

Universitat de Lleida

**Mecanismes patogènics en
l'Esclerosi Lateral Amiotròfica
humana i experimental**

**Tesi presentada per:
Sara Hernández i Estanyol**

**Per optar al títol de Doctora en Biologia per la
Universitat de Lleida**

**Sota la direcció de:
Dr. Josep E. Esquerda Colell
Dra. Anna Casanovas Llorens**

Informe sobre la Tesi Doctoral "Mecanismes patogènics en l'Esclerosi Lateral Amiotròfica humana i experimental".

Realitzada per Sara Hernandez i Estanyol per tal d'accedir al grau de Doctora en Biologia.

Dirigida pel Dr. Josep Enric Esquerda Colell, Catedràtic de Biologia Cel·lular del Departament de Medicina Experimental, Universitat de Lleida i per la **Dra. Anna Casanovas Llorens**, professora titular d'Anatomia del Departament de Medicina Experimental, Universitat de Lleida.

L'objectiu d'aquest treball ha estat investigar alguns mecanismes fisiopatològics que considerem rellevants en el context de l'Esclerosi Lateral Amiotròfica.

S'han identificat nous anticossos neurals a partir immunoglobulines circulants en malalts d'ELA i d'altres malalties de la Motoneurona (MN). S'ha detectat la unió de les IgG a proteïnes del sistema nerviós de l'embrió de pollastre i s'ha identificat com a antigen una proteïna implicada en la regulació i la quimiotaxis del sistema nerviós embrionari, la Semaforina.

Utilitzant un animal transgènic sobreexpressor de la SOD1 humana mutada com a model de la malaltia, s'ha estudiat i caracteritzat la immunoreactivitat per un anticòs anti P2X₄. S'ha demostrat que aquest reconeix selectivament les neurones afectades pel procés degeneratiu de la ELA que són diana per l'activitat neuronofàgica microglia. Aquesta propietat és deguda a una immunoreactivitat creuada en formes mal plegades de la proteïna SOD1, formes que es van acumulant a mesura que la malaltia avança i que la neurona degenera.

Per últim s'ha estudiat l'efecte de la transfecció de diferents mutacions de SOD1 en la línia cel·lular NSC-34 i la resposta al tractament amb liti. S'ha pogut comprovar l'efecte activador d'autofàgia i de disminució d'agregats de SOD1 dins la cèl·lula per part del tractament amb liti.

Metodològicament, per la realització d'aquests estudis s'han utilitzat procediments *in vivo* i *in vitro* que inclouen, entre d'altres, tècniques de: biologia molecular, cultiu cel·lular, immunohistoquímica, microscòpia òptica i electrònica, western blot, electroforesis bidimensional, MALDI-TOF, immunoprecipitació, immunoaïllament, fraccionament cel·lular, ELISAs i estereotàxia.

Els objectius inicialment plantejats han quedat plenament assolits, i tant la temàtica com la metodologia utilitzada i els resultats obtinguts fan que la Tesi presentada compleixi els requisits necessaris per a ser defensada per la candidata per tal d'accedir al grau de Doctora en Biologia.

Lleida, 20 d'octubre de 2009

Josep E. Esquerda Colell
Catedràtic de Biologia Cel·lular
Dept. de Medicina Experimental
Universitat de Lleida

Anna Casanovas Llorens
Professora titular d'Anatomia
Dept. de Medicina Experimental
Universitat de Lleida

ÍNDEX

ÍNDEX

ABREVIATURES.....	1
RESUM.....	5
0. OBJECTIUS.....	13
1. INTRODUCCIÓ.....	17
1.1 Descripció Esclerosi Lateral Amiotròfica.....	19
1.2 Història.....	20
1.3 Degeneració Selectiva de Motoneurons.....	22
1.4 Mecanismes etiopatogènics.....	22
1.4.1 Receptors de glutamat, excitotoxicitat i ELA	
1.4.2 Mutacions de la SOD1	
1.4.3 Altres mutacions	
1.4.4 Neuroinflamació	
1.4.5 Autoimmunitat	
1.4.6 Citoesquelet i fosforilació de proteïnes	
1.4.7 Estrès oxidatiu	
1.4.8 Autofàgia	
1.5 Models animals.....	44
1.5.1 Ratolins expressors de la hSOD1 mutada	
1.5.2 Ratolins amb alteracions als filaments intermediaris	
1.5.3 Ratolins amb defectes en el transport de microtúbuls	
1.5.4 Ratolins knockout per ALS2	
1.5.5 Ratolins amb alteracions en l'element de resposta a la hipòxia	
1.6 Els receptors purinèrgics.	49
1.6.1 P2X ₄	
1.7 Perspectives terapèutiques.....	53
1.7.1 Fàrmacs	
1.7.2 Factors neurotròfics i teràpia gènica	
1.7.3 Teràpia gènica	
1.7.4 Cèl·lules mare	
1.7.5 Immunoteràpia	
1.8 Semaforines.....	60

2. MATERIAL I MÈTODES.....	63
2.0 Animals i anestèsia.....	65
2.1 Preparació dels sèrums.....	65
2.1.1 Separació d'Immunoglobulines G dels sèrums	
2.2 Tractament dels embrions.....	66
2.3 Recompte de MNs.....	67
2.4 Visualització de la innervació intramuscular en whole mount.....	68
2.5 Tècniques proteòmiques.....	68
2.5.1 Fraccionament cel·lular	
2.5.2 Immunoprecipitació de la fracció citosòlica	
2.5.3 Cromatografia d'afinitat de la fracció citosòlica	
2.5.4 Immunoaïllament de la fracció membranosa	
2.5.5 Electroforesis unidimensional i Western Blot	
2.5.6 Electroforesis bidimensional	
2.5.7 Tècniques d'espectrometria de masses-MALDI TOF	
2.5.8 Desnaturalització i immunoprecipitació de hSOD1 in vitro	
2.6 Tècniques Immunohistoquímiques.....	76
2.6.1 Tècniques Immunohistoquímiques	
2.6.2 Tècniques Immunocitoquímiques per fluorescència de cèl·lules en cultiu	
2.6.3 Tècniques Immunohistoquímiques- Free Floating	
2.7 Tècniques de Biologia Molecular.....	79
2.7.1. Plàsmids	
2.7.2 Transformació de <i>E. Coli</i>	
2.7.3 Purificació del DNA del plàsmid recombinant (mini-prep)	
2.7.4 Purificació del DNA del plàsmid recombinant (midi-prep)	
2.7.5 Transfecció del DNA	
2.7.6 Purificació de la Semaforina recombinant	
2.7.7 Tractament i recompte de cèl·lules NSC-34	
2.8 ELISAs.....	84
2.9 Cultiu de DRG i assaig de colapse.....	85
2.10 Microscòpia electrònica.....	85
2.11 Estereotàxia.....	87
2.12 Detecció de Calci per Fura2.....	87

3. RESULTATS.....	89
3.1. Efecte de sèrums patològics en models de desenvolupament neuronal.....	91
3.1.1 Efecte dosi-resposta en el nombre de MNs per efecte de l'administració de sèrums	
3.1.2 Efecte de l'administració d'Immunoglobulines G (IgG) de sèrums en el nombre de MNs	
3.1.3 Efecte de l'administració dels sèrums en la ramificació nerviosa intramuscular.	
3.2. Determinació de la presència d'anticossos circulants en sèrums patològics.....	99
3.2.1 Unió d'anticossos circulants a proteïnes dels sistema nerviós	
3.2.2 Identificació dels antígens reconeguts pels anticossos circulants per espectrometria de masses.	
3.2.3 Efecte de la injecció d'anticòs anti-Sema3A sobre la supervivència de MNs d'embrions de pollastre.	
3.2.4 Producció i purificació de proteïna Semaforina recombinant en cèl·lules COS7	
3.2.5 Unió dels anticossos circulants de sèrums patològics a proteïna Sema3A. ELISAs	
3.2.6 Assaig de colapse de conus de creixement amb Semaforina i la seva inhibició per part de sèrums patològics	
3.2.7 Unió dels anticossos circulants de sèrums de ratolins transgènics SOD1 ^{G93A} a proteïnes del sistema nerviós de pollastre.	
3.3. Reactivitat de l'anticòs anti-P2X₄ en el model de rata transgènica SOD1^{G93A}	112
3.3.1 Expressió de P2X en el model de rata transgènica mSOD1 ^{G93A}	
3.3.2 Immunoreactivitat de l'anticòs anti-P2X ₄ associada a MNs degenerades en el model de rata transgènica mSOD1 ^{G93A}	
3.3.3 Localització ultraestructural del marcatge de P2X ₄	
3.3.4 Localització del marcatge de P2X ₄ en la unió neuromuscular	
3.3.5 Immunoreactivitat de l'anticòs anti-P2X ₄ associada a MNs degenerades a còrtex cerebral i tronc de l'encèfal en el model de rata transgènica mSOD1 ^{G93A}	
3.3.6 Immunoreactivitat de l'anticòs anti-P2X ₄ associada a una afectació de les cèl·lules cerebelars de Purkinje	

- 3.3.7 Especificitat de l'anticòs anti P2X₄ en el reconeixement de la proteïna P2X₄ en el model de rata transgènica hSOD1^{G93A}
- 3.3.8 Identificació de les proteïnes reconegudes per l'anticòs anti P2X₄
- 3.3.9 Especificitat del reconeixement de l'anticòs anti P2X₄ de formes malplegades de la proteïna SOD1
- 3.3.10 Associació de les formes malplegades de SOD1 amb xaperones.
- 3.3.11 Absència de reconeixement de l'anticòs anti-P2X₄ de formes de SOD1 en ratolí transgènic per la SOD1^{WT}
- 3.3.12 Estereotàxia

3.4 Caracterització de la línia cel·lular NSC-34 i la seva transfecció amb hSOD1 mutada.....140

- 3.4.1 Expressió de P2X₄ en el model de línia cel·lular NSC-34
- 3.4.2 Efecte de liti en la presència d'agregats de SOD1 en cèl·lules transfectades NSC-34

4. DISCUSSIÓ..... 151

5. CONCLUSIONS..... 167

6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES..... 171

7. ANNEX 217

ABREVIATURES

ABREVIATURES

2D	bidimensional
α -CHCA	àcid α -cyano-4-hidroxycinnamic
ABC	amonium bicarbonat
AChR	receptor d'acetilcolina
ALS	esclerosi lateral amiotròfica
AMPA	àcid α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionàtic
B	fracció boles Sepharosa
BSA	albúmina sèrica bovina
C	control
CDK	cyclin-dependent protein kinases
CHAPS	3-[(3-cholamidopropil)dimetil-amoni]1-propasulfonat
COX	ciclooxigenasa
Cr	cromogranina
CSL	líquid cefalo-raquidi
Da	Dalton
DAPI	4, 6-diamino-2 fenilindol-diclorhidrat
DR	arrel dorsal
DTT	ditiotreitòl
E	dia embrionari
EAAT	excitatory amino acid transporter
EDL	extensor digitorum longus
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic
ELA	esclerosi lateral amiotròfica
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPL	esclerosi lateral primària
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HCl	àcid clorhídric
IAA	iodoacetamida
IB	immunoblotting
IEF	isoelectroenfoc
IFIB	múscul iliofibularis
Ig	immunoglobulina
IP	immunoprecipitació
LB	medi Luria-Bertoni
LMC	columna lateral motora
LMD	lower motoneuron disease

mA	mil·liamper
MALDI-TOF	matrix assistant laser disruption ionisation-time of flight
MN	Motoneurona
Mw	pes molecular
NaCl	clorur sòdic
NGS	normal goat serum
MMDA	N-metil D-aspàrtic
NO	òxid nítric
OD	densitat òptica
P	post natal
P2'	fracció membranosa neta
PA	fosfatasa alcalina
PAGE	electroforesi gel poliacrilamida
PB	tampó fosfat
PBP	paràlisis bulbar progressiva
PBS	tampó fosfat sòdic
PC	cèl·lules de Purkinje cerebel·lars
PCD	mort cel·lular programada
PDI	fosfo-di-Isomerasa
Protocol ABC	avidin-biotin chemistry
ROS	reactive oxygen species
RT	temperatura ambient
S	fracció citosòlica
SDS	sodium dodecil sulfat
Sema	semaforina
SMA	Atròfia muscular espinal
SN	sobrenedant
SOD	super-òxid dismutasa
Syn	sinaptofisina
T	transgènic
TAE	tris-acetat sòdic-EDTA
TBST	tampó tris-SDS-tween
TH	tirosina hidroxilasa
TNF	factor de necrosi tumoral
VR	banya ventral
WB	western blot
WT	wild-type

RESUM

RESUM

En aquest estudi s'ha treballat amb diferents hipòtesis que avui en dia es consideren per explicar les causes de l'Esclerosi Lateral Amiotròfica.

En primer lloc, s'ha estudiat la autoimmunitat utilitzant immunoglobulines sèriques (IgG) provinents de malalts d'ELA i d'altres malalties de la Motoneurona (MN). Tractant embrions de pollastre amb sèrums i IgG de pacients afectats per ELA s'obté un rescat significatiu en el nombre de MN de la banya ventral de la medul·la espinal lumbar que d'altra manera morien per un procés de mort cel·lular programada per apoptosi i un augment significatiu de la ramificació nerviosa en la musculatura inervada per aquestes MN. S'ha detectat la unió de les IgG a proteïnes del sistema nerviós de l'embrió de pollastre i s'ha identificat com a antígen una proteïna implicada en la regulació i la quimiotaxis del sistema nerviós embrionari, la Semaforina. No sabem, per ara, la significació d'aquests autoanticossos anti Sema 3A circulants en els pacients de malalts d'ELA ni la seva relació amb la patogènia de la malaltia.

