-fold. Half-activation voltage shifted to negative potentials (7.9 \pm 1.6 and -6.8 \pm 1.5 mV for control and TNF- α , respectively, $p < 0.001$, $n = 30$), and k slope values were different (11.5 \pm 1.3 and 6.5 \pm 1.2 for control and TNF- α , respectively, $p < 0.001$, $n = 30$). In addition, whereas this cytokine induced Kv1.3 protein expression, Kv1.5 abundance remained constant. Other functional parameters also support an increase of Kv1.3 subunits in TNF- α -activated cells. Thus, an \sim 10-mV hyperpolarized shift in the membrane potential (data not shown) and a decrease of the IC₅₀ for Margatoxin (772 \pm 40 and 319 \pm 48 pM, $p < 0.001$) were observed in cells treated with the cytokine. Because Kv1.3 is involved in macrophage activation (8, 10), our results are consistent with an increased number of Kv1.3 subunits, either as homomeric Kv1.3 or hybrid Kv1.3/Kv1.5 channels.

TNF- α -induced activation as well as the differential expression of Kv1.3 and Kv1.5 in different cell types modifies the Kv1.3/Kv1.5 ratio, altering the cellular excitability and leading to functional consequences. High Kv1.3/Kv1.5 ratios, as observed in BMDM and TNF- α -activated Raw cells (Fig. 7A), are in agreement with more hyperpolarized half-activation voltages, rapid inactivation time constants, more cumulative inactivation, and lower

IC₅₀ for MgTx (Fig. 7, B–E). However, low Kv1.3/Kv1.5 ratios as observed in control Raw cells would modify kinetics and alter pharmacology.

DISCUSSION

This study demonstrates that Kv1.3 and Kv1.5 can form heterotetrameric structures and suggests that Kv1.3/Kv1.5 hybrid K⁺ channels contribute to the major Kv channel in macrophages. Furthermore, our data also show that the Kv1.3/Kv1.5 ratio may vary in the Kv complex, leading to biophysically and pharmacologically distinct channels.

Role of Kv1.5 in Macrophages

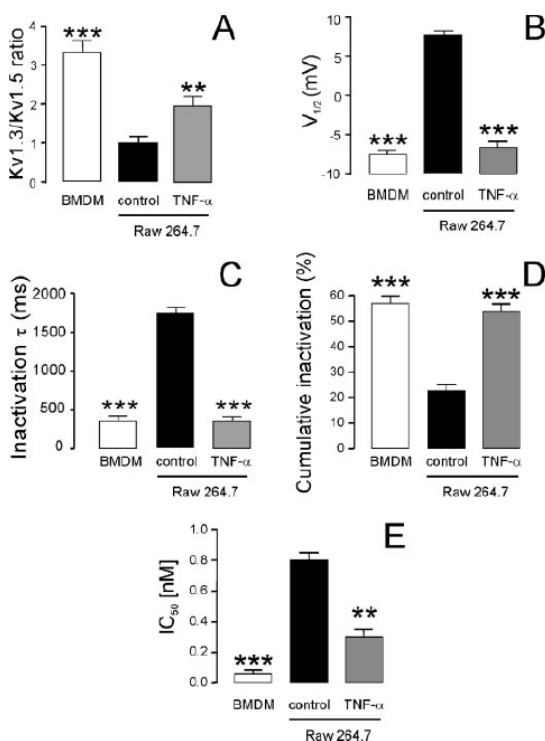


FIGURE 7. Variations in the Kv1.3/Kv1.5 ratio are correlated with changes in biophysical and pharmacological properties of K^+ currents in macrophages. A, Kv1.3/Kv1.5 ratios in BMDM and Raw cells cultured in the presence or the absence of TNF- α were calculated from Western blots similar to those shown in Figs. 1 and 6 and standardized to the value of control Raw 264.7 cells. Values are the mean \pm S.E. of at least three independent experiments. B, half-activation voltage of K^+ currents in macrophages. Values were calculated from steady-state activation curves of the outward current. Conductance was normalized to the peak current at +50 mV. C, time constant of inactivation (τ). Cells were held at -60 mV, and a +50 mV pulse potential was applied during 4 s. D, percentage of cumulative inactivation. Currents were elicited by a train of 8 depolarizing voltage steps of 200 ms to +50 mV once every 400 ms. The percentage was calculated as a result of the difference between the peak current at the first pulse and the remaining current at the last. E, IC_{50} values of the K^+ current in the presence of MgTx. Currents were evoked, and the percentage inhibition was calculated as described in Fig. 1. Open bars, BMDM; closed bars, control Raw 264.7 cells; gray bars, TNF- α -activated Raw 264.7 cells. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ versus control (Student's *t* test).

Although heteromeric structures between either Kv1.3 or Kv1.5 and other Kv1 subunits had been described (7, 26–29), our study demonstrates for the first time that Kv1.3 assembles with Kv1.5 to generate functional Kv complexes. Thus, similar to nerve and muscle, in macrophages it is difficult to assign currents to specific channels. Tissue localization and the absence of currents other than those generated by homomeric channels argue against certain Kv complexes (30–32). Thus, the assembly of Kv1.3 with Kv1.1 and Kv1.2 was questioned by immunohistochemical localization in mouse rod bipolar cells (30). In addition, a differential distribution also argues against a heteropolymer between Kv1.1 and Kv1.5 in Schwann cells (31). In contrast, Kv1.5 co-assembles with Kv1.2 and Kv1.4 in GH3

pituitary cells, brain cortex, and the cardiovascular system (7, 17, 26). However, in GH3 cells, up to 70% of the channels were pharmacologically identified as Kv1.5 homomers (17). This is not the case in murine macrophages, since the presence of Kv1.5 in heterotetrameric Kv1.3/Kv1.5 channels induced a shift to positive potentials concomitantly with a loss of sensitivity to MgTx. Unlike Kv1.5, Kv1.3 and hybrids Kv1.3/Kv1.5 are highly sensitive to MgTx. Our data argue against homotetrameric channels consisting of Kv1.5, but the presence of Kv complexes generated only by Kv1.3 cannot be ruled out.

Kv1.3 subunit is the main responsible for outward-delayed rectifier potassium currents in leukocytes (2). Nonetheless, although half-activation voltages of Kv1.3 currents in T-cells range from -14 to -35 mV, $V_{1/2}$ values are more depolarized in BMDM and Raw macrophages (Refs. 8 and 11 and this study). Unlike T-cells, macrophages express Kv1.5, which shows more positive potentials when expressed in heterologous expression systems (10). In brain macrophages, a switch from Kv1.5 to Kv1.3 during cell growth was described, and the half-activation voltage of the Kv currents was shifted -17 mV to hyperpolarized values in proliferating cells (10). This is similar to what we found in BMDM and TNF- α -activated Raw cells, where negative shifts could be caused by higher Kv1.3/Kv1.5 ratios. In this scenario, pharmacological and gating parameters in oocytes expressing different Kv1.3/Kv1.5 ratios support the contribution of different heteropolymeric complexes to the major Kv in BMDM and Raw macrophages. Whereas BMDM exhibit $V_{1/2}$ and IC_{50} values similar to Kv1.3 homo and Kv1.3/Kv1.5 (3:1) heterotetrameric structures, Raw macrophages were more like Kv1.3/Kv1.5 (1:1 or 1:3).