En segon lloc, s'ha treballat amb l'aspecte genètic de la malaltia. Utilitzant rosegadors transgènics amb una mutació en el gen de la SOD1 s'ha comprovat que diferents tipus de cèl·lules nervioses d'animals transgènics en estadis avançats de la malaltia mostren reactivitat cap a l'anticòs anti P2X₄. A part de la reactivitat mostrada en MNs degenerades al còrtex cerebral i tronc de l'encèfal d'animals transgènics, fet que concorda amb l'afectació clàssica descrita en la ELA, s'ha vist també reactivitat a cèl·lules de Purkinje cerebelars.

Posteriorment s'ha comprovat que aquesta reactivitat és deguda a un reconeixement per part d'aquest anticòs de formes mal plegades de la proteïna SOD1, formes que es van acumulant a mesura que la malaltia avança i que la neurona degenera. Aquestes formes mal plegades són exclusives de la proteïna mutada, no existint reconeixement en formes salvatges de la proteïna.

Aïllant aquestes formes malplegades de SOD1 s'ha comprovat que són capaces de d'activar la microglia *in vivo* en nivells significativament superiors que la proteïna SOD1 nativa.

Per últim, s'ha estudiat l'efecte de la transfecció amb proteïna SOD1 mutada i fenòmens autofàgics dins del model de línia cel·lular neuronal NSC-34. Tot i que s'ha comprovat que en aquest model no es repeteixen els resultats obtinguts per l'anticòs anti P2X₄ en models de rosegadors transgènics, s'ha pogut estudiar l'autofàgia i l'efecte beneficiós del liti en aquest model, veient-se que el liti és capaç de disminuir el nombre d'agregats de SOD1 en aquest model quan les cèl·lules són transfectades amb diferents tipus de SOD1 mutada.

En este estudio se han investigado diferentes aspectos que hoy en día se consideran relevantes en el contexto de la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

En primer lugar, se han estudiado la presencia de anticuerpos neurales en inmunoglobulinas circulantes (IgG) en enfermos d'ELA y otras enfermedades de la Motoneurona (MN). Tratando embriones de pollo con sueros y IgG de pacientes afectados d'ELA se obtiene un rescate significativo en el número de MN del asta ventral de la médula espinal lumbar que de otra manera morirían por un proceso de muerte celular programada por apoptosis y un aumento significativo de la ramificación nerviosa en la musculatura inervada por estas MN. Se ha detectado la unión de las IgG a proteínas del sistema nervioso del embrión de pollo y se ha identificado como antígeno una proteína implicada en la regulación y la quimiotaxis del sistema nervioso embrionario, la Semaforina. No sabemos, por ahora, la significación de estos autoanticuerpos anti Semaforina circulantes en los pacientes d'ELA ni su relación con la patogènia de la enfermedad.

En segundo lugar, se ha utilizado un animal transgènico como modelo de la enfermedad. Utilizando roedores sobreexpresores del gen de la SOD1 con la mutación G93A se ha comprobado que diferentes tipos de células nerviosas de animales transgènicos en estadios avanzados de la enfermedad muestran reactividad hacia el anticuerpo anti P2X₄. A parte de la reactividad mostrada en MNs degeneradas en el córtex cerebral, tronco del encéfalo y médula espinal de animales transgènicos, hecho que concuerda con la afectación clásica descrita en la ELA, se ha visto también reactividad en células de Purkinje cerebelares.

Posteriormente se ha comprobado que esta reactividad se debe a un reconocimiento por parte de este anticuerpo de formas mal plegadas de la proteína SOD1, formas que se van acumulando a medida que la enfermedad avanza y que la neurona degenera. Estas formas mal plegadas son exclusivas de la proteína mutada, no existiendo reconocimiento en formas salvajes de la proteína.

Aislado estas formas mal plegadas de SOD1 se ha comprobado que son capaces de activar la microglia *in vivo* en niveles significativamente superiores que la proteína SOD1 nativa.

Por último, se ha estudiado el efecto de la transfección con proteína SOD1 mutada y fenómenos autofágicos en el modelo de línea celular neuronal NSC-34. Aunque se ha comprobado que en este modelo no se repiten los resultados obtenidos por el anticuerpo anti P2X₄ en modelos de roedores transgènicos, se ha podido estudiar la autofagia y el efecto beneficioso del litio en este modelo, viéndose que el litio es capaz de disminuir el número de agregados de SOD1 en este modelo cuando las células son transfectadas con diferentes tipos de SOD1 mutada.

We have studied the presence of circulating antibodies against neural antigens in sera from ALS and other motorneuron disease patients. As an any system, to evaluate a presumable neurotoxic action on spinal cord motoneurons, either whole sera or isolated immunoglobulins were injected "in ovo" in chicken embryos during the major period of developmental Motorneuron (MN) death (E6-9). A moderate but significant rescue of MNs from normal cell death was observed after application of patients sera or immunoglobulins. It was found that, concomitant with promotion of MN survival, a significant increase in the intramuscular nerve branching was produced suggesting that the excess of MNs is a consequence of its better access to muscle-derived neurotrophic factors. In order to identify the molecular target of this effect, the binding of ALS IgGs to chick embryo neural proteins was analyzed. We have identified that semaphorins were recognized by ALS immunoglobulins. This result is congruent with the "in vivo" effects that we have detected with patients Igs since this family of proteins is involved in axonal guidance and quimiotaxis in embrionic nervous system.

We have also addressed the study of MN degeneration in transgenic rodents overexpressing mutated human superoxide dismutase 1 (SOD1^{G93A}) as a model of human ALS. We have showed that an antibody against P2X₄ is able to detect selectively degenerating MNs in spinal cord and brain stem and also in cerebral and cerebellar còrtex (Punkinje cells). P2X₄-immunoreactive is destroyed by recruitment of neuronophagic microglial cells. Later, we have proved that P2X₄ antibody recognizes a form of misfolded mutant SOD1^{G93A} which is only expressed in neuronal cells undergoing degeneration. Wild type SOD1 is not recognized by P2X₄ antibody.

Finally, by means of a cellular ALS model in which NSC-34 cells were transfected with vectors expressing several SOD1 mutations, we have studied the effects of the autophagy on the clearance of mutated SOD1 aggregates. We have showed that lithium-induced autophagy results in a reduced of mutant SOD1 aggregates.

0. OBJECTIUS

0. OBJECTIUS

La Esclerosi Lateral Amiotròfica (ELA) és una malaltia neurodegenerativa crònica que afecta les neurones motores (MN) de la banya ventral de la medul·la espinal, del còrtex cerebral i del tronc de l'encèfal. Malgrat que els factors que la determinen són encara desconeguts, hi ha diverses hipòtesis patogèniques, no excloents entre elles, que intenten donar una explicació al seu origen.

En aquest treball s'han estudiat diferents aspectes implicats en la patogènia de la ELA. En primer lloc, s'ha estudiat la presència d'autoanticossos circulants en pacients d'ELA. La possibilitat que un mecanisme autoimmune estigui relacionat amb la patogènia de la ELA ha estat considerat fa molt temps, però les evidències que li donarien suport fins ara no han estat concloents. Tot i haver-se trobat evidències de presència de diferents tipus d'autoanticossos en malalts d'ELA, tampoc s'han trobat moltes de les característiques de les malalties autoimmunitàries. En segon lloc, s'ha utilitzat com a model d'ELA animals transgènics sobreexpressors d'una mutació en el gen de la SOD1 present en formes familiars d'ELA humana. En aquests models (rata i ratolí) s'han fet estudis neuropatològics per determinar mecanismes de degeneració i mort neuronal en aquesta malaltia. Per últim, s'ha volgut estudiar la patogènia de la malaltia en models *in vitro*, utilitzant una línia cel·lular neuronal per analitzar la implicació de l'autofàgia en la dissolució dels agregats neurotòxics de SOD1.

Així, els objectius d'aquest treball són:

A. Estudi de factors sèrics en pacients d'ELA:

1. Avaluar l'efecte de sèrums de pacients d'ELA i d'altres malalties neurodegeneratives en MNs embrionàries.
2. Detectar la possible presència d'autoanticossos circulants en pacients d'ELA.
3. Identificar els antígens reconeguts per aquests amb tècniques proteòmiques.
4. Investigar el significat biològic de la presència dels autoanticossos circulants.

B. Estudi de la neurodegeneració en rosegadors transgènics SOD1^{G93A}:

5. Estudiar l'expressió dels receptors purinèrgics P2X en els teixits afectats per la ELA.
6. Determinar neuroanatòmicament la immunoreactivitat a P2X₄ durant l'evolució de la malaltia en el model experimental.
7. Estudiar la relació entre la immunoreactivitat a P2X₄ i l'activació glial.
8. Identificar mitjançant tècniques proteòmiques les proteïnes reconegudes per l'anticòs anti P2X₄.
9. Estudiar la implicació fisiopatològica de la reactivitat de l'anticòs anti P2X₄ en formes mutades de SOD1 identificades en models experimentals.

C. Estudi de l'efecte de la transfecció amb SOD1 mutada en la línia cel·lular neuronal NSC-34.

10. Caracteritzar l'efecte de la transfecció amb formes mutades de SOD1 en cèl·lules NSC-34.
11. Estudiar l'efecte del tractament amb liti en els agregats de SOD1 presents en aquestes cèl·lules.
12. Avaluar la presència de fenòmens autofàgics presents després de la transfecció de les cèl·lules amb formes mutades de SOD1.

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Descripció de l'Esclerosi Lateral Amiotròfica.

L'esclerosi lateral amiotròfica (ELA o amyotrophic lateral sclerosis, ALS) és una malaltia degenerativa que afecta selectivament les neurones que constitueixen el sistema motor voluntari. Aquestes cèl·lules són anomenades també Motoneurons (MNs). Les MNs es troben en el còrtex cerebral, en el tronc de l'encèfal i en la banya anterior de la medul·la espinal. En l'ELA, la pèrdua irremediable i continua de les MNs determina uns símptomes característics, com són l'aparició de debilitat i Atròfia muscular progressiva acompanyada d'una exaltació dels reflexes tendinosos. S'acaba arribant a una paràlisi que, finalment, condueix a la mort, molt sovint causada per problemes de caràcter respiratori, generalment de 2 a 5 anys després de l'aparició dels primers símptomes (Rowland *et al.*, 2001). Les funcions cerebrals no vinculades a l'activitat motora, com la sensibilitat, la intel·ligència o la consciència estan normalment preservades fins les etapes finals del procés patològic.

Aquesta malaltia afecta principalment a individus d'edat mitja-avançada, entre 40 i 70 anys, i és més freqüent en homes (Kurtzke, 1991). La incidència és de 2 casos nous per cada any i per cada 100.000 habitants. Considerant la incidència referida solament a un marge d'edat comprès entre els 60 y 69 anys, la xifra arriba al valor de 15 casos per any i per 100.000 habitants, cosa que indica que l'envelliment de la població comporta un increment significatiu de casos (Cleveland and Rothstein 2001).

La terminologia amb què la malaltia es designa fa referència a dos aspectes clínico-patològics característics. D'una part l'esclerosi lateral i de l'altra, la amiotròfia. El terme esclerosi lateral es refereix al fet anatomopatològic que consisteix en una pèrdua de fibres nervioses acompanyada d'una cicatrizació glial o esclerosi en la regió lateral de la medul·la espinal. Aquesta zona de la substància blanca medular o cordó lateral està normalment ocupada per gran part de les fibres nervioses o axons motors que, procedents de les àrees motores del còrtex cerebral, connectaran amb les MNs de la banya anterior de la medul·la que, alhora, enviaran els axons als músculs. Els axons del cordó lateral formen una part de la denominada via corticoespinal o piramidal, que controla els moviments voluntaris. La pèrdua selectiva d'aquests axons en el cordó lateral determina la esclerosi lateral com lesió anatomopatològica. Fischer *et al.* (2004) van presentar l'evidència que el dany en estructures perifèriques és més extens que en estructures centrals en pacients diagnosticats amb ELA esporàdica que morien prematurament (dying back).

D'altra banda, la amiotròfia fa referència a un fet clínic tan evident com que l'atròfia muscular es produeix com a conseqüència de que els músculs estan inactius 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 a la banya anterior de la medulla espinal, cosa que condueix a una pèrdua dels controls inhibitoris de la primera neurona sobre la segona. Això es tradueix clínicament en una exaltació dels reflexes tendinosos i en l'espasticitat pròpia de la ELA. La debilitat generalitzada, Atròfia muscular i la paràlisi són manifestacions de l'afectació de la segona MN.

Actualment hi ha autors que prefereixen anomenar la ELA com una forma particular de la Malaltia de la MN, que ahora englobaria també altres patologies de les neurones motores. Com a exemple d'una altra forma de Malaltia de la MN trobem el cas de la illa de Guam (Pacífic Oest) (Koerner, 1952), on una patologia de la neurona motora, associada també a Malaltia de Parkinson i demència, apareix de forma endèmica i associada a la ingestió d'una toxina present en alguns aliments propis de la cultura nativa. Altres exemples de diferents patologies de la Malaltia de la MN són la Lower Motoneuron Disease (LMD) Esclerosi Lateral Primària (ELP) en la que s'afecten exclusivament les MNs centrals (cerebrals), la Malaltia de Kennedy (Atròfia Muscular Progressiva Espinobulbar, lligada al cromosoma X) o l'Atròfia Muscular Espinal (SMA) amb les seves variants juvenil i infantil. Aquesta és una malaltia neurodegenerativa autosòmica recessiva deguda a la carència de la proteïna SMN (Survival Motor Neuron) causada per la pèrdua o mutació del gen SMN1. En humans existeix una segona copia del gen, SMN2, que produeix la proteïna SMN truncada. La severitat dels símptomes de la malaltia depenen del nombre de còpies de SMN2 (Umrao *et al.*, 2005).

Als Estats Units d'Amèrica, la ELA sovint s'anomena la malaltia de Lou Gehrig, que fou un famós jugador de beisbol que va morir d'ELA al 1939. Altres celebritats que han estat víctimes de la malaltia són l'actor David Niven, el gran músic i compositor Dimitri Shostakovich o el dirigent polític xinès Mao Zedong. El prestigiós físic Stephen Hawking pateix, encara actualment, una forma inhabitualment llarga d'ELA.

1.2. Història

L'Esclerosi Lateral Amiotròfica fou descrita per primera vegada a l'any 1869 pel neuròleg francès Jean-Martin Charcot en un article escrit amb Joffroy, on el síndrome clínic de paràlisi i Atròfia muscular progressiva es relacionava amb pèrdua neuronal en els nuclis motors, a més d'una lesió en els fascicles

anterolaterals de la medul·la. Fent referència a aquests canvis patològics, Charcot va proposar el nom d'Esclerosi Lateral Amiotròfica, ELA, per anomenar la malaltia. D'altra banda, també cal dir que 20 anys enrere un altre neuròleg francès, Aran, havia ja descrit 11 casos d'ELA amb el nom d'Atròfia Muscular Progressiva. Un d'aquests casos era de caràcter familiar.

El nombre de publicacions referides a ELA en revistes especialitzades ha experimentat un elevat augment des de que, al 1993, Rosen va demostrar que en un 10% dels casos d'ELA familiar, les alteracions genètiques es localitzaven en el gen que codifica per l'enzim coure-zinc superòxid-dismutasa (SOD1), iniciant-se així una nova etapa en la investigació sobre la ELA.

Avui en dia s'han identificat més de 100 mutacions en pacients d'ELA familiar (Sapp *et al.*, 2003, Nishimura *et al.*, 2004a, 2004b). Només amb una excepció (SOD1 D90A) totes les mutacions provoquen una malaltia hereditària dominant (Andersen *et al.*, 1995, 1996).

Una de les conseqüències d'aquests descobriments va ser el fet de poder disposar d'animals modificats genèticament en els quals se'ls va introduir el gen humà mutat (Gurney, 1997). Aquests animals pateixen una malaltia neuromuscular totalment comparable a la ELA humana. Els animals transgènics constitueixen actualment un dels pilars fonamentals de la investigació sobre ELA, facilitant l'assaig de nous agents potencialment terapèutics. S'ha de tenir en compte, però, que els animals transgènics són models d'una forma particular d'ELA que constitueix realment una minoria de casos. No obstant, és probable que les formes esporàdiques, que són més del 90% dels casos, i les formes familiars tinguin en comú mecanismes patogènics que condueixen a la degeneració selectiva de MNs.

Més Recentment s'ha identificat un nou gen responsable d'una forma d'ELA familiar amb herència autosòmica recessiva i inici juvenil (Yang *et al.*, 2001, Hadano *et al.*, 2001). En aquest cas la malaltia, també anomenada ALS2, es manifesta cap als 12 anys i progressa lentament al llarg de molts anys. El gen de ALS2 codifica per una proteïna de 184kD amb una funció cel·lular exacta desconeguda, per la qual s'ha proposat el nom d'alsina. Com en el cas de les mutacions de la SOD1, la mutació ALS2 ha pogut ser transferida a ratolins transgènics, que constitueixen un nou model d'investigació.

1.3 Degeneració selectiva de MNs.

En relació a la patogènia de la ELA, un dels fets més significatius pel qual encara no es té explicació és la vulnerabilitat selectiva que presenten les MNs del cervell i de la banya anterior de la medul·la al procés degeneratiu propi de la malaltia. Probablement això podria estar relacionat amb les característiques específiques d'aquestes cèl·lules, com els seus receptors, el gran volum del seu cos cel·lular, la gran longitud del seu axó, que pot arribar a fer desenes de centímetres, la particular organització del seu citoesquelet o la seva escassa capacitat per suportar variacions en el calci intracel·lular. Alguns autors (Alexianu *et al.*, 1994, Krieger *et al.*, 1996,) pensen que això és degut a que la població MNI és excepcionalment pobra en proteïnes que ajuden a neutralitzar els excessos de calci intracel·lular com la parvalbúmina o la calbindina. Aquestes i altres propietats en el conjunt de la medul·la espinal, com la reducció de factors relacionats amb la neurotransmissió, la reducció de l'activitat de la Citocrom-C oxidasa, reducció de l'activitat Transglutaminasa, l'augment de GFAP fragmentada (glial fibrillary acidic protein, proteïna filamentosa específicament associada a astròcits reactius), portarien implícites unes conseqüències metabòliques que determinarien una particular vulnerabilitat de les MNs a l'agent o agents causals de la ELA (Nagata *et al.*, 1998). És interessant senyalar que determinats grups de MNs són notablement menys susceptibles o presenten resistència a l'afectació pel procés degeneratiu de la ELA. Així, les MNs que controlen els músculs extrínsecs de l'ull quasi no són afectades. Per això els pacients amb ELA conserven els moviments oculars fins el final. Un altre grup de MNs que no estan afectades en la ELA constitueixen el nucli d'Onuf, situat en la regió més caudal de la medul·la espinal (Carvalho *et al.*, 1995). Aquest nucli està constituït per un petit grup de MNs que innerven els músculs dels esfínters que controlen la micció i la defecació. Aquesta és la raó perquè la incontinència no és un trastorn propi de la ELA. És interessant senyalar que aquest grup de neurones tampoc s'afecta en la poliomielitis, malaltia viral, que també afecta selectivament a les MNs.

1.4 Mecanismes etiopatogènics.

Malgrat els més de cent anys d'història de la ELA, les causes que determinen la seva patogènia segueixen essent desconegudes i, malauradament, no es disposa d'un tractament eficaç per aturar el seu curs. L'ELA es presenta de forma esporàdica en un 95% dels casos, de forma que no existeixen factors de risc coneguts de tipus geogràfic, alimentari, ambiental, professional o cultural que hi puguin ser associats de forma definitiva, tot i que factors ambientals, de moment

desconeguts, han incidit en un augment del risc de patir ELA, com s'ha constatat entre els soldats americans veterans de la recent Guerra del Golf (Haley, 2003) o entre els jugadors professionals de futbol italians (Belli and Vanacore, 2005). En les altres ocasions (un 5% de casos) la ELA es presenta amb caràcter familiar amb un perfil hereditari típicament autosòmic dominant.

La causa o agents pels quals la ELA es desenvolupa són encara desconeguts, tot i que existeixen varis mecanismes etiopatogènics, no excloents entre ells. En la Figura 1 es pot observar un esquema que representa l'evolució de la degeneració de MN tenint en compte varis aspectes que hi poden contribuir.

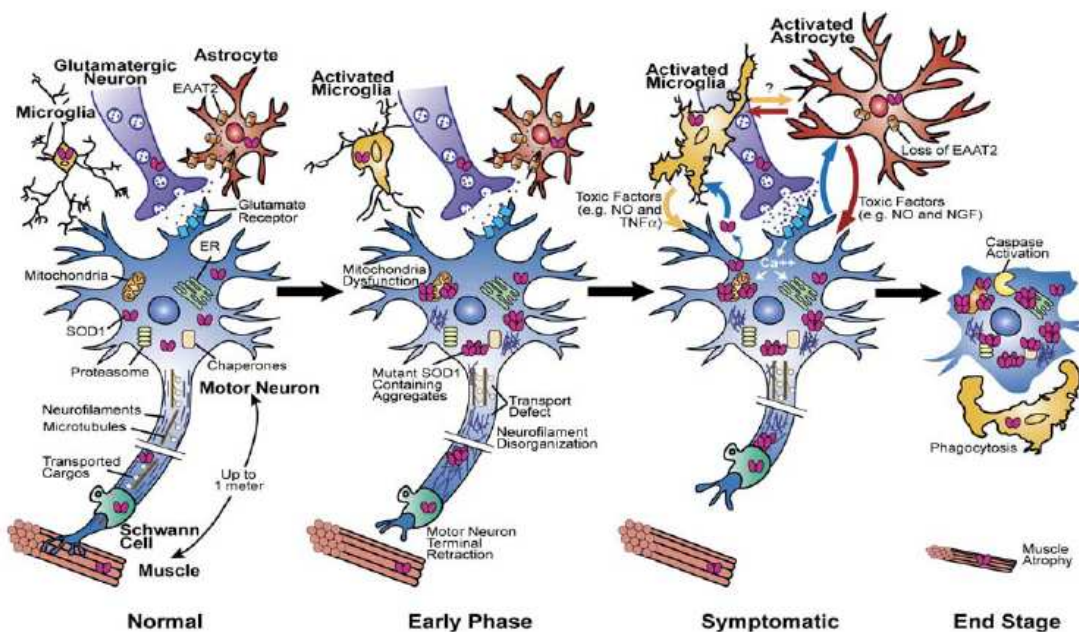


Figura 1: Esquema de l'evolució de la degeneració de MN i activació glial durant el curs de la malaltia per mutació de SOD1. Es defineixen 4 estadis (normal, fase inicial, simptomàtic i estadi final). El dany és iniciat per una combinació de lesions directament en la MN i és amplificat per cèl·lules veïnes no neuronals, acabant en un augment de la lesió i en progressió de la malaltia. Així, la vulnerabilitat selectiva de MN ve determinada per les seves propietats funcionals i pel medi que les envolta (de Cleveland *et al.*, 2006).

1.4.1 Receptors de glutamat, excitotoxicitat i ELA

El glutamat és un neurotransmissor normalment utilitzat per les neurones per generar senyals excitadores. És el principal neurotransmissor excitador en el sistema nerviós i la seva concentració en l'espai extracel·lular del cervell ha d'estar

molt controlada, ja que l'exposició exagerada té efectes letals sobre les neurones. Quan això succeeix, es parla d'excitotoxicitat. Aquest fenomen està implicat en la patogènia de processos neurològics molt diversos, com l'infart cerebral, el trauma neural, l'epilèpsia i probablement també en malalties neurodegeneratives como l'Alzheimer. El glutamat exerceix la seva acció fisiològica sobre les neurones a través de diversos tipus de receptors metabotròpics, acoblats a proteïnes G i a l'activació de segons missatgers intracel·lulars, o a través de receptors ionotròpics. Aquests últims tenen una particular rellevància en excitotoxicitat. Hi podem distingir tres tipus: MMDA, AMPA o Kainat, d'acord amb l'agonista sintètic preferent. Quan aquests receptors s'activen per l'alliberació presinàptica de glutamat, es converteixen en porus o canals que faciliten l'entrada postsinàptica de Na^+ i de Ca^{2+} a la neurona postsinàptica. El Na^+ 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 les quals poden induir canvis permanents en les propietats de la neurona postsinàptica. Aquests receptors tenen un paper fonamental en el funcionament normal del sistema nerviós, intervenint en una àmplia diversitat de processos, tan importants com la memòria o l'aprenentatge. L'acció del glutamat sobre els seus receptors és ràpida i transitòria, ja que el glutamat alliberat a l'espai extracel·lular pels terminals presinàptics és retirat ràpidament per l'acció de transportadors específics (EAATs) situats en les membranes gials i neuronals amb gran capacitat per reintroduir el glutamat a l'interior de les cèl·lules. S'han identificat molecularment 5 transportadors: EAAT1, EAAT2, EAAT3, EAAT4 i EAAT5. El transportador EAAT3, també anomenat EAAC1, es troba en neurones i el EAAT2, també anomenat GLT1 per rosegadors així com el EAAT1, també anomenat GLEST, es troba en la glia astrocitària. Gràcies a l'acció dels transportadors, les concentracions de glutamat en l'espai extracel·lular se mantenen a nivells molt baixos (al voltant de $0,6 \mu\text{M}$), més de deu mil vegades inferiors als trobats al compartiment intracel·lular (10mM).

El fenomen excitotòxic es produeix quan els nivells de glutamat extracel·lular persisteixen suficientment elevats com per activar permanentment els receptors de glutamat. Es creu que concentracions de glutamat en l'espai extracel·lular superiors a $2\text{-}5 \mu\text{M}$ són suficients per provocar degeneració neuronal per excés d'estimulació dels receptors de glutamat. En aquestes condicions l'entrada exagerada de Na^+ i, principalment, de Ca^{2+} provoca un dany neuronal sever. En condicions normals, la concentració de Ca^{2+} en l'interior de la cèl·lula o $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ és de l'ordre de deu mil vegades inferior a la que es troba en el medi extracel·lular o $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{o}}$. Els nivells fisiològics de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ estan subjectes a controls molt estrictes, existint únicament petites oscil·lacions que són utilitzades per la cèl·lula en diverses vies de

senyalització. L'activació exagerada dels receptors de glutamat comporta una entrada massiva Ca^{2+} a l'interior de la neurona de tal forma que els mecanismes homeostàtics que normalment tendeixen a reduir el $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ queden saturats i el $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ no pot mantenir-se en nivells fisiològics. L'elevació del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ a partir de certs nivells provoca dany neuronal activant nombrosos enzims com proteases, lipases, sintasa de l'òxid nítric i d'altres, amb conseqüències letals per la neurona. També l'elevació del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ condueix al dany mitocondrial, ja que aquests orgànuls capturen el calci citosòlic exageradament elevat. Quan això succeeix, hi ha una disfunció mitocondrial i formació exagerada de radicals lliures, que provoca estrès oxidatiu.