A change in the Kv1.3/Kv1.5 ratio in the Kv complex would affect kinetic parameters and pharmacology. Because TNF- α induces differential regulation of K^+ channels (8, 11, 25), our results are consistent with the possibility that the cytokine alters the stoichiometry of the subunits in the channel. In addition, a new composition could also affect the interaction with the Kv β subunits in macrophages, thus modifying the gating kinetics (11). Association or lack of association with endogenous β -subunits could also affect the phenotype of the resulting current. Our data show that potassium channels from activated cells are more sensitive to small changes in the membrane potential. Thus, these cells would be more excitable at negative potentials. In this context it has been described that a depolarizing change of +25 mV modifies IL-2 production, thus reducing the activation and antibody production of lymphocytes (34). Hormones and cytokines may produce long-term effects on excitability by regulating K^+ channel gene expression. Although Kv1.3 expression is induced during activation and apoptosis, down-regulation is associated with immunosuppression (18). Dexamethasone, a glucocorticoid antagonist, induces Kv1.5 expression in pituitary cells and cardiomyocytes and inhibits Kv1.3 in T-cells (16–18). Panyi *et al.* (35, 36) located Kv1.3 in the immunological synapse between cytotoxic and target cells. Activating cytokines would increase the amount of Kv1.3 subunits, forming either homo- or heterotetrameric structures, and changes in Kv composition would modify membrane excitability within the immunological synapse between T-lymphocytes and macrophages. Thus, hormones

Role of Kv1.5 in Macrophages

and cytokines can affect the expression of cell surface homomeric and heteromeric channels in different ways, leading to specific alteration of excitability.

In summary, our results demonstrate that Kv1.3 and Kv1.5 form heterotetrameric K⁺ channels in macrophages. In addition, the physiological regulation of the Kv channel subunit stoichiometry may be an important mechanism triggering the specific immune response. The findings of the present study are of interest since K⁺ channels in leukocytes are considered pharmacological targets in autoimmune diseases (33), and as we demonstrate, different channel composition may change biophysical properties and alter the use of potential drug therapies. Macrophages present antigens to infiltrating T-lymphocytes, and the predominance of Kv1.3 in activated macrophages could generate more specific drug-sensitive complexes leading to more effective therapies.

Acknowledgments—We thank L. Martín and J. Bertrán for help with macrophage cultures. The editorial assistance of the Language Advisory Service from the University of Barcelona is also acknowledged.

REFERENCES

- Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Cells*, 3rd Ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Cahalan, M. D., Wulff, H., and Chandy, K. G. (2001) *J. Clin. Immunol.* **21**, 235–252
- Martens, J. R., Kwak, Y. G., and Tamkun, M. M. (1999) *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 253–258
- MacKinnon, R. (1991) *Nature* **350**, 232–235
- Isacoff, E. Y., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1990) *Nature* **345**, 530–534
- Wang, F. C., Parcej, D. N., and Dolly, J. O. (1999) *Eur. J. Biochem.* **263**, 230–237
- Po, S., Roberds, S., Snyders, D. J., Tamkun, M. M., and Bennett, P. B. (1993) *Circ. Res.* **72**, 1326–1336
- Vicente, R., Escalada, A., Coma, M., Fuster, G., Sanchez-Trillo, E., Lopez-Iglesias, C., Soler, C., Solsona, C., Celada, A., and Felipe, A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 46307–46320; Correction (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 13204
- Grissmer, S., Dethlefs, B., Wasmuth, J. J., Goldin, A. L., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., and Chandy, K. G. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9411–9415
- Kotecha, S. A., and Schlichter, L. C. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 10680–10693
- Vicente, R., Escalada, A., Soler, C., Grande, M., Celada, A., Tamkun, M. M., Solsona, C., and Felipe, A. (2005) *J. Immunol.* **174**, 4736–4744
- Pyo, H., Chung, S., Jou, I., Gwag, B., and Joe, E. H. (1997) *Mol. Cell* **7**, 610–614
- Jou, I., Pyo, H., Chung, S., Jung, S. Y., Gwag, B. J., and Joe, E. H. (1998) *Glia* **24**, 408–414
- Chung, S., Lee, J., Joe, E. H., and Uhm, D. Y. (2001) *Neurosci. Lett.* **300**, 67–70
- Khanna, R., Roy, L., Zhu, X., and Schlichter, L. C. (2001) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, 796–806
- Takimoto, K., Fomina, A. F., Gealy, R., Trimmer, J. S., and Levitan, E. S. (1993) *Neuron* **11**, 359–369
- Takimoto, K., and Levitan, E. S. (1996) *Biochemistry* **35**, 14149–14156
- Lampert, A., Müller, M. M., Berchtold, S., Lang, K. S., Palmada, M., Dobrovinskaya, O., and Lang, F. (2003) *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **447**, 168–174
- Fuster, G., Vicente, R., Coma, M., Grande, M., and Felipe, A. (2002) *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **24**, 253–259
- Jensen, H. L., and Norrild, B. (1999) *Histochem. J.* **8**, 525–533
- Gutman, G. E., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W., and Wang, X. (2005) *Pharmacol. Rev.* **57**, 473–508
- Szabo, I., Bock, J., Jekle, A., Soddemann, M., Adams, C., Lang, F., Zoratti, M., and Gulbins, E. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 12790–12798
- Snyders, D. J., Tamkun, M. M., and Bennett, P. B. (1993) *J. Gen. Physiol.* **101**, 513–543
- Swanson, R., Marshall, J., Smith, J. S., Williams, J. B., Boyle, M. B., Folaner, K., Luneau, C. J., Antanavage, J., Oliva, C., Buhrow, S. A., Bennett, C., Stein, R. B., and Kaczmarek, L. K. (1990) *Neuron* **4**, 929–939
- Vicente, R., Coma, M., Busquets, S., Moore-Carrasco, R., Lopez-Soriano, F. J., Argiles, J. M., and Felipe, A. (2004) *FEBS Lett.* **572**, 189–194
- Sobko, A., Peretz, A., Shirihai, O., Etkin, S., Cherepanova, V., Dagan, D., and Attali, B. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 10398–10408
- Shamotienko, O. G., Parcej, D. N., and Dolly, J. O. (1997) *Biochemistry* **36**, 8195–8201
- Coleman, S. K., Newcombe, J., Pryke, J., and Dolly, J. O. (1999) *J. Neurochem.* **73**, 849–858
- Veh, R. W., Lichtinghagen, R., Sewing, S., Wunder, F., Grumbach, I. M., and Pongs, O. (1995) *Eur. J. Neurosci.* **7**, 2189–2205
- Klumpp, D. J., Song, E. J., Ito, S., Sheng, M. H., Jan, L. Y., and Pinto, L. H. (1995) *J. Neurosci.* **15**, 5004–5013
- Mi, H., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., and Schwarz, T. L., (1995) *J. Neurosci.* **15**, 3761–3774
- Timpe, L. C., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1988) *Neuron* **1**, 659–667
- Beeton, C., and Chandy, K. G. (2005) *Neuroscientist* **11**, 550–562
- Freedman, B. D., Price, M. A., and Deutsch, D. J. (1992) *J. Immunol.* **149**, 3784–3794
- Panyi, G., Bagdany, M., Bodnar, A., Vamosi, G., Szentesi, G., Jenei, A., Matyus, L., Varga, S., Waldmann, T. A., Gaspar, R., and Damjanovich, S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2592–2597
- Panyi, G., Vamosi, G., Bacso, Z., Bagdany, M., Bodnar, A., Varga, Z., Gaspar, R., Matyus, L., and Damjanovich, S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1285–1290

Effect of galantamine on the human $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor, the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor and spontaneous cholinergic synaptic activity

¹Laura Teixidó, ¹Esteve Ros, ¹Mireia Martín-Satué, ²Susana López, ¹Jordi Aleu, ¹Jordi Marsal & ^{*1}Carles Solsona

¹Laboratory of Molecular and Cellular Neurobiology, Department of Cell Biology and Pathology, Medical School-Bellvitge Campus, IDIBELL-Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat, E-08907, Spain and ²Department of Natural Products, Plant Biology and Edaphology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, E-08028, Spain

1 Various types of anticholinesteratic agents have been used to improve the daily activities of Alzheimer's disease patients. It was recently demonstrated that Galantamine, described as a molecule with anticholinesteratic properties, is also an allosteric enhancer of human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptor activity. We explored its effect on the human $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) expressed in *Xenopus* oocytes.

2 Galantamine, at a concentration of 0.1 μM , increased the amplitude of acetylcholine (ACh)-induced ion currents in the human $\alpha 7$ nAChR expressed in *Xenopus* oocytes, but caused inhibition at higher concentrations. The maximum effect of galantamine, an increase of 22% in the amplitude of ACh-induced currents, was observed at a concentration of 250 μM ACh.

3 The same enhancing effect was obtained in oocytes transplanted with *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor (AChR) isolated from the electric organ, but in this case the optimal concentration of galantamine was 1 μM . In this case, the maximum effect of galantamine, an increase of 35% in the amplitude of ACh-induced currents, occurred at a concentration of 50 μM ACh.

4 Galantamine affects not only the activity of post-synaptic receptors but also the activity of nerve terminals. At a concentration of 1 μM , quantal spontaneous events, recorded in a cholinergic synapse, increased their amplitude, an effect which was independent of the anticholinesteratic activity associated with this compound. The anticholinesteratic effect was recorded in preparations treated with a galantamine concentration of 10 μM .

5 In conclusion, our results show that galantamine enhances human $\alpha 7$ neuronal nicotinic ACh receptor activity. It also enhances muscular AChRs and the size of spontaneous cholinergic synaptic events. However, only a very narrow range of galantamine concentrations can be used for enhancing effects.

British Journal of Pharmacology (2005) 145, 672–678. doi:10.1038/sj.bjp.0706221

Published online 18 April 2005

Keywords: Quantal synaptic transmission; miniature endplate potential; Alzheimer's disease

Abbreviations: ACh, acetylcholine; AChR, nicotinic acetylcholine receptor; MEPPs, spontaneous miniature endplate potentials; nAChR, neuronal nicotinic acetylcholine receptor

Introduction

Alzheimer's disease, the most common form of dementia, is linked to beta-amyloid protein metabolism; there is a progressive degeneration of basal forebrain cholinergic neurons innervating the hippocampus and the cortex. Although other neurotransmitters decline during Alzheimer's-associated neurodegeneration, the degree of brain acetylcholine (ACh) reduction directly correlates with deterioration of cognition and of daily activity in patients (Auld *et al.*, 2002).

Since deficits in cholinergic function contribute to the pathology of Alzheimer's disease, attempts to delay the progression of the illness and improve patients' daily activities are based on pharmacological strategies to increase ACh levels by means of anticholinesteratic agents (Giacobini, 2003).

Some anticholinesteratic drugs have serious side effects on patients because they do not only act specifically on the acetylcholinesterases, but also affect other ion channels such as potassium channels (Kraliz & Singh, 1997) and neurotransmitter-associated receptors such as GABA receptors (Li *et al.*, 1999). In recent years, our laboratory has been investigating the effect of various anticholinesteratic agents such as tacrine, physostigmine, bis-tacrine, huprine X, huprine Y and CI-1002 on embryonic muscle nicotinic-type receptors and on the spontaneous cholinergic synaptic activity of the *Torpedo* electric organ. Anticholinesteratic drugs increase the size and duration of spontaneous miniature endplate potentials (MEPPs), but inhibit the currents supported by the nicotinic receptors (Cantí *et al.*, 1994; 1998; Ros *et al.*, 2000; 2001a, b).

Recent studies have suggested that galantamine, another acetylcholinesterase inhibitor, has a beneficial effect on

*Author for correspondence; E-mail: solsona@ub.edu

Alzheimer's patients (Dale *et al.*, 2003) and improves learning deficits in rabbits (Woodruff-Pak *et al.*, 2001). In this study, we investigated its effects on spontaneous synaptic transmission, on the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor (AChR) and on the human $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR).

Methods

Animals and solutions

Torpedo marmorata specimens were caught off the Catalan Mediterranean coast and kept in artificial seawater. The fish were anaesthetised with tricaine (3-aminobenzoic acid ethyl ester methanesulphonate salt) (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.) at a concentration of 0.03% in seawater, before surgical excision of electric organs. Electric organ fragments were kept in the following saline solution: 280 mM NaCl, 3 mM KCl, 3.4 mM CaCl₂, 1.8 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 300 mM urea, 100 mM sucrose and 6.8 mM HEPES/NaOH buffer, pH adjusted to 7.0 with NaHCO₃. The same solution was used to record spontaneous synaptic activity.

Mature *Xenopus laevis* females (purchased from the Centre d'Élevage des Xenopes, Montpellier, France) were anaesthetised by immersion in water containing 0.17% tricaine. A few lobes of ovaries were removed through a small incision in the abdomen.

Solutions for Xenopus oocytes: Barth's solution contained 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 2.40 mM NaHCO₃ and 20 mM HEPES at pH 7.5, supplemented with 100 IU ml⁻¹ penicillin and 0.1 mg ml⁻¹ streptomycin.

Recording solution: 115 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂ and 10 mM HEPES at pH 7.4. None of the *Xenopus* female donors used in this study exhibited muscarinic ACh receptors in their oocytes. The bath solution maintains calcium at a physiologically relevant concentration because extracellular calcium is an important modulator of neuronal nAChR function (Mulle *et al.*, 1992; Vernino *et al.*, 1992). Calcium also has indirect effects on agonist-evoked responses *via* calcium-dependent chloride channels at this concentration. However, calcium-dependent effects produce only linear amplification of peak responses and do not distort the concentration–responses relationships over a wide range of agonist concentrations (Papke *et al.*, 1997).