Hi ha proves molt concloents que indiquen que aquest mecanisme de dany neuronal excitotòxic opera en la ELA. Rothstein, Martin i Kuncl, al 1992, van publicar la trobada de nivells anormalment elevats de glutamat en el líquid cefaloraquídi de malalts d'ELA. També van analitzar la capacitat per transportar glutamat de membranes aïllades de cervell i medul·la espinal de pacients morts d'ELA esporàdica (Rothstein *et al.*, 1990), trobant una disminució de l'activitat transportadora de glutamat associada a les membranes procedents dels territoris del cervell o de la medul·la espinal afectats per la ELA.

Més tard, els mateixos autors van comunicar que el dèficit en el transport de glutamat es deu a una pèrdua selectiva del transportador de glutamat astroglial EAAT2 (Rothstein *et al.*, 1995) reforçant-se així la idea de que la excitotoxicitat mediada per glutamat és un procés important en la degeneració de MNs pròpia de la ELA.

També se descriu una pèrdua d'aquest transportador de glutamat astroglial EAAT2 en rates transgèniques portadores de la mutació en la SOD1 (Howland *et al.*, 2002), cosa que suggereix que la excitotoxicitat és un mecanisme patogenètic comú que estableix un nexa entre les formes familiars associades a mutacions de SOD1 i les formes esporàdiques d'ELA.

El fet és que les MNs són particularment sensibles al dany excitotòxic glutamatèrgic. Com ja s'ha esmentat abans, són neurones no massa ben dotades per suportar sobrecàrregues de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ ja que presenten un dèficit en proteïnes fixadores de calci. A més les MNs són riques en receptors de glutamat, particularment d'una forma especial del tipus AMPA que, al no presentar una subunitat anomenada GluR2, li confereixen permeabilitat a calci i major vulnerabilitat a estímuls excitotòxics.

Un model àmpliament utilitzat des de fa temps i especialment profitós ha estat l'embrió de pollastre (Hamburguer, 1951) utilitzat per estudiar el desenvolupament

del sistema nerviós, el fenomen de mort cel·lular programada (Programmed Cell Death, PCD) i fenòmens d'excitotoxicitat, donada la seva facilitat de manipulació. S'ha comprovat que el tractament agut d'embrions de pollastre en el dia de desenvolupament (E)7 o posteriorment amb N-metil D-Aspàrtic (MMDA), antagonista de receptors de glutamat, produeix una mort massiva de MN, en canvi el tractament crònic amb MMDA a partir de E5 és capaç de rescatar MN embrionàries de la PCD i prevenir un dany excitotòxic agut posterior (Lladó *et al.*, 1999) donant lloc, però, a una degeneració crònica de les MN (Tarabal *et al.*, 2001).

Una altra diana intracel·lular del dany excitotòxic important és una alteració del reticle endoplàsmic que afecta al processament i tràfic normal de proteïnes. Les proteïnes s'agreguen en l'interior del reticle, segurament com a conseqüència d'una alteració en la composició iònica del medi intraluminal del reticle endoplàsmic. Les proteïnes agregades no superen els controls de qualitat per ser exportades, és a dir, per la secreció o inserció en la membrana plasmàtica i són derivades als lisosomes. Mitjançant l'activació d'un procés d'autofàgia, els dominis de reticle endoplàsmic que contenen agregats proteïcs són envoltats per membranes cel·lulars que seran fusionades amb el compartiment lisosomal. Si el fenomen autofàgic és molt extens, indueix a la degeneració i mort neuronal. Si, pel contrari, el fenomen és limitat, funciona com un mecanisme defensiu que tendeix a aïllar i eliminar components cel·lulars danyats i restaurar la funció cel·lular. És probable que els cossos d'inclusió que apareixen en el soma de les MNs de mostres patològiques d'ELA, anomenats cossos de Bunina, tinguin relació amb estructures autofàgiques generades per un procés similar al descrit. Una altra conseqüència de la retenció de proteïnes agregades en el reticle és una disfunció en el tràfic vesicular i transport de proteïnes a la membrana plasmàtica, dificultant el trànsit i recanvi de proteïnes clau pel manteniment de la funció neuronal, com són per exemple els receptors de membrana (Tarabal *et al.*, 2001, 2005). Com a conseqüència d'aquest procés, la neurona en procés de degeneració sobreviuria per un període de temps, que podria ser bastant prolongat, però en un estat disfuncional.

Els astròcits són elements essencials per les MNs, proveint-les de suport tròfic i i mitjançant la ràpida absorció del glutamat sinàptic mitjançant l'acció dels transportadors de glutamat EAAT2 (o GLT-1 en rosegadors). L'excitotoxicitat mediada per glutamat pot induir dany neuronal i mort com a conseqüència de la seva acció repetitiva, permetent alhora l'entrada de calci a través dels receptors calci-permeables glu-AMPA. En la medul·la espinal, la prevenció de l'excitotoxicitat per glutamat és funció dels astròcits. Les MNs tenen una alta i inherent sensibilitat

a l'excitotoxicitat degut a que els seus receptors de glutamat tenen una baixa proporció de la subunitat GluR2 (Van Damme *et al.*, 2002) en relació a altres tipus de neurones.

Comprovats ja els baixos nivells de GluR2 degut a fenòmens d'edició post-transcripcional del RNA, en neurones de medul·les espinals de malalts d'ELA es troben encara nivells més baixos que en medul·les controls (Takuma *et al.*, 1999). En models de rata transgènica hSOD1^{G93A} i hSOD1^{H46R} no s'han trobat alteracions en el RNA del receptor GluR2 (Kawahara *et al.*, 2006), demostrant que aquestes alteracions no són necessàries per patir la malaltia familiar.

Els astròcits també responen al dany de diferents formes pel que fa la seva activació, com un increment de l'ensamblatge dels seus filaments intermediaris o un increment d'altres processos en el cos cel·lular. L'activació astrocitària ha estat observada en pacients d'ELA i en ratolins transgènics SOD1 (Schiffer *et al.*, 1996, Hall *et al.*, 1998, Levine *et al.*, 1999).

De fet, en ratolins que expressen la inactiva SOD1^{G85R}, s'han observat incursions d'aquesta SOD1 en astròcits en estadis primers de la malaltia (Brujin *et al.*, 1997). La recaptació de glutamat alterada és un dels mecanismes lligats entre la ELA espontània i la familiar deguda a mutacions de la SOD1. Un transport de glutamat disminuït ha estat confirmat en sinaptosomes obtinguts de teixit de SNC afectat en pacients d'ELA (Rothstein *et al.*, 1992), els nivells de EAAT2 estan reduïts en el còrtex motor i medul·la espinal de malalts d'ELA (Rothstein *et al.*, 1995), en medul·les de ratolins mutants per SOD1 (Brujin *et al.*, 1997) i de rata mutant (Howland *et al.*, 2002). Com a conseqüència, en el model d'ELA familiar del ratolí transgènic per hSOD1^{G93A} heterozigot per EAAT2 desenvolupa la malaltia inicialment (Pardo *et al.*, 2006), mentre que drogues que augmenten l'activitat EAAT2 n'extenen la supervivència (Rothstein *et al.*, 2005).

Una implicació addicional per la contribució astrocítica en la ELA és que en cultius cel·lulars amb astròcits activats s'indueix la degeneració de MNs embrioniques via producció de NGF, que en presència de baixes concentracions d'òxid nítric pot induir apoptosi a través del receptor p75NTR. Els astròcits activats en la medul·la espinal de ratolins transgènics SOD1^{G93A} incrementen la síntesis de NGF (Pehar *et al.*, 2004).

1.4.2 Mutacions de la SOD1

No hi ha encara una idea ferma que expliqui satisfactòriament la raó per la qual les mutacions de la SOD1 estan associades a ELA familiar. La SOD1 és una proteïna de 17 KDa que conté un àtom de coure i un altre de zinc. És un enzim antioxidant que catalitza la conversió de superòxid (O_2^-) en peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i oxigen molecular (O_2). S'han descrit fins ara més de 100 mutacions diferents de la SOD1 vinculades a ELA familiar afectant de forma variable l'activitat enzimàtica. Hi ha casos on disminueix l'activitat enzimàtica, com es demostra en anàlisis d'activitat de la SOD1 en sang de pacients d'ELA (Deng *et al.*, 1993, Orrell *et al.*, 1995), o en models animals transgènics per la SOD1 (Wang *et al.*, 2002), però en altres no es modifica o es veu augmentada (Ripps *et al.*, 1995, Reaume *et al.*, 1996, Brujin *et al.*, 1997, Cleveland and Rothstein 2001). Aquestes i altres observacions indiquen que és més probable que l'efecte nociu de la mutació radiqui en l'adquisició d'una propietat tòxica de la molècula. Un fet a destacar és que, en cultius de neuroblastoma que expressen la proteïna SOD1 salvatge o G93A, la oxidació de la SOD1 salvatge modifica les seves característiques, tornant-la tòxica pel cultiu, ubiquïtinitzant-la, interaccionant amb Hsp70 i entrant-la a la via secretora a través de Cromogranina B (Urushitani *et al.*, 2006, Ezzi *et al.*, 2007).

Rakhit *et al.*, (2007) han desenvolupat un anticòs (SOD1 exposed dimer interface, SEDI) que reconeix específicament la SOD1 malplegada i monomèrica, utilitzant com a epítip reconegut una zona de la proteïna que normalment està amagada en l'homodímer. Utilitzant aquest anticòs s'ha establert la presència de SOD1 malplegada i monomèrica en els models d'ELA en ratolí mutant per la hSOD1 G37R, G85R i G93A i en pacients humans amb ELA familiar amb mutació SOD1^{A4V}. Malgrat la seva expressió ubíqua, la SOD1 malplegada es troba principalment en MN degenerants, apareixent abans del començament dels símptomes de la malaltia i disminuint en estadis finals de la malaltia, cosa que coincideix amb la pèrdua de MNs.

S'ha de tenir present que, tant en la ELA familiar com en ratolins transgènics que desenvolupen la malaltia, la mutació de SOD1 s'expressa en totes les cèl·lules de l'organisme encara que només estarien afectades les MNs. El fet que el ratolí Knockout per la SOD1 no desenvolupi malaltia de la MN (Reaume *et al.*, 1996) i que quan es crearen ratolins transgènics on la mutació s'expressava sota control d'un promotor neuronal, els animals no desenvolupaven la malaltia (Pramatarova *et al.*, 2001) afirma aquesta idea.

Uns altres experiments importants van ser els de Clement *et al.*, 2003, on van generar ratolins quimèrics compostats per barreges de cèl·lules normals i cèl·lules expressores de hSOD1 mutada a nivells suficients per causar la malaltia. Així, amb aquests i altres estudis s'ha arribat a la conclusió que, perquè es desenvolupi la ELA, es precisa que la SOD1 mutada sigui expressada en neurones i també en cèl·lules no neuronals. Una de les característiques de la SOD1 mutada és la gran facilitat per agregar-se en el citosol i provocar un efecte tòxic per la cèl·lula (Durham *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 2000).

Els agregats apareixen tant en neurones com en astròcits i poden estar associats a més components, como xaperones o la ubiquitina. Així, en cultius primaris com a models d'ELA, la inducció de xaperones provoca la seva neuroprotecció (Batulan *et al.*, 2006) i Hsp 40, Hsp 70 milloren el creixement neurític i disminueixen els agregats (Takeuchi *et al.*, 2002) i Hsp105 provoca la dissolució d'aquests agregats proteics (Yamashita *et al.*, 2007). De la mateixa manera, la injecció de Hsp70 en ratolins transgènics com a model d'ELA provoca un augment de la seva esperança de vida (Gifondorwa *et al.*, 2007) i el tractament amb arimoclomol, un fàrmac coinductor de heat shock proteïnes, retrassa la progressió de la malaltia i augmenta l'esperança de vida en ratolins transgènics SOD1^{G93A} (Kieran *et al.*, 2004). No està clara la manera per la qual els agregats exerceixen citotoxicitat, però la formació d'agregats proteics en el citoplasma despertaria processos en la cèl·lula destinats a la seva dissolució, com l'activació del sistema ubiquitina-proteosoma i la captació de proteïnes amb activitat restauradora de la estructura proteica como les xaperones (Houenou *et al.*, 1996; Fujihara and Nadler, 1999; Tidwell *et al.*, 2004).

El fet que les MNs no tinguin una gran capacitat per mobilitzar xaperones (Robinson *et al.*, 2005) i donada la gran tendència a la formació d'agregats, la capacitat dels sistemes de dissolució queda aviat saturada. D'altra banda, l'agregat actua com una veritable trampa en la que les proteïnes reparadores, com les xaperones, quedant segrestades i, per tant, desviades de la funció normal en la cèl·lula generant estrès i toxicitat. Això passaria tant en neurones com en astròcits. Per tant, una intervenció farmacològica que afavoreixi la digestió dels agregats de SOD1 podria tenir efectes favorables en el tractament de la ELA familiar associada a mutació de la SOD1. Cal esmentar que els agregats de SOD1 només es troben en els teixits afectats per la ELA (Liu *et al.*, 2004) i no es troben presents en les formes esporàdiques d'ELA.