Recording of spontaneous synaptic activity

All recordings were performed at room temperature (20–22°C). From five to 10 prisms of the electric organ were cut with a scalpel blade and 1–5 mm sections were incubated overnight in *Torpedo* saline solution containing galantamine, to ensure complete diffusion throughout the tissue. Fragments were fixed in a plexiglass chamber with a sylvard-coated base for measurement.

The spontaneous synaptic release of ACh was recorded with focal extracellular low-resistance microelectrodes (for details, see Dunant & Muller, 1986; Muller & Dunant, 1987), as described elsewhere (Canti *et al.*, 1994; Ros *et al.*, 2000; 2001a). This method allows long-term recording with little damage to the cells. MEPPs were amplified (Axoclamp-2A, Axon

Instruments, U.S.A.) and monitored on a Tektronix 5110 oscilloscope and on a PC-Computer with a LabView (National Instruments, U.S.A.) program (Quantadat) written in our laboratory, using an AT-MIO16X (National Instruments, U.S.A.) digitising interface. Signals were acquired at a frequency of 100 kHz and analysed with the same Labview program and the Whole Cell Analysis program (kindly provided by Professor J. Dempster, Strathclyde University, Scotland, U.K.) with a TL-1 Labmaster digitising interface. Data in ASCII format were exported to Sigmaplot 4.01.

The following parameters of each MEPP were measured: amplitude; rise time; rate or velocity of rising; the area corresponding to the charge that generated the MEPP, measured as the integral of the contour delimited by each one; and half-width, which indicates the rate of the decay phase (see Figure 4). Results were obtained from five separate experiments and represented in a bar histogram and cumulative plots (Van der Kloot, 1991), which compared all the variables under the different experimental conditions. The number of MEPPs analysed was 2741 for the control condition, 2501 for 1 μ M galantamine and 1133 for 10 μ M galantamine.

Expression of human $\alpha 7$ nAChR

A plasmid containing the full-length cDNA for human $\alpha 7$ nAChR was generously supplied by Professor Jon M. Lindstrom (Department of Neuroscience, University of Pennsylvania, U.S.A.). The plasmid (10 μ g) was linearised with *Xba*I (Promega) and the resulting product was used for mRNA synthesis *in vitro* using the mCAP RNA Capping Kit (Stratagene). The capped mRNA obtained was injected (50 nl, 1.5 μ g μ l⁻¹) into oocytes. At 12–24 h after injection, the follicular cell layer was partially removed by incubation for 30 min with 0.25 mg ml⁻¹ collagenase type 1A (Sigma). Oocytes were maintained at 15–16°C in sterile Barth's solution and recordings made 2–3 days later.

Transplantation of muscular ACh receptor to oocytes

Oocytes at stages V and VI (Dumont 1972) were dissected out and kept at 15–16°C in sterile Barth's solution. At 1 day before injection, the oocytes were treated with type-1A collagenase (Sigma) (0.5 mg ml⁻¹) for 45–50 min at room temperature to remove the surrounding layers (Miledi & Woodward, 1989).

Healthy oocytes were micro-injected with 50 nl of a thawed suspension (2–8 mg ml⁻¹) of electroplaque membranes (Marsal *et al.*, 1995; Cantí *et al.*, 1998; Ros *et al.*, 2000) by means of a nanolitre injector (World Precision Instruments, WPI, model A203XVZ). Samples were sonicated prior to injection.

Oocyte recording

Oocytes were voltage-clamped with a two-electrode system (Axoclamp-2A, Axon Instruments, U.S.A.). Intracellular electrodes (1–4 M Ω resistance) were filled with 3 M potassium chloride. The volume of the oocyte recording chamber was 200 μ l. Membrane currents were low-pass filtered at 10 Hz and recorded on a PC using Whole Cell Analysis program v. 2.1 after sampling signals by Lab PC+ (National Instruments, U.S.A.) at twice the filter frequency. In all recordings currents were elicited by challenges of ACh chloride at the indicated

concentrations, at a flow rate of 8 ml min^{-1} . Solutions were perfused by gravity and flow was activated or stopped by electrovalves (ALA Scientific, U.S.A.). All the oocytes were tested for consistent response amplitudes with at least three challenges of ACh prior to the application of the drug. Galantamine was co-applied with ACh for 25 s at least twice and only those responses that were constant were used for calculations. Moreover, after application of the drug, a new challenge of ACh was perfused to test that the current was still constant. Usually, the washout time between two applications of ACh was 10–15 min, to avoid desensitisation.

Galantamine purification

Galantamine was isolated from wild *Narcissus confusus* by a combination of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, as described elsewhere (López *et al.*, 2002).

Calculations and statistics

Differences between distribution functions were evaluated with Sigmaplot 3.2 software (SPSS Inc., U.S.A.) by the Mann–Whitney rank sum test. Values are expressed as mean \pm s.e.m. calculated by the program.

Results

Effect of galantamine on the human $\alpha 7$ nAChR

ACh ($500 \mu\text{M}$) induced an inward current in *Xenopus* oocytes expressing human $\alpha 7$ AChRs with a mean amplitude of $0.84 \pm 0.08 \mu\text{A}$, ($n = 9$; Figure 1a). The current was transient, with a decay time constant (τ) of $1.1 \pm 0.1 \text{ s}$. Higher concentrations of ACh did not cause any increase in current amplitude, but did increase the desensitisation of the receptor, which needed a longer period of washing before reproducing constantly the ACh response.

Co-application of 100 nM galantamine increased the amplitude of ACh-induced currents by $9.6 \pm 2.7\%$, $n = 9$ (Figure 1b and c); concentrations above or below this level had no significant effect. The time constant of current decay (τ) with 100 nM galantamine was $0.9 \pm 0.1 \text{ s}$. The concentration–response relationships for ACh in activating $\alpha 7$ nAChRs in the absence and presence of galantamine is shown in Figure 1d. In the presence of 100 nM galantamine, the EC_{50} was shifted from 305 to $189 \mu\text{M}$, $n = 9$. The maximum effect of galantamine, a 22% increase in the amplitude of ACh-induced currents, was observed at a concentration of $250 \mu\text{M}$ ACh.