Recentment, en el laboratori de D. W. Cleveland s'ha posat de manifest que la SOD1 mutant té una gran tendència a formar agregats a l'interior de les

mitocòndries (Vande Velde *et al.*, 2008). Els agregats de SOD1 s'uneixen amb altres proteïnes mitocondrials, causant una greu disfunció mitocondrial o una interferència en la funció d'altres proteïnes. Aquests descobriments concorden amb les dades morfològiques prèvies on s'observen grans alteracions estructurals en les mitocòndries de les MNs en les primeres etapes de desenvolupament de la malaltia en animals mutants de SOD1.

S'ha demostrat també la presència d'aquests agregats en l'aparell de Golgi en malalts d'ELA i en models animals de la malaltia. En malalts d'ELA, l'aparell de Golgi presenta un aspecte fragmentat, amb cossos de Bunina i inclusions basofíliques, i en models animals, la fragmentació de l'aparell de Golgi es produeix mesos abans de l'inici dels símptomes de la malaltia (Fujita *et al.*, 2005).

Estudis amb ratolins transgènics expressors de varies mutacions per la hSOD1 suggereixen que la via de mort de la MN és molt complexa i pot incloure esdeveniments relacionats a més amb dany oxidatiu, excitotoxicitat, alteracions en la homeostasi del calci, activació de caspases, defectes mitocondrials (Liu *et al.*, 2004). També molt recentment, el grup de Robert H. Brown ha demostrat que els agregats de SOD1 atrapen la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 (Pasinelli *et al.*, 2004). La depleció d'aquesta proteïna deixa desproveïda a la neurona d'una defensa essencial contra la mort cel·lular per apoptosi.

Anàlisis de ratolins que expressen la mutació SOD1^{G37R} posen de manifest la desregulació d'activitats Cdk4 i Cdk5 (Nguyen *et al.*, 2003), que podria estar implicada en apoptosi i neurodegeneració (Patrick *et al.*, 1999). No obstant, estudis recents eliminarien el paper de Cdk5 en la patogènesis de la ELA, per exemple el cas del knockout de p53 en ratolins SOD1^{G93A} no afecta el desenvolupament de la malaltia (Takahashi *et al.*, 2004).

Un altre possible mecanisme que fa les MNs especialment vulnerables en condicions de mutació de SOD1 és a través de l'anomenat sistema Fas-Fas lligand (Fas-FasL). Fas és una proteïna de membrana que s'activa quan s'uneix a FasL. Quan això succeeix, s'activen vies de senyalització intracel·lular que porten a la mort cel·lular per apoptosi. S'ha demostrat que l'activació de Fas en les MNs indueix l'expressió de la forma neuronal de la sintasa de l'òxid nítric (nNOS) i que la producció de òxid nítric (NO) a través de l'enzim desencadena la mort neuronal (Raoul *et al.*, 2002). Les MNs de ratolins mutants de SOD1 que tenen ELA són molt sensibles a aquest sistema de senyalització de mort cel·lular. També aquestes troballes tenen conseqüències terapèutiques, ja que tan el sistema Fas-FasL com el de la NOS poden modular-se farmacològicament.

Tot i que les MNs són les cèl·lules afectades en aquesta malaltia, està clara la implicació d'altres tipus cel·lulars. Per saber els tipus cel·lulars que produeixen efectes nocius portant a la mort neuronal es van generar ratolins transgènics expressors de hSOD1 mutada sota promotors astrocítics o sota promotors neuronals. L'expressió de la mutació SOD1^{G85R} sota promotor GFAP produeix astrocitosis però no la malaltia (Gong *et al.*, 2000).

Ratolins transgènics expressors de cDNA SOD1^{G37R} sota promotor priònic desenvolupen també la malaltia (Wang *et al.*, 2002) cosa que demostra que l'expressió de la hSOD1 mutada en la unió neuromuscular és suficient per causar la malaltia, i l'expressió d'aquesta proteïna mutada només en glia no és un requeriment per la neurodegeneració. Sorprenentment, l'expressió de la proteïna mutada únicament en neurones sota promotors neuronals tampoc indueix la malaltia (Pramatarova *et al.*, 2001). No obstant, hi ha la possibilitat que el nivell d'expressió del transgen durant el desenvolupament estigui per sota els llindars necessaris per provocar la malaltia. La generació de ratolins quimèrics, amb cèl·lules expressores de hSOD1 normal i mutada demostra que la neurodegeneració és retrassada o eliminada quan MNs expressores de hSOD1 mutada estan envoltades per cèl·lules wild type sanes (Clement *et al.*, 2003). A més, aquests estudis mostren l'evidència del dany en MNs wild type estant envoltades per cèl·lules expressores de hSOD1 mutada.

Tots aquests resultats demostren la importància de l'entorn de MNs, però el mecanisme pel qual la toxicitat de la SOD1 mutada és transferida d'una cèl·lula a una altra és encara desconegut.

Les cromogranines (Cg A i B) són unes glicofosfoproteïnes solubles àcides que són els components majoritaris de les vesícules de nucli dens (large dense-core vesicles, LDCV) en neurones i en cèl·lules endocrines. Els estudis mostren que CgA i CgB, que són proteïnes abundants en MNs i interneurones, podrien actuar com les xaperones i promoure la secreció de la proteïna SOD1 mutada i malplegada, ja que s'ha demostrat que interactuen amb formes mutades de la SOD1 però no amb la wild type (Urushitani *et al.*, 2006). A més, els resultats suggeririen que la SOD1 mutada extracel·lular podria induir microglia i mort de MNs. Amb aquests resultats aconseguits de la patogènia de la ELA basats en la toxicitat de la SOD1 mutada secretada, que demostren que la toxicitat és transferible d'una cèl·lula a una altra, semblaria que la malaltia no és estrictament un problema únicament de la MN.

1.4.3 Altres mutacions

Mutacions en l'Alsina

Malgrat la mutació de la SOD és la més investigada i la més utilitzada en models animals, no és la única mutació descoberta referida a la patogènia de la ELA. Per exemple, s'han trobat deleccions en exons codificants en un nou gen situat en el cromosoma 2q33 (Hadano *et al.*, 2001), anomenat ALS2, que codifica per una proteïna posteriorment descoberta, l'Alsina, de 184kDa i 1657 aminoàcids. El gen ALS2 és expressat ubiquament, i codifica per aquesta proteïna, que té 3 dominis homòlegs GEF (guanine nucleotide exchange factor), que activen una guanisin trifosfatasa (GTPasa) pertanyent a la família Ras. Els dominis són domini N-terminal RCC1-like, domini central amb homologia Dbl i homologia pleckstrin (DH/PH), i domini C-terminal, corresponent a vacuolar protein sorting 9 (VPS9). Aquestes mutacions s'han trobat en pacients amb una forma juvenil recessiva d'ELA (JALS) (Yang *et al.*, 2001, Hadano *et al.*, 2001). S'ha trobat que la forma llarga de l'alsina (LF) és capaç d'unir-se a la proteïna SOD1 mutada, però no a la SOD1 salvatge, via domini RhoGEF, i és capaç de protegir el cultiu d'una línia de MNs davant neurotoxicitat induïda per SOD1 mutada (Kanekura *et al.*, 2004). Més recentment s'ha trobat que la alsina està involucrada en un mecanisme endocític anomenat macropinocitosis via Rac1. La pèrdua de la funció de la proteïna resultaria en una pertorbació de mecanismes cel·lulars i moleculars, com per exemple el tràfic de vesícules, resultant en disfunció i finalment mort cel·lular (Kunita *et al.*, 2004, Hadano *et al.*, 2006) S'ha comprovat que la pèrdua de la proteïna Als2 en ratolins transgènics madurs comporta una pèrdua de cèl·lules de Purkinje (Hadano *et al.*, 2006).

S'ha descrit també que la pèrdua de funció de l'alsina no afecta en la progressió de la malaltia en ratolins transgènics G93A, però predisposa les neurones a patir estrès oxidatiu (Cai *et al.*, 2005).

Mutacions en l'Angiogenina

Mutacions en l'Angiogenina s'han relacionat directament amb la ELA, potenciant més el lligam entre una angiogènesis alterada i la degeneració de MNs. S'han trobat 7 mutacions sense sentit en 15 pacients d'ELA Familiar i en 11 pacients d'ELA espontànea (Greenway *et al.*, 2006). No obstant, aquestes mutacions semblen restringides a la població irlandesa, italiana i escocesa, suggerint que aquestes mutacions lligades a ELA serien poc comunes. El mecanisme pel qual aquestes mutacions afecten la funció en l'angiogenina i provoquen la malaltia encara és desconegut. L'angiogenina, que s'expressa en tot el Sistema Nerviós Central (CNS), incloses les MNs, té una activitat intranuclear RNAasa que pot facilitar la síntesis de

rRNA. La majoria de les mutacions han estat trobades en el nucli catalític, portant probablement a una pèrdua de funció en l'angiogenina mutada, tot i que això encara està per confirmar, com el fet que l'angiogenina pugui tenir característiques neurotròfiques.

Mutacions en la ALS8-VAMP-Associated Protein B (VAPB)

Una mutació sense sentit, dominant, en el cromosoma 20 ha estat lligada a formes atípiques d'ELA, associada a tremolors (Nishimura *et al.*, 2004). Tots els casos deriven d'una mutació en el gen codificant de la *vesicle-associated membrane protein B* (VAPB), també coneguda com sinaptobrevina associada a proteïna B. Aquesta proteïna està implicada en el transport del Reticle Endoplasmàtic a Golgi, incloent el transport axonal de components de la membrana. Es desconeix com la substitució de la Prolina per la Serina en la posició 56 afecta les propietats funcionals de la proteïna.

Mutacions en Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF és considerat un factor que pot contribuir a la ELA desde que es va veure que una delecció en el Hipoxia Response Element (HRE) en el seu promotor produïa una malaltia similar a la ELA en ratolins (Oosthuyse *et al.*, 2001). VEGF s'expressa en tot el SNC i funciona com a factor neurotròfic en moltes cèl·lules, incloses les MNs (Oosthuyse *et al.*, 2001, van den Bosch *et al.*, 2004). Revisant els HRE de pacients d'ELA i altres regions de VEGF relacionades amb desregulació de la seva síntesis, no s'ha trobat relació entre les variants de HRE i la malaltia (Gros-Louis *et al.*, 2003, Lambrechts *et al.*, 2003). Malgrat això, 2 haplotips en altres regions del promotor mostren un risc a patir ELA en determinades poblacions (Lambrechts *et al.*, 2003).

1.4.4 Neuroinflamació

La inflamació constitueix un dels aspectes de la resposta immunitària innata. La immunitat innata està normalment present i no és estimulada per antígens ni està mediada per anticossos. Generalment és no-específica i és executada per una varietat de cèl·lules fagocítiques que inclouen neutròfils circulants, monòcits i macròfags residents en teixits. Els macròfags residents en el SNC són les cèl·lules microgials. Durant el desenvolupament la micròglia és immunològicament activa i capaç de respondre a esdeveniments relacionats amb l'organització del SNC i formació de l'ambient neuronal-glial. En el cervell humà adult aquesta micròglia està en un estat inactiu però preparada per una defensa immune de primera línia (Raivich, 2005). En resposta a una gran varietat d'agressions, la micròglia s'activa i

les cèl·lules fagocítiques alliberen una sèrie de productes per mediar la resposta inflamatòria. Aquesta transformació és evident morfològicament, passant d'un estat ramificat a un estat ameboide fins arribar a un estat actiu (Perry, 2004). La microglia esdevé principal en la resposta a un estímul primari de les neurones o dels astròcits, incloent l'interferó γ (IFN γ), *tumour necrosis factor* α (TNF α), *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) i el *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF). Això inclou un cos cel·lular més dens i com a resultat un augment de la vigilància local per part d'aquestes cèl·lules. En aquest estat la microglia expressa molècules del complex major d'histocompatibilitat II (MHC II) i presenta antígens. En resposta a l'estímul secundari per TNF- α , interleukina-1 (IL-1) o IL-6 la microglia té la seva màxima activitat mitjançant la secreció de mediadors inflamatoris. Cal fer notar que l'efecte de l'activació microglial pot induir tan regeneració com dany neuronal. Per l'alliberament de citokines anti-inflamatòries, neurotrofines i factors de creixement i controlant la fagocitosis amb l'eliminació d'axons de neurones malmeses, la microglia pot induir la reparació neuronal. Al contrari, amb l'alliberació de citokines proinflamatòries, proteases lisosomals, radicals d'oxigen reactius neurotòxics i via activació astròglial i fagocitosis crònica, la microglia pot induir dany neuronal (Banati *et al.*, 1993). La comprensió dels mecanismes amb els quals es modula la reparació i el dany neuronal pot fer entendre el paper de la resposta de la immunitat innata en la ELA. S'ha vist que en el model de ratolí transgènic SOD1^{G93A}, cèl·lules no-neuronals *wild type* són capaces d'allargar la supervivència de les neurones mutants (Clement *et al.*, 2003). L'evidència de dany neuronal perifèric suggereix que la microglia és la principal executora de la resposta inflamatòria malgrat macròfags de la sang són reclutats i dirigits cap a la zona. Lesions en el SNC no solen comportar activació microglial i reclutament d'altres macròfags a menys que hi hagi trencament de la barrera hematoencefàlica (Stoll *et al.*, 1999).

La ELA s'havia considerat tradicionalment como una malaltia purament degenerativa en la que els fenòmens inflamatoris serien de poca rellevància. Tot i això, amb els coneixements adquirits en els darrers temps, la neuroinflamació es considera un element molt important a considerar tant en la ELA com en altres malalties neurodegeneratives (Zipp *et al.*, 2006), i més tenint en compte que l'activitat inflamatòria és susceptible de ser modulable farmacològicament.

El concepte de neuroinflamació es refereix essencialment a la invasió del sistema nerviós de leucòcits circulants i l'activació de la microglia. El paper d'aquestes cèl·lules en la degeneració neuronal durant el desenvolupament ja ha estat comprovat (Martin-Teva *et al.*, 2004) encara que és controvertit (Calderó *et al.*,

2009). Aquestes cèl·lules, macròfags residents en el teixit nerviós amb gran capacitat fagocítica i migratòria, s'originen partir dels monòcits circulants i s'activen després d'una lesió. En les àrees afectades per la neurodegeneració en la ELA es troba una acumulació de cèl·lules microglials i astroglials. En l'ELA, l'activació microglial ha estat descrita en medul·la espinal i cervell de pacients (Engelhardt and Appel, 1990; Henkel *et al.*, 2004; Kawamata *et al.*, 1992; McGeer *et al.*, 1991; Troost *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 2004), així com en models de ratolins transgènics per la SOD1 (Hall *et al.*, 1998, Kriz *et al.*, 2002). En el líquid cefaloraquídi i en el sèrum de malalts amb ELA s'han trobat nivells augmentats de factors relacionats amb la inflamació, incloent proteïnes del Complement i Proteïna1a-quimioatrant de monòcits (MCP-1a), (Goldknopf *et al.*, 2006, Simpson *et al.*, 2004). L'activació microglial és iniciada abans de la pèrdua neuronal (Henkel *et al.*, 2006). A més, l'augment de cèl·lules dendrítiques, potents presentadors d'antígens implicades en la resposta immunitària, han estat trobades en medul·les de pacients d'ELA i de ratolins transgènics (Henkel *et al.*, 2004, 2006).

Una evidència que implica la micròglia en la patogènia de la ELA resideix en el fet que estimulants crònicament el sistema immune amb lipopolisacàrid (LPS), la malaltia, en el ratolí transgènic s'agreuja (Nguyen *et al.*, 2004).

També es dona una moderada infiltració de leucòcits, principalment de limfòcits T8 i T4. L'activació inflamatòria es reflexa bioquímicament en un increment de productes alliberats per les cèl·lules. Alguns mediadors inflamatoris, com el TNF α , les interleucines 1b i 6 (IL-1b, IL-6), la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Yasojima *et al.*, 2001) o la prostaglandina E₂, es troben incrementats en el teixit nerviós afectat per la ELA. També s'ha demostrat que el TNF α i l'interferó γ indueixen estrès oxidatiu i mort neuronal en explants de medul·la d'embrió de rata (Mir *et al.*, 2009) Una citokina particularment interessant upregulada en ratolins mutants per la SOD1, que podria jugar un important paper en la degeneració de MNs, és el TNF α . S'ha vist que la micròglia estimulada amb LPS produeix alt nivells de TNF α en el ratolí transgènic SOD1^{G93A} (Weydt *et al.*, 2004). L'administració del seu antagonista comporta un lleuger augment de l'esperança de vida en aquest model animal (West *et al.*, 2004).

La COX-2, produïda en abundància per la micròglia i altres cèl·lules inflamatòries (també per neurones i astròcits), juga un paper important estimulants la producció de citokines proinflamatòries. En ratolins, l'ús d'un inhibidor de la COX-2 (celecoxib), allarga la supervivència allargant l'inici de la malaltia. Malauradament, no altera la seva progressió un cop ha començat la malaltia. Assajos amb aquesta droga en humans no han aportat cap benefici (Cudkovicz *et al.*, 2006).

En ratolins transgènics SOD1^{G37R} han estat detectades, per hibridació *in situ*, una forta activitat NFκB, expressió de citokines i quimokines a la medul·la espinal (Nguyen *et al.*, 2001). Es considera que la resposta inflamatòria pot tenir conseqüències ambivalents, amb un sentit defensiu o protector limitant el dany cel·lular propi de la ELA, i també promovent fenòmens neurodegeneratius, incrementant el dany neuronal i autoperpetuant el procés lesiu. Així, s'ha demostrat que l'estimulació de la resposta immunitària protectora mediada per limfocits T allarga la vida de ratolins transgènics amb ELA (Angelov *et al.*, 2003). L'estimulació es va aconseguir mitjançant l'administració de l'anomenat copolímer-1, un polipèptid sintètic emprat en el tractament de l'Esclerosi Múltiple. En el sentit contrari, produint depressió dels efectes perjudicials de la neuroinflamació, alguns inhibidors de la COX-2, del TNFα o de l'activació microglial, com la minociclina milloren els símptomes i allarga la vida de ratolins transgènics amb ELA (Kriz *et al.*, 2002, Van den Bosch *et al.*, 2002).

Les cèl·lules microgials podrien ser un element important en la inducció d'apoptosi via Fas lligand, que en MNs implicaria la síntesis d'òxid nítric. A més, la SOD1 mutada se sap que és un potent activador de la microglia (Hall *et al.*, 1998, Urushitani *et al.*, 2006), implicant una estreta relació entre les MNs, cèl·lules microgials i altres cèl·lules no neuronals.

1.4.5 Autoimmunitat

La possibilitat que un mecanisme autoimmunitari estigui relacionat amb la patogènia de la ELA ha estat considerat fa molt temps, però les evidències que li donarien suport fins ara no han estat concloents. Moltes de les característiques de les malalties autoimmunes no han estat trobades en la ELA, com ara l'associació amb altres malalties autoimmunes o amb tipus d'histocompatibilitat, presència d'anticossos en els teixits afectats i millora terapèutica enfront a tractaments immunosupressors (Kelemen *et al.*, 1983, Brown *et al.*, 1986, Drachman *et al.*, 1994). L'existència de fenòmens autoimmunitaris en la ELA ha estat àmpliament discutida (Drachman and Kuncl, 1989, Drachman *et al.*, 1995, Smith *et al.*, 1996), aspecte especialment estudiat en el laboratori de S.Appel. Tot i que no hi ha resultats concloents, s'ha descrit l'existència d'anticossos circulants contra canals de calci (Voltage-gated Calcium Channel, VGCCs) en malalts d'ELA esporàdica (Engelhardt *et al.*, 1995, Engelhardt *et al.*, 1997, Offen *et al.*, 1998). Es creu que aquests anticossos podrien activar aquests canals facilitant l'entrada de calci a la neurona i promovent els mecanismes excitotòxics i dany neuronal en la ELA. S'ha comprovat també que aquests anticossos anti VGCC són citotòxics per la línia híbrida de MN VSC4.1 de forma calci extracel·lular dependent. La citotoxicitat

desapareix pre-incubant aquestes Ig amb antagonistes dels VGCC o amb subunitats dels VGCC aïllades (Smith *et al.*, 1994).

També s'ha descrit la presència d'anticossos anti-neurals en el líquid cefalo-raquidi i sèrums de malalts d'ELA, trobant-se evidència d'anticossos anti gangliòsids (Pestronk *et al.*, 1988, Niebroj-Dobosz *et al.*, 1999, Mizutani *et al.*, 2003). Els gangliòsids són un grup de glucoesfingolípidis que contenen àcid siàlic presents en elevada concentració en les membranes de les neurones, tant en matèria blanca com gris, i especialment en els terminals nerviosos (Marconi *et al.*, 2005). Els gangliòsids estan relacionats amb moltes funcions fisiològiques (Svennerholm, 1994), però es desconeix encara el significat de la seva presència, ja que no en tots els sèrums de pacients d'ELA s'ha determinat la seva presència i a més s'ha trobat evidència en sèrums de pacients d'altres malalties neurològiques (Lamb and Patten, 1991, Gallardo *et al.*, 2001). S'ha detectat la presència d'anticossos circulants anti sulfoglucuronil paraglobòsid, SGPG (Ben Younes-Chennoufi *et al.*, 1995), així com la presència d'anticossos anti acetilcolinestera (Haggstrom *et al.*, 1997) i més concretament presència d'anticossos que modifiquen l'activitat acetilcolinestera d'eritròcits (Sindhuphak *et al.*, 1988), la presència d'anticossos anti el receptor d'acetilcolina (Okuyama *et al.*, 1997), la presència d'anticossos anti Neurofilament (Couratier *et al.*, 1998) i la presència d'anticossos anti Fas en pacients d'ELA tant esporàdica com familiar (Sengun and Appel, 2003). S'ha comprovat l'activitat citotòxica del sèrum de malalts d'ELA enfront eritròcits normals (Conradi and Ronnevi, 1985), i la presència de Ig citotòxiques contra eritròcits en la saliva de pacients amb ELA (Conradi *et al.*, 1990). Aquestes troballes, però, no han estat complementades amb correlacions de la malaltia amb el seu estadi, sexe o edat dels pacients.

Les Immunoglobulines G (IgG) de sèrums de pacients d'ELA, injectades intraperitonealment en ratolins, es dirigeixen i són trobades 24 hores després de la injecció en el sistema nerviós del ratolí, en els axons terminals de la segona neurona motora, localitzades més concretament en els microtúbuls i en Reticle Endoplasmàtic Rugós (RER). Injectant aquestes IgG en mostres de medulla humana de pacients d'ELA, els anticossos també van ser trobats en les immediacions dels microtúbuls i del RER (Engelhart *et al.*, 2005).

El significat de la presència d'aquests anticossos és encara desconegut. Lamentablement, com ja s'ha comentat abans, els assajos clínics realitzats amb teràpia immunosupressora no s'han mostrat eficaços en el tractament de la ELA (Brown *et al.*, 1986).

1.4.6 Citoesquelet i fosforilació de proteïnes.

Totes les cèl·lules animals contenen un entramat interior de filaments molt complexe que constitueix el citoesquelet. El citoesquelet intervé de manera essencial en la determinació de la forma cel·lular i és una estructura molt dinàmica implicada en tots els moviments cel·lulars i en tràfic interior d'òrgans i proteïnes. Les neurones deuen la seva peculiar forma arbrada a la disposició del seu citoesquelet, constituït per microtúbuls, microfilaments d'actina i els anomenats filaments intermediaris o neurofilaments. Els filaments intermediaris estan formats per proteïnes de neurofilament i d'altres com la periferina. Una de les característiques histopatològiques més sorprenents de la ELA és l'acumulació anormal de neurofilaments hiperfosforilats, tant en el soma neuronal com a nivell dels axons. Són els anomenats esferoides axonals. Alguns animals transgènics sobreexpressors de proteïnes del citoesquelet desenvolupen malalties de la MN similars a la ELA, tot i que, en determinats casos, l'excés de filaments pot tenir conseqüències favorables per la MN prèviament malmesa (Julien 1995, Tu *et al.*, 1997, Julien, 1997). És possible que les greus alteracions en l'organització del citoesquelet observades en les MNs danyades per la ELA siguin més aviat una conseqüència que una alteració primària inherent a la mateixa. Un altre aspecte de la fisiologia neuronal en el que la participació del citoesquelet és rellevant en el transport axonal. El transport axonal és essencial en les neurones degut a la gran mida i polaritat d'aquestes cèl·lules. En humans, les MNs espinals poden tenir axons de més d'un metre de longitud, i moltes proteïnes són sintetitzades en els cossos cel·lulars i transportades cap als terminals nerviosos mitjançant transport axonal. Algunes molècules motores, com subunitats ATPasa membres de les famílies de la kinesina o dineïna, mouen altres proteïnes mitjançant transport anterògrad i retrògrad respectivament pels microtúbuls.

Gràcies a aquest mecanisme, especialment important en les MNs, tot un conjunt de materials i òrgans cel·lulars viatgen contínuament des del cos cel·lular fins als terminals de l'axó i viceversa. La disrupció de la organització dels filaments interromp el transport axoplàsmic i produeix dany neuronal. És interessant assenyalar que la inhibició del transport axonal retrògrad per manipulació genètica de proteïnes motores responsables del mateix condueix a ratolins a desenvolupar una malaltia de MN semblant a la ELA (Tu *et al.*, 1996). L'impediment en el transport axonal és considerat un factor important en varis desordres neurodegeneratius. Mutacions que fan malbé els complexos de kinesina o dineïna poden impedir el transport axonal, bloquejar les càrregues i produir degeneració axonal.

Es troba una evidència estructural i funcional de dany en axons motors i terminacions motores terminals que precedeix l'inici de la paràlisi i de la mort neuronal (Chiu *et al.*, 1995, Azzouz *et al.*, 1997, Kong and Xu, 1999, Fischer *et al.*, 2004, and Gould *et al.*, 2006). Cal destacar la implicació de components de citoesquelet en la patogènesis de l'ELA, fet corroborat per models animals amb desordres en el citoesquelet i amb defectes en el transport de microtúbuls.