Effect of galantamine on Torpedo AChR

In oocytes transplanted with *Torpedo* nicotinic receptors, a kind of embryonic muscular AChR, $100 \mu\text{M}$ ACh triggered an inward current of $0.27 \pm 0.12 \mu\text{A}$ ($n = 6$) that decayed with a time constant (τ) of $4.3 \pm 1.7 \text{ s}$ (Figure 2a). Galantamine also increased the response to ACh, but only at a concentration of $1 \mu\text{M}$ ($0.33 \pm 0.02 \mu\text{A}$, $n = 6$; Figure 2b and c). We also explored the concentration–response relationship for ACh. The curve obtained in the presence of galantamine $1 \mu\text{M}$ was shifted to the left (Figure 2d) and the EC_{50} moved from 79 to $46 \mu\text{M}$,

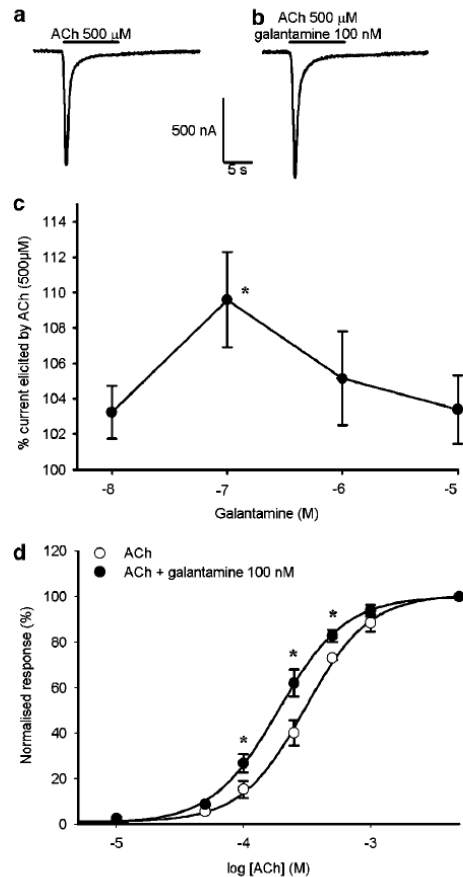


Figure 1 Effect of galantamine on ACh-induced currents supported by $\alpha 7$ AChRs expressed in *Xenopus* oocytes. (a) Fast inactivating inward currents were stimulated by ACh; holding potential was -70 mV . (b, c) Galantamine at very low concentration (100 nM) induced a very small but significant increase in the amplitude of ACh-activated currents. Higher concentrations did not cause a significant increase in currents. (d) Dose–response relationship for ACh obtained in the absence and presence of 100 nM galantamine. The averaged amplitudes (expressed as mean \pm s.e.) of the currents recorded from 10 oocytes from different donors were plotted versus the respective concentration of ACh applied. $*P < 0.05$.

$n = 6$. The maximum effect of galantamine, a 35% increase in the amplitude of currents, occurred at a concentration of $50 \mu\text{M}$ ACh.

Effect of galantamine on spontaneous synaptic activity of Torpedo electric organ

Figure 3a–c shows superimposed traces of MEPPs in *Torpedo* electric organ electroplates, under resting conditions and after the application of 1 and $10 \mu\text{M}$ galantamine. In fragments incubated with $10 \mu\text{M}$ galantamine, the decay phase was prolonged, as expected with anticholinesterasic agents. The effect of galantamine on MEPP frequency is shown in Figure 3d. The mean values were $1.58 \pm 0.31 \text{ MEPPs s}^{-1}$ for

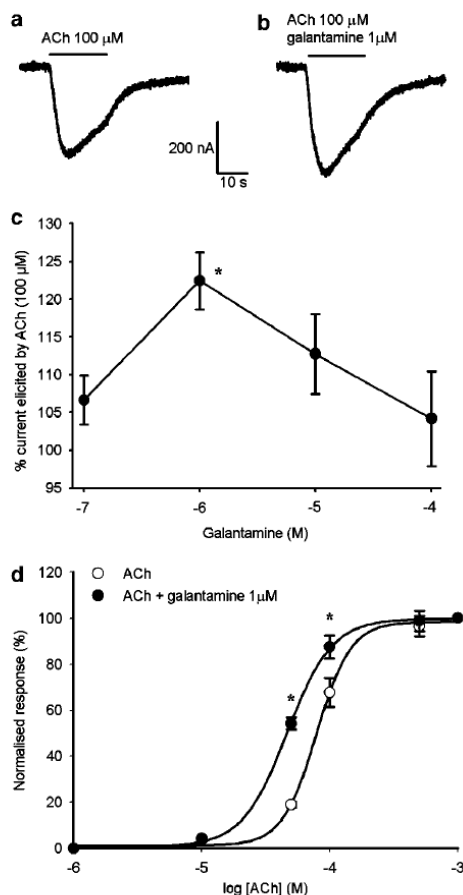


Figure 2 Effect of galantamine on ACh-induced currents supported by *Torpedo* AChRs from the electric organ. Membranes of the electric organ were transplanted to *Xenopus* oocytes. (a) Fast inactivating inward currents were stimulated by ACh; holding potential was -70 mV. (b,c) Galantamine at low concentration ($1 \mu\text{M}$) induced a significant increase in the amplitude of ACh-activated currents. Higher concentrations did not cause a significant increase in currents. (d) Dose–response relationship for ACh obtained in the absence and presence of $1 \mu\text{M}$ galantamine. The averaged amplitudes (expressed as mean \pm s.e.) of the currents recorded from eight oocytes from different donors were plotted versus the respective concentration of ACh applied. * $P < 0.05$.

untreated fragments and 1.41 ± 0.53 MEPPs s^{-1} for fragments incubated with $1 \mu\text{M}$ galantamine, $n = 12$. Galantamine caused no significant effect on MEPP frequency of the *Torpedo* electric organ.

The analysis of the traces is shown as cumulative plots and bar histograms in Figure 4. The area below the profile of each MEPP, reflecting the electrical charge carried during the release of a single quantum of ACh, was measured. The mean values were as follows: controls, 0.45 ± 0.006 mV ms^{-1} ; fragments treated with $1 \mu\text{M}$ galantamine, 0.83 ± 0.02 mV ms^{-1} ; fragments treated with $10 \mu\text{M}$ galantamine, 2.76 ± 0.09 mV ms^{-1} ($P < 0.05$).

Under control conditions, the amplitude of MEPPs was 0.54 ± 0.004 mV. In fragments treated with $1 \mu\text{M}$ galantamine,

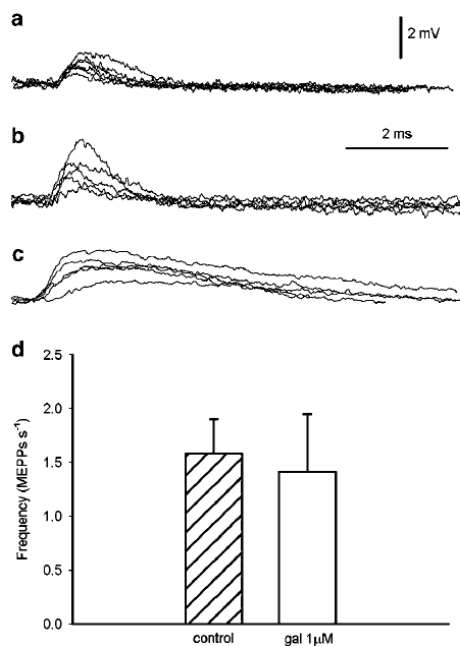


Figure 3 Effect of galantamine on spontaneous cholinergic synaptic activity of *Torpedo* electric organ. Low-resistance pipettes placed extracellularly were used for the focal recording of miniature endplate currents. Oscilloscope traces of spontaneous MEPPs were superimposed. (a) Untreated fragments. (b) $1 \mu\text{M}$ galantamine. (c) $10 \mu\text{M}$ Galantamine. The inhibition of acetylcholinesterase activity is translated into synaptic activity recording by the prolongation of the decay phase of spontaneous events, which was only observed when high concentrations of galantamine were used. (d) Effect of galantamine treatment on MEPP frequency.

the amplitude was increased to 0.83 ± 0.01 mV, $P < 0.05$. When the concentration of galantamine was increased to $10 \mu\text{M}$, the amplitude of MEPPs was 0.92 ± 0.01 , $P < 0.05$.