També la mutació humana associada a formes juvenils d'ELA que afecta al gen ALS2 condueix a la disfunció d'una proteïna que intervé en processos de senyalització relacionats amb el transport vesicular i amb l'organització del citoesquelet.

L'activitat exagerada de diversos enzims responsables de la fosforilació de proteïnes o kinases provoca la hiperfosforilació dels neurofilaments i d'altres substrats. Alguns autors pensen que els neurofilaments podrien actuar com "trampes" de fosforilació, disminuint l'acció de les kinases sobre altres substrats, la fosforilació dels quals seria pitjor tolerada per la neurona (Rao *et al.*, 1995). D'això es dedueix que la fosforilació del citoesquelet podria tenir, en part, conseqüències beneficioses. L'activitat incrementada o desregulació d'aquestes kinases i, en particular de la kinasa dependent de ciclina 5 o Cdk5 (Bajaj *et al.*, 2000), es considera com un element patogènic important fins el punt que els fàrmacs inhibidors s'estan investigant com possibles teràpies en la ELA.

1.4.7 Estrès oxidatiu

En el transcurs d'algunes rutes que pertanyen a l'activitat metabòlica normal es generen petites quantitats d'espècies reactives d'oxigen (ROS) principalment en mitocondries (Coyle *et al.*, 1993, Lenaz *et al.*, 1998), com el superòxid ($O_2\cdot^-$), l'hidroxil ($OH\cdot$) o el peroxidnitrit ($ONOO^-$), totes químicament molt actives i potencialment tòxiques per les cèl·lules. Aquestes espècies reaccionen amb proteïnes, lípids i àcids nucleics, alterant-los (Beal, 2002). Per tal d'evitar el dany oxidatiu, les cèl·lules estan equipades amb una bateria de defenses, constituïda per 1) una sèrie de enzims que converteixen els ROS en molècules menys reactives com la SOD (Super Òxid Dismutasa), la catalasa o la peroxidasa. 2) molècules més petites amb activitat antioxidant, com el glutatió i les vitamines C i E, coenzim Q o àcid lipoic. 3) minimització de la disposició de molècules pro-oxidants i 4) protecció per heat shock proteins que actuen eliminant o intentant reparar les proteïnes malmeses. Quan els mecanismes de defensa antioxidant queden sobrepassats per un excés de producció de ROS o quan la capacitat antioxidant disminueix, apareix l'estrès oxidatiu i el dany cel·lular conseqüent.

Nombrosos estudis evidencien l'estrès oxidatiu en la patogènia de la ELA, i existeixen nombroses dades que constaten l'existència de dany oxidatiu en teixits afectats per la ELA (Bowling *et al.*, 1993, Shaw *et al.*, 1995, Tu *et al.*, 1997). S'han utilitzat diferents proteïnes marcadores d'estrès oxidatiu per tal d'avaluar-ne el nivell, trobant-se per exemple nivells de 3-nitrotirosina incrementat en pacients d'ELA esporàdica i familiar (Beal *et al.*, 1997) i alteracions immunohistoquímiques a nivell de la hemoxigenasa-1 per aquestes dues variants de la malaltia (Ferrante *et al.*, 1997). També s'ha demostrat que les medul·les espinals de malalts d'ELA esporàdica mostren signes d'estrès en el Reticle Endoplàsmic i que el dany oxidatiu proteic està associat a canvis en concentració d'àcids grassos en la ELA. L'estrès oxidatiu és evident en el còrtex frontal, suggerint que aquesta regió és afectada aviat en la ELA. Tot això ha estat parcialment reproduït en cultius organotípics de medul·la espinal. Es pot concloure que canvis en la composició d'àcids grassos, una disfunció mitocondrial i activitat proteosomal, que poden derivar en excitotoxicitat, portarien a estrès oxidatiu i finalment a estrès de Reticle en la ELA esporàdica (Ilieva *et al.*, 2007).

Una de les proteïnes que resulta alterada com a conseqüència de l'estrès oxidatiu és el transportador de glutamat EAAT2, cosa que derivaria en una promoció de la excitotoxicitat. L'entrada de calci dins la mitocòndria dispara la producció d'espècies ROS (Dykens, 1994) i estimulant l'entrada de calci a la mitocòndria via activació dels receptors AMPA s'ha vist que es dispara la despolarització mitocondrial i la generació d'espècies ROS (Carriedo *et al.*, 2000). La generació d'espècies d'oxigen reactives és evident en la toxicitat mediada per glutamat. L'entrada de glutamat en cèl·lules gials i els transportadors de glutamat de neurones es veuen reduïts amb l'exposició d'espècies ROS (Trotti *et al.*, 1998). L'activitat peroxidasa dels mutants per SOD1 és suficient per causar l'oxidació i inactivació dels transportadors de glutamat EAAT2 en oòcits de *Xenopus* (Trotti *et al.*, 1999). La inactivació dels transportadors de glutamat pot portar a nivells elevats i persistents de glutamat en la sinapsis, disparant una excessiva activació dels receptors AMPA, incrementant els nivells de calci intracel·lular i la generació de molècules ROS. L'excitotoxicitat i l'estrès oxidatiu es podrien combinar fent un cercle viciós on el glutamat estimularia l'entrada massiva de calci dins la MN, que alhora seria portat dins la mitocòndria estimulant la creació d'espècies ROS que sortirien de la cèl·lula i inactivarien els transportadors de glutamat que portarien a augmentar els nivells de glutamat a la sinapsis i activant els receptors AMPA que augmentarien de nou el calci intracel·lular. El procés acabaria amb la mort neuronal (Rao *et al.*, 2004).

S'han trobat nivells incrementats de calci en els terminals nerviosos motors de pacients amb ELA (Silkos *et al.*, 1996) i de ratolins SOD1^{G93A} (Silkos *et al.*, 1998).

Altres fonts de ROS, probablement molt importants en la patogènia de la ELA, podrien estar relacionades amb la neuroinflamació i l'activitat ciclooxigenasa o amb l'activació de la NOS (Sintasa de l'òxid nítric).

Els marcadors per l'oxidació de proteïnes i lípids estan localitzats en MN, astròcits reactius i micròglia i macròfags en la matèria gris de pacients amb ELA (Shibata *et al.*, 2001). El dany oxidatiu al DNA, mesurat pels nivells de DNA-8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) s'ha trobat elevat en pacients en la medul·la cervical de malalts d'ELA (Fitzmaurice *et al.*, 1996), i és encara més prominent en la banya ventral (Ferrante *et al.*, 1997) de la medul·la de malalts d'ELA esporàdica, no trobant-se diferències en malalts amb ELA familiar. Nivells augmentats de 8-OHdG, de 4-hidroxinonenal (indicatiu d'oxidació lipídica i radicals lliures d'ascorbat) han estat trobats també en el líquid cefaloraquídi (LCR) de pacients amb ELA (Ihara *et al.*, 2005, Smith *et al.*, 1998). Nivells elevats de 3-nitrotirosina (Tohgi *et al.*, 1999) i manganès nitrat superòxid dismutasa (Aoyama *et al.*, 2000) també han estat mesurats en el LCR de pacient d'ELA, malgrat que més recentment han aparegut resultats diferents pel que fa la 3-nitrotirosina (Ryberg *et al.*, 2004).

Si l'estrès oxidatiu és una causa primària de la ELA o només és una conseqüència de la malaltia és encara debatut. El descobriment de mutacions en el gen de la SOD1, que produeixen algunes formes familiars d'ELA (Rosen *et al.*, 1993) impulsà la teoria de l'estrès oxidatiu. Els models animals de ratolins transgènics per la SOD1 mostren un increment del dany oxidatiu en proteïnes, DNA i lípids (Andrus *et al.*, 1998). Malgrat això, el fet que hi hagi més de 100 mutacions trobades en la SOD1 i que aquestes comportin tant guany com pèrdua o manteniment de la seva activitat enzimàtica fa suposar que la patogènia de la malaltia no recau únicament en el canvi de l'enzim SOD1.

1.4.8 Autofàgia

L'autofàgia és un conjunt de rutes cel·lulars degradatives que comporten el pas de material del citoplasma cap al lisosoma per a la seva degradació. S'han identificat 3 formes d'autofàgia: la mediada per xaperones, la microautofàgia i la macroautofàgia (Levine *et al.*, 2008). Es diferencien entre si per les seves funcions fisiològiques i el mode de pas al lisosoma. La macroautofàgia és el que normalment s'anomena autofàgia, i és el mecanisme de regulació catabòlic majoritari utilitzat en eucariotes per degradar orgànuls i proteïnes. Aquesta forma d'autofàgia implica el tancament del material a degradar dins de vesícules amb una doble membrana cap al lisosoma. Els primers passos són la formació i l'expansió d'una membrana aïllada que els límits de la qual es fusionaran posteriorment per formar l'autofagosoma,

una vesícula amb doble membrana que englobarà el material citoplasmàtic. L'autofagosoma posteriorment es fusionarà amb el lisosoma, que conté material que produirà la degradació, per formar un autolisosoma, on el material captat serà degradat. L'autofàgia té lloc en nivells baixos virtualment en totes les cèl·lules per tal de mantenir l'homeostasi cel·lular de proteïnes i orgànuls, s'incrementa quan les cèl·lules necessiten generar nutrients intracel·lulars i energia (Maiuri *et al.*, 2007), en processos durant el desenvolupament (Winslow *et al.*, 2008), essent una forma de PCD en períodes d'estrès oxidatiu, infeccions o agregació massiva de proteïnes (Mizushima *et al.*, 2007) o com a prevenció del dany al DNA (Mathew *et al.*, 2007).

S'ha demostrat que els autofagosomes s'acumulen en el cervell dels pacients amb diferents malalties neurodegeneratives, com la malaltia d'Alzheimer, encefalopaties espongiformes transmissibles, malaltia de Parkinson, malaltia de Huntington (Williams *et al.*, 2006). S'ha demostrat també la relació entre el dany excitotòxic produït per l'administració de MMDA, la retenció de proteïnes dins el reticle endoplasmàtic, el bloqueig de la PCD i l'autofàgia en models d'excitotoxicitat en embrió de pollastre (Tarabal *et al.*, 2005), així com la relació entre excitotoxicitat, autofàgia i la desregulació de la innervació neuromuscular en aquest mateix model (Calderó *et al.*, 2007). En ratolins amb degeneració cerebel·lar deguda a mutacions en el receptor de glutamat, l'autofàgia ha estat postulada com el mecanisme de mort cel·lular no apoptòtica (Yue *et al.*, 2002). Malgrat això, últimament s'ha proposat que l'autofàgia protegiria les cèl·lules en malalties neurodegeneratives, i que l'acumulació d'autofagosomes comportaria l'inici de l'autofàgia com a resposta fisiològicament beneficiosa (Martínez-Vicente i Cuervo, 2007). L'autofàgia tindria un paper important en el reciclatge d'agregats proteics associats a diferents malalties neurodegeneratives. Ja que aquests substrats necessiten estar desplegats per passar a la ruta proteosomal, els agregats proteics són bons candidats per entrar a la ruta de degradació autofàgica. El mecanisme pel qual aquestes proteïnes exerceixen la seva toxicitat no està clar, però es creu que són més tòxiques en complexos oligomèrics que no pas en grans agregats, d'aquí la seva formació per tal de prevenir aquesta toxicitat (Martínez-Vicente i Cuervo, 2007). Aquesta visió és consistent amb el model pel qual l'autofàgia és un sistema de control de qualitat, l'activació de la qual disminueix la formació i toxicitat d'agregats i la seva inhibició els potencia. L'activació farmacològica de l'autofàgia redueix els nivells de formes solubles i agregats de la huntingtina mutada, proteïnes mutades en l'atàxia espinocerebel·lar, formes mutades de α -sinucleïna i de tau mutada. També redueix la toxicitat cel·lular in vitro i la neurotoxicitat en models de ratolí (Rubinsztein *et al.*, 2007).

La ELA es caracteritza també per la presència dins de les MN d'agregats intracel·lulars i de disfunció mitocondrial (Ross *et al.*, 2004) i s'ha demostrat que l'acúmul de mitocòndries alterades i d'agregats intracel·lulars en les MN de pacients amb ELA està associada a una autofàgia defectiva (Fornai *et al.*, 2008a). A més, quan les MN són tractades amb un inhibidor de l'autofàgia com la 3-metiladenina, MN afectades pateixen greus conseqüències. En canvi, les MN normals no pateixen greus problemes.

Estimulant l'autofàgia amb baixes dosis de liti, utilitzat normalment pel tractament de trastorns bipolars, els agregats intracel·lulars que contenen α -sinucleïna, ubiquitina i SOD1 mutada disminueixen en MN de la medul·la espinal (Fornai *et al.*, 2008b).

El mecanisme molecular pel qual el liti activa l'autofàgia és encara desconegut. Sarkar *et al.*, 2005, han demostrat que l'autofàgia induïda per liti depèn estrictament de la inhibició de la inositol monofosfatasa, que finalment resulta en una reducció dels nivells cel·lulars de l'inositol-1, 4, 5-trifosfat (IP3). IP3 i l'estimulació del seu receptor, IP3R, s'ha vist que redueixen l'autofàgia (Criollo *et al.*, 2007). Així, l'eliminació de IP3 elimina la inhibició i permet la resposta autofàgica davant d'estrès cel·lular com el que provoquen els agregats intracel·lulars proteics.

S'ha observat també un efecte del liti en les mitocòndries de MN de pacients amb ELA (Fornai *et al.*, 2008b), ja que les MN presenten un nombre més elevat de mitocòndries, suggerint que el liti estimula la seva biogènesis.