The rise time of a MEPP is the result of the addition of time periods from different cellular processes: the release and diffusion of ACh through the synaptic cleft and the opening time of the AChRs. The rise time was 0.48 ± 0.005 ms in the untreated fragments, 0.48 ± 0.05 ms in $1 \mu\text{M}$ galantamine-treated fragments and 0.8 ± 0.02 ms in those fragments treated with $10 \mu\text{M}$ galantamine. In this latter case, $P < 0.05$.

The rate of rise between 10 and 90% of the MEPP amplitude was 1.14 ± 0.01 mV ms^{-1} in untreated fragments, 1.62 ± 0.02 in $1 \mu\text{M}$ -treated fragments ($P < 0.05$) and 1.3 ± 0.08 in $10 \mu\text{M}$ -treated fragments.

The duration of width of an MEPP depends on the single or repetitive interaction of molecules of ACh with the AChR. The persistence of ACh molecules in the cleft, as a consequence of the inhibition of acetylcholinesterases, extends the decay phase of an MEPP. Since the decay phase of an MEPP fits an exponential function, it is therefore difficult to establish the final single quantal event. To compare the duration of quantal events in different pharmacological treatments, width at 50% of the amplitude was used. The half-width was 0.6 ± 0.006 ms in untreated fragments and 0.7 ± 0.008 ms in fragments treated with $1 \mu\text{M}$ galantamine, whereas it was 2.01 ± 0.04 ms in $10 \mu\text{M}$ -treated fragments ($P < 0.05$).

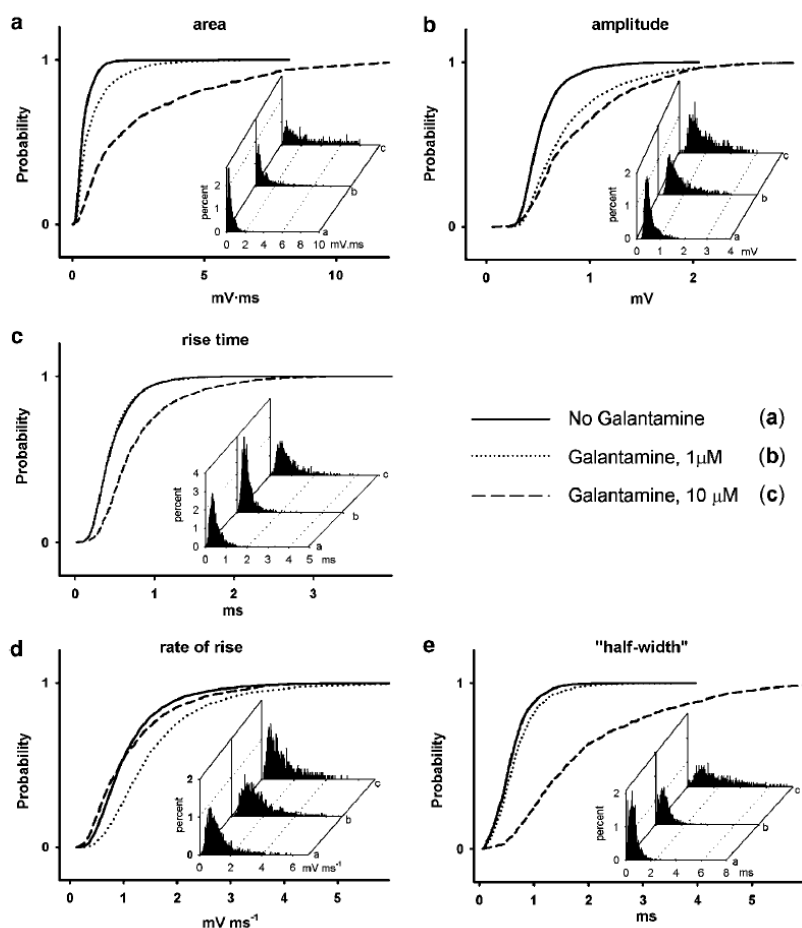


Figure 4 Analysis of MEPPs in 1 and 10 μM galantamine-treated fragments of *Torpedo* electric organ. Data are presented as cumulative plots and bar histograms (inset). (a) Electrical charge mobilised by spontaneous MEPP: effect of galantamine on electrical charge mobilised by spontaneous ACh release. The area delimited below a MEPP contour corresponds to the total electrical charge passed through the nicotinic ACh receptors as a consequence of spontaneous ACh release. (b) Effect of galantamine on the amplitude of MEPP (peak). (c) Rise time of MEPP. (d) Rate of rise time of MEPP. (e) half-width of MEPP, width at 50% of amplitude. Galantamine (10 μM) prolonged the decay phase of MEPPs. The number of MEPPs analysed for control conditions was 2741, 2501 for 1 μM galantamine and 1133 for 10 μM galantamine. The data shown came from three experiments.

Discussion

Since the cholinergic hypothesis for the onset of Alzheimer's disease (Davies & Maloney, 1976; Bartus *et al.*, 1982; Coyle *et al.*, 1983), various efforts have been made to increase the cerebral levels of ACh. The most obvious method was to use anticholinesterasic agents, but the side effects of these were very severe. Only some drugs were well tolerated by a small group of patients. In these cases, however, the cognitive deficiencies associated with the illness were delayed. It is likely that these side effects are related to the nonspecific interaction of anticholinesterasic agents with other membrane receptors and ion channels.

We tested the effect of various anticholinesterasic agents on the ionic currents conducted by *Torpedo* AChRs in earlier research (Cantú *et al.*, 1998; Ros *et al.*, 2000; 2001a, b). There is

a close correlation between the potency of inhibitory action of the anticholinesterasic agent and the degree of inhibition of muscular nicotinic currents.

Galantamine has been described as an anticholinesterasic agent, but it increases $\alpha 4\beta 2$ AChR-activated currents at concentrations between 10^{-7} and 10^{-6} M (Maelicke *et al.*, 2001), which are far from the IC_{50} (30 μM) for human brain acetylcholinesterase activity (Thomsen *et al.*, 1991). Nonetheless, galantamine at very low concentrations (10^{-7} M) increased the currents activated by the human $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptor. The galantamine-induced potentiation effect has been described in human $\alpha 4\beta 2$ nAChR (Maelicke *et al.*, 2001), human $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 6\beta 4$ nAChR (Samochocki *et al.*, 2003) as an allosteric potentiation. With single-channel recording configuration, galantamine alone activated the opening of the nAChR channel by acting as a weak

noncompetitive agonist in rat hippocampal cultured neurons (Pereira *et al.*, 1993) and mouse transfected fibroblasts (Pereira *et al.*, 1994). Similar results were obtained in frog skeletal muscle AChR with physostigmine at a concentration of 0.5 μM : this effect correlated with an increase of nerve-elicited endplate currents (Shaw *et al.*, 1985). Physostigmine and galantamine bind on a specific site of the α subunit, which is recognised by the monoclonal antibody FK1 (Pereira *et al.*, 1994).

However, we found no ionic current activated by galantamine alone in *Xenopus* oocytes expressing $\alpha 7$ nAChRs, perhaps because it sank into the amplifier noise. The concentration–response relationships for ACh, in the presence of galantamine, gave us direct evidence that galantamine was effective in enhancing the current amplitude at a range between 10^{-5} and 10^{-3} M ACh, which is the same range of concentrations previously described in $\alpha 4\beta 2$ receptors (Maelicke *et al.*, 2001) that also increased ACh-induced currents. The fact that we obtained significant results using high concentrations of ACh may reflect a physiological condition, because these concentrations of ACh may be closer to the concentration actually reached in the synaptic cleft.

The allosteric potentiating effect was specific for nAChR because galantamine did not enhance the cholinergic response mediated by muscarinic ACh receptors (Samochocki *et al.*, 2003). However, *Torpedo* nicotinic receptors (an embryonic receptor) were also sensitive to the effect of galantamine and, as shown in the present study, galantamine enhanced the currents mediated by ACh. However, the galantamine concentration needed for this enhancement was higher in the case of muscular receptor than in the $\alpha 7$ receptor. Galantamine is also an allosteric potentiator of muscular nicotinic receptors and should act as described in adult frog neuromuscular junction (Shaw *et al.*, 1985).

Both our results and those of others suggest that galantamine acts specifically on all AChRs, because it enhances cholinergic synaptic transmission in hippocampal slices (Santos *et al.*, 2002). $\alpha 7/5$ -HT3 chimeras of serotonin-ACh receptors are also sensitive to galantamine (Samochocki *et al.*, 2003). Probably, a conserved region in the different types of alpha subunit is related to activation activity (Pereira *et al.*, 1993). It is also possible that galantamine acts like lynx, an endogenous protein that enhances the currents activated by ACh in nicotinic receptors expressed in *Xenopus* oocytes (Miwa *et al.*, 1999). Moreover, it has been described that galantamine enhances nicotine-induced catecholamine release from mouse striatal brain slices (Zhang *et al.*, 2004) and from the hippocampus of freely moving rats (Sharp *et al.*, 2004).

We also explored the effect of galantamine on spontaneous synaptic activity. Galantamine did not change the frequency of MEPPs. Each MEPP is the result of the amount of ACh released during synaptic vesicle exocytosis, its diffusion, its interaction with the AChR and the enzymatic activity of the

acetylcholinesterases present in the synaptic cleft. Inhibition of acetylcholinesterases increases the amplitude and time course of a single miniature endplate potential. Our results clearly distinguish the effects related to anticholinesteratic activity (10 μM galantamine) from other more subtle effects observed at low galantamine concentration (1 μM). Galantamine at a concentration of 10 μM increased the amplitude, area, half-width and rise time of MEPPs; all of these effects are the consequence of anticholinesteratic activity. However, at concentrations with an increase in muscular nicotinic response (1 μM), we observed a significant increase in the amplitude, but no significant increase in the half-width of the miniature population. Apparently, galantamine increased the quantal size of individual spontaneous events. In principle, this could be due to an increase in the rate of ACh transport into the synaptic vesicle, an increase in the rate of synthesis or an increase in the rate of precursor transport. In other experimental conditions, such as IP₃ mobilisation (Brailoiu & Miyamoto, 2000) or the action of frog urotensin (Brailoiu *et al.*, 2003), an increase of quantal size has been reported. There are no reports in the literature of galantamine effects on presynaptic release machinery. It was recently suggested that exocytosis of neurotransmitters may be due to a very rapid and transient fusion of synaptic vesicles in the hippocampus (Aravanis *et al.*, 2003; Gandhi & Stevens, 2003). Galantamine may prolong the time during which the fusion pore connects the interior of the vesicle with the extracellular milieu. The effect of galantamine on quantal size may be due to the direct activation of nicotinic receptors (Maelicke *et al.*, 1997). Finally, we cannot rule out the possibility that galantamine activates all of these mechanisms.

In conclusion, our research demonstrates that galantamine has beneficial potentiation effects on nicotinic receptors only over a very narrow range of concentrations. Concentrations that approach IC₅₀ as an anticholinesteratic agent may increase the side effects in Alzheimer's disease patients. The low concentrations that enhance the nicotinic currents also increase the size of quanta, contributing to an increase in the levels of ACh, which may be related to an improvement in the daily life of patients. Our results reinforce the view that unconventional ligands on nAChR may benefit patients with impaired nAChR function (Pereira *et al.*, 2002).

We are grateful to Professor John Lindstrom from the Medical School of the University of Pennsylvania for his gift of a plasmid containing the human $\alpha 7$ nicotinic receptor cDNA and to Professor Joan Blasi for his helpful comments. This research project was supported by grants from the 'Ministerio de Ciencia y Tecnología' of the Spanish Government to CS, and from the FISS of the Instituto Carlos III to JM. LT is a fellow of the Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) at the Hospital of Bellvitge (Barcelona). We are also grateful to Professor Carles Codina, Faculty of Pharmacy, UB, for helpful comments on this work.

References

- ARAVANIS, A.M., PYLE, J.L. & TSIEN, R.W. (2003). Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature*, **423**, 643–647.
- AULD, D.S., KORNECOOK, T.J., BASTIANETTO, S. & QUIRION, R. (2002). Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.*, **68**, 209–245.
- BARTUS, R.T., DEAN III, R.L., BEER, B. & LIPPA, A.S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, **217**, 408–414.
- BRAILOIU, E. & MIYAMOTO, M.D. (2000). Inositol trisphosphate and cyclic adenosine diphosphate-ribose increase quantal transmitter release at frog motor nerve terminals: possible involvement of smooth endoplasmic reticulum. *Neuroscience*, **95**, 927–931.

- BRAILOIU, E., BRAILOIU, G.C., MIYAMOTO, M.D. & DUN, N.J. (2003). The vasoactive peptide urotensin II stimulates spontaneous release from frog motor nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.*, **138**, 1580–1588.
- CANTÍ, C., BODAS, E., MARSAL, J. & SOLSONA, C. (1998). Tacrine and physostigmine block nicotinic receptors in *Xenopus* oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes. *Eur. J. Pharmacol.*, **363**, 197–202.
- CANTÍ, C., MARTI, E., MARSAL, J. & SOLSONA, C. (1994). Tacrine-induced increase in the release of spontaneous high quantal content events in Torpedo electric organ. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 19–22.
- COYLE, J.T., PRICE, D.L. & DELONG, M.R. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of corticalcholinergic innervation. *Science*, **219**, 1184–1190.
- DALE, M.C., LIBRETTO, S.E., PATTERSON, C., ANDERSON, J., CHOUDHURY, T., MCCAFFERTY, F., MCWILLIAM, C. & RICHARDSON, M. (2003). Clinical experience of galantamine in dementia: a series of case reports. *Curr. Med. Res. Opin.*, **19**, 508–518.
- DAVIES, P. & MALONEY, A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, **2**, 1403.
- DUMONT, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.*, **136**, 153–179.
- DUNANT, Y. & MULLER, D. (1986). Quantal release of acetylcholine evoked by focal depolarization at the Torpedo nerve-electroplaque junction. *J. Physiol.*, **379**, 461–478.
- GANDHI, S.P. & STEVENS, C.F. (2003). Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature*, **423**, 607–613.
- GIACOBINI, E. (2003). Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **18**, 1–5.
- KRALIZ, D. & SINGH, S. (1997). Selective blockade of the delayed rectifier potassium current by tacrine in *Drosophila*. *J. Neurobiol.*, **32**, 1–10.
- LI, C.Y., WANG, H., XUE, H., CARLIER, P.R., HUI, K.M., PANG, Y.P., LI, Z.W. & HAN, Y.F. (1999). Bis(7)-tacrine, a novel dimeric AChE inhibitor, is a potent GABA(A) receptor antagonist. *Neuroreport*, **10**, 795–800.
- LÓPEZ, S., BASTIDA, J., VILADOMAT, F. & CODINA, C. (2002). Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of the five major alkaloids in *Narcissus confusus*. *Phytochem. Anal.*, **13**, 311–315.
- MAELICKE, A., COBAN, T., STORCH, A., SCHRATTENHOLZ, A., PEREIRA, E.F. & ALBUQUERQUE, E.X. (1997). Allosteric modulation of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor ion channel activity by noncompetitive agonists. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, **17**, 11–28.
- MAELICKE, A., SAMOCHOCKI, M., JOSTOCK, R., FEHRENBACHER, A., LUDWIG, J., ALBUQUERQUE, E.X. & ZERLIN, M. (2001). Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry*, **49**, 279–288.
- MARSAL, J., TIGYI, G. & MILEDI, R. (1995). Incorporation of acetylcholine receptors and Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 5224–5228.
- MILEDI, R. & WOODWARD, R.M. (1989). Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.*, **416**, 601–621.
- MIWA, J.M., IBANEZ-TALLON, I., CRABTREE, G.W., SANCHEZ, R., SALI, A., ROLE, L.W. & HEINTZ, N. (1999). lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron*, **23**, 105–114.
- MULLE, C., LENA, C. & CHANGEUX, J.P. (1992). Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron*, **8**, 937–945.
- MULLER, D. & DUNANT, Y. (1987). Spontaneous quantal and subquantal transmitter release at the Torpedo nerve-electroplaque junction. *Neuroscience*, **20**, 911–921.
- PAPKE, R.L., THINSCHMIDT, J.S., MOULTON, B.A., MEYER, E.M. & POIRIER, A. (1997). Activation and inhibition of rat neuronal nicotinic receptors by ABT-418. *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 429–438.
- PEREIRA, E.F., ALKONDON, M., REINHARDT, S., MAELICKE, A., PENG, X., LINDSTROM, J., WHITING, P. & ALBUQUERQUE, E.X. (1994). Physostigmine and galanthamine: probes for a novel binding site on the alpha 4 beta 2 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in fibroblast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 768–778.
- PEREIRA, E.F., HILMAS, C., SANTOS, M.D., ALKONDON, M., MAELICKE, A. & ALBUQUERQUE, E.X. (2002). Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *J. Neurobiol.*, **53**, 479–500.
- PEREIRA, E.F., REINHARDT-MAELICKE, S., SCHRATTENHOLZ, A., MAELICKE, A. & ALBUQUERQUE, E.X. (1993). Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **265**, 1474–1491.
- ROS, E., ALEU, J., GOMEZ, D.E., ARANDA, I., CANTI, C., PANG, Y.P., MARSAL, J. & SOLSONA, C. (2001a). Effects of bis(7)-tacrine on spontaneous synaptic activity and on the nicotinic ACh receptor of Torpedo electric organ. *J. Neurophysiol.*, **86**, 183–189.
- ROS, E., ALEU, J., GOMEZ, D.E., ARANDA, I., MUNOZ-TORRERO, D., CAMPS, P., BADIA, A., MARSAL, J. & SOLSONA, C. (2001b). The pharmacology of novel acetylcholinesterase inhibitors, (+/-)-huprines Y and X, on the Torpedo electric organ. *Eur. J. Pharmacol.*, **421**, 77–84.
- ROS, E., ALEU, J., MARSAL, J. & SOLSONA, C. (2000). Effects of CI-1002 and CI-1017 on spontaneous synaptic activity and on the nicotinic acetylcholine receptor of Torpedo electric organ. *Eur. J. Pharmacol.*, **390**, 7–13.
- SAMOCHOCKI, M., HOFFLE, A., FEHRENBACHER, A., JOSTOCK, R., LUDWIG, J., CHRISTNER, C., RADINA, M., ZERLIN, M., ULLMER, C., PEREIRA, E.F., LUBBERT, H., ALBUQUERQUE, E.X. & MAELICKE, A. (2003). Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 1024–1036.
- SANTOS, M.D., ALKONDON, M., PEREIRA, E.F., ARACAVA, Y., EISENBERG, H.M., MAELICKE, A. & ALBUQUERQUE, E.X. (2002). The nicotinic allosteric potentiating ligand galantamine facilitates synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Mol. Pharmacol.*, **61**, 1222–1234.
- SHARP, B.M., YATSULA, M. & FU, Y. (2004). Effects of galantamine, a nicotinic allosteric potentiating ligand, on nicotine-induced catecholamine release hippocampus and nucleus accumbens of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 1116–1123.
- SHAW, K.P., ARACAVA, Y., AKAIKE, A., DALY, J.W., RICKETT, D.L. & ALBUQUERQUE, E.X. (1985). The reversible cholinesterase inhibitor physostigmine has channel-blocking and agonist effects on the acetylcholine receptor-ion channel complex. *Mol. Pharmacol.*, **28**, 527–538.
- THOMSEN, T., KADEN, B., FISCHER, J.P., BICKEL, U., BARZ, H., GUSZTONY, G., CERVOS-NAVARRO, J. & KEWITZ, H. (1991). Inhibition of acetylcholinesterase activity in human brain tissue and erythrocytes by galanthamine, physostigmine and tacrine. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **29**, 487–492.
- VAN DER KLOOT, W. (1991). The regulation of quantal size. *Prog. Neurobiol.*, **36**, 93–130.
- VERNINO, S., AMADOR, M., LUETJE, C.W., PATRICK, J. & DANI, J.A. (1992). Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron*, **8**, 127–134.
- WOODRUFF-PAK, D.S., VOGEL III, R.W. & WENK, G.L. (2001). Galantamine: effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 2089–2094.
- ZHANG, L., ZHOU, F. & DANI, J.A. (2004). Cholinergic drugs for Alzheimer's disease enhance *in vitro* dopamine release. *Mol. Pharmacol.*, **66**, 538–544.

(Received November 29, 2004)

Revised February 22, 2005

Accepted March 8, 2005

Published online 18 April 2005

Aquest treball ha estat realitzat gràcies al suport del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2008/732), el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (PI020040) i la Fundació La Marató de TV3 (07/MAR001).