De sobres és acceptada la participació de l'activació astrocítica en la patogènia de la ELA (Boillée *et al.*, 2006a). Els astròcits activats tenen un actiu paper alliberant factors tòxics i amplificant la resposta tòxica de la micròglia (Nagai *et al.*, 2007). S'ha observat una reducció de GFAP immunopositivitat en la làmina IX de ratolins transgènics SOD1^{G93A} després del tractament amb liti (Fornai *et al.*, 2008b). En models in vitro de cultius cerebel·lars de rata s'ha pogut veure com el tractament amb liti promou la supervivència neuronal tot inhibint el creixement astrocitari (Gilad *et al.*, 2007). El liti podria tenir un doble paper tot promovent la diferenciació neuronal i evitant l'efecte nociu de l'astròglia per les noves neurones formades. El liti per si sol no és capaç d'alterar el nombre de neurones en una medul·la espinal sana, sembla que l'acció neurogènica estaria amplificada només en condicions patològiques.

1.5 Models animals

El descobriment de mutacions en el gen que codifica per la Cu/Zn superòxid dismutasa 1 (SOD1) en determinades famílies va ser ràpidament seguit de la generació de ratolins transgènics que expressaven diferents formes de SOD1 mutada (Rosen *et al.*, 1993, Gurney *et al.*, 1994). A partir del punt on va sorgir el primer model animal de la ELA, el nombre de publicacions referides a aquesta malaltia va augmentar espectacularment, degut al gran ventall de possibilitats que oferia la investigació *in vivo*. Actualment, els models animals són un pilar bàsic i essencial en la investigació de la ELA, ja que permeten fer estudis testant drogues i tractaments de la malaltia (Jackson *et al.*, 2002, Julien and Kriz, 2006). També és interessant l'ús de models animals per investigar ja que permeten establir vincles entre la mutació genètica que tenen i la pèrdua de funció motora que van desenvolupant, cosa que suposa un paral·lelisme amb la progressió de la malaltia humana. Recentment, els estudis de Matsumoto *et al.*, de 2006, i de Thonhoff *et al.*, (2007) mostren la correlació entre el resultat de diferents proves motores, l'estadi de la malaltia i la pèrdua de MNs. Tot i això, cal puntualitzar que els models de rata i ratolí transgènics per la SOD humana mutada permeten treballar un petit aspecte de la malaltia, ja que els casos familiars només representen un 10% de casos d'ELA, i els que involucren la mutació de la SOD1 són només un 20% de casos d'ELA hereditària.

Existeixen diversos tipus de models animals segons la mutació que s'hagi produït.

1.5.1 Ratolins expressors de SOD1 mutada.

Se sap que la toxicitat de la SOD1 no està relacionada amb la seva propietat catalítica. Una hipòtesis que al principi va ser estudiada és que la mutació de la SOD1 augmentaria l'habilitat de l'enzim a utilitzar el peròxid d'hidrogen com a substrat i generar radicals hidroxil que danyarien dianes cel·lulars com membranes lipídiques, proteïnes o el DNA (Wiedau-Pazos *et al.*, 1996). Una altra hipòtesis seria que el malplegament de la SOD1 induïda per mutacions permetria l'accés a substrats no habituals com el peròxid nítric en el lloc catalític, donant-se lloc a la nitració de residus tirosina (Beckman *et al.*, 1993), però aquestes dues hipòtesis no estan recolzades pels estudis amb animals transgènics.

El ratolins knockout, on s'ha inactivat el gen de la SOD1, no desenvolupen la malaltia (Reaume *et al.*, 1996) i tots els ratolins que expressen transgens diferents on l'activitat SOD augmenta (Gurney *et al.*, 1994; Ripps *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1995) o no canvia (Bruijn *et al.*, 1997) desenvolupen la malaltia. A més, l'addició de hSOD1 wild-type no afecta la progressió de la malaltia en ratolins transgènics

SOD1^{G85R}. Finalment, s'ha demostrat que la disminució de l'activitat SOD1 comporta el desenvolupament de la malaltia, com el cas de ratolins transgènics sobreexpressors d'una forma mutada de SOD1 on només hi ha 2 dels 4 residus d'histidina coordinant la unió de l'àtom de Coure en el seu lloc catalític (Wang *et al.*, 2002a).

L'opció més acceptada és que la SOD1 mutada comportaria la formació d'espècies proteiques malplegades i agregats (Durham *et al.*, 1997, Brujin *et al.*, 1998, Johnston *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2002), que podrien disminuir l'eficiència i la capacitat de resposta de les xaperones (Bruening *et al.*, 1999, Batulan *et al.*, 2003) i de la via del ubicuitina/proteosoma (Urushitani *et al.*, 2002).

Basat en els nivells d'expressió de mRNA establerts per Jonsson *et al.*, 2005, la ratio de síntesis de mRNA de SOD1 mutada en ratolins transgènics SOD1^{G93A}, la supervivència del qual és aproximadament 130 dies, és 40 vegades superior al ratio de mRNA de la SOD1 endògena. Per altres tipus de ratolins transgènics, com el G85R, D90A, G93Adl i G127X, amb un desenvolupament de la malaltia més lent, la ratio es correspon a unes 20 vegades la ratio de la SOD1 normal. Així, alts nivells dels mRNA de SOD1 semblen ser necessaris pel desenvolupament de la malaltia. A més, l'esperança de vida dels ratolins transgènics sembla ser inversament proporcional al nombre de còpies del gen mutat. Els nivells de SOD1 mutada en les medul·les espinals poden variar àmpliament entre diferents ratolins transgènics. El nivell de SOD1 mutada en un ratolí jove G93A és unes 17 vegades major que el nivell de SOD1 endògena, mentre que en un ratolí jove G85R o G127X, la proteïna mutada és de l'ordre del 90% i 45% respectivament de la SOD1 del ratolí (Jonsson *et al.*, 2005).

Malgrat els baixos nivells de SOD1 humana en ratolins transgènics joves G85R, G127X i L126Z, la seva esperança de vida és molt similar a ratolins G37R o G93A, que expressen alts nivells de la proteïna humana en edats presimptomàtiques. Cal destacar que aquests ratolins transgènics també mostren agregats en la seva medul·la espinal detergent-insolubles en edats avançades (Brujin *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2005, Jonsson *et al.*, 2005). Cal tenir en compte que els ratolins transgènics expressors de la SOD1^{L126Z}, amb nivells de mRNA comparables a altres models animals, mostren sempre nivells baixos de la proteïna mutada (Wang *et al.*, 2005).

Els anàlisis patològics del ratolí transgènic SOD1^{G93A} a diferents edats a les unions neuromusculars, arrels ventrals i medul·la espinal mostren que la patologia de la MN comença a la part més distal de l'axó i progressa amb un patró retrògrad o de "dying back" (Fisher *et al.*, 2004). Així, aquest ratolí transgènic mostra denervació

molt abans de la pèrdua neuronal. El fet que no es detecti proteïna mutada SOD1^{L126Z} en fibres nervioses distals en el ratolí transgènic suggeriria que el dany directe als axons per part de la SOD1 mutada no és responsabilitat directe del mecanisme de dying back (Wang *et al.*, 2005).

Al 2002, Howland *et al.* van publicar el primer model de rata transgènica per la SOD1. La justificació d'aquest model resideix en què permet estudiar la malaltia en un animal de dimensions més grans, podent investigar, per exemple, el seu líquid cefalo-raquidi (CSL), de 10 a 20 vegades més que en el ratolí, permetent l'obtenció de suficient teixit per anàlisis bioquímics com modificacions post-traduccionals de proteïnes com la SOD (Nagai *et al.*, 2001) o fent proves motores, més fàcilment practicables a animals més grans (Matsumoto *et al.*, 2006).

1.5.2 Ratolins amb alteracions en filaments intermediaris (IF)

En la dècada passada, la manipulació genètica va ser utilitzada per investigar el paper de les proteïnes dels neurofilaments en la funció neuronal i en processos patològics. Els ratolins knockouts per proteïnes dels IF, com per exemple periferines o α -intermexina no desenvolupen grans defectes de desenvolupament o la malaltia de la MN (Rao *et al.*, 1998, Elder *et al.*, 1998, 1999). Tot i això, deficiències en IF no són totalment innòcues. La reducció del calibre dels axons mielinitzats sense la proteïna L de neurofilament (NF-L) està acompanyada per una reducció dels 50% de la velocitat de conducció (Kriz *et al.*, 2000), una condició que podria ser fatal per un gran nombre d'espècies animals.

En el ratolí knockout per periferina, el nombre i calibre d'axons sensorials i motors en les arrels de L5 no varia, però hi ha una reducció substancial d'un 34% en el nombre d'axons sensorials no mielinitzats, demostrant els requeriments de periferina pel bon desenvolupament de les neurones sensorials (Larivière *et al.*, 2003).

La sobreexpressió en ratolins de qualsevol de les tres subunitats de neurofilament pot provocar l'acumulació de neurofilament en l'interior dels cossos cel·lulars (Cote *et al.*, 1993). Per exemple, una gran expressió de proteïnes NF-H humanes causa una acumulació de neurofilament pericarial. L'acúmulo de neurofilament en els cossos cel·lulars porta com a conseqüència una atròfia dels axons motors i conductivitats axonals alterades, però sense mort neuronal. Sorprenentment, la sobreexpressió de NF-L en ratolins transgènics per NF-H redueix els acúmulo pericarials i rescata de la disfunció de la MN, demostrant la importància de l'equilibri entre subunitats pel bon ensemblatge i transport dels neurofilaments (Meier *et al.*, 1999, Kriz *et al.*, 2000).

Ratolins expressors de NF-L mutada, amb una expressió del 50% de proteïna NF-L endògena, experimenten a les 4 setmanes de vida una massiva pèrdua de MNs. No obstant, els mecanismes exactes de toxicitat de la NF-L mutada són desconeguts encara (Lee *et al.*, 1994).

La sobreexpressió de periferina wild type en ratolins causa una selectiva pèrdua de MNs durant l'envelliment en aquests animals (Beaulieu *et al.*, 1999). L'inici de la mort neuronal s'avança per l'absència de NF-L, com ho demostren els creuaments de ratolins transgènics per periferina amb ratolins knockout per NF-L. Això podria estar relacionat amb el fet que en la ELA hi ha una reducció dels nivells de mRNA de NF-L en MNs afectades. A més això induiria a la formació d'inclusions de IF pericarials i axonals, semblants als esfèroides en MNs de la ELA humana (Wong *et al.*, 2000).

La toxicitat de la sobreexpressió de periferina en ratolins podria estar relacionada amb la localització axonal dels agregats de IF. Això està recolzat pel rescat de la mort de MNs per la sobreexpressió del transgen de NF-H (Beaulieu *et al.*, 2003). Una explicació seria que aquest acúmulo de periferina redueix la formació d'acúmulos de IF axonals. Altres mecanismes podrien contribuir a la toxicitat de la sobreexpressió de periferina. En estudis *in vitro* s'ha demostrat que les neurones dels ganglis d'arrels dorsals (Dorsal Root Ganglion, DRG) d'embrions de ratolins transgènics moren quan es desenvolupen en un medi ric en micròglia activada (Robertson *et al.*, 2001), suggerint que els agregats de periferina poden predisposar les neurones als efectes d'un ambient proinflamatori. Per investigar el paper de la periferina en la malaltia causada per mutacions de la SOD1 es van generar ratolins transgènics SOD1^{G37R} sense periferina o sobreexpressors de la mateixa (Larivière *et al.*, 2003). L'excés o el defecte de periferina no afecta l'inici i la progressió de la malaltia en aquest tipus de ratolins. Això podria fer arribar a la conclusió que la periferina no seria un element clau que contribuiria en la degeneració de motoneurons associada a la toxicitat de la SOD1 mutada. Tot i això, cal tenir en compte el baix percentatge que les mutacions de la SOD1 representen en el global de la ELA, i podria ser possible que la periferina contribuís a la degeneració de MNs en casos d'ELA amb altres etiologies.

El descobriment de fenòmens d'splicing alternatiu en periferina que resultaria tòxica (Robertson *et al.*, 2003) i de mutacions en el gen de periferina en un cas d'ELA humana (Gros-Louis *et al.*, 2004) recolzarien aquesta idea.

1.5.3 Ratolins amb defectes en el transport de microtúbuls

La creació de ratolins heterozigots pel gen de la kinesina KIF 1B demostra que defectes en el transport axonal poden provocar neurodegeneració. Aquests ratolins

mostren defectes en el transport de precursors sinàptics de vesícules, i pateixen una progressiva debilitat muscular similar a neuropaties humanes. Aquest descobriment va portar a la identificació d'una mutació amb pèrdua de funcionalitat en el domini motor del gen KIF 1B en malalts de Charcot-Marie-Tooth tipus 2A (Zhao *et al.*, 2001).

La dineïna és una molècula motora involucrada en el transport axonal retrògrad d'òrgànuls a través de microtúbuls. L'activitat de la dineïna requereix l'associació amb dinactina, un complex multiproteic que activa la funció motora de la dineïna. La sobreexpressió de la subunitat p50 de la dinactina, la dinamitina, desfà el complex dineïna-dinactina i inhibeix la seva activitat motora. S'ha demostrat que ratolins transgènics sobreexpressors de dinamitina desenvolupen una malaltia de la MN semblant a la ELA (LaMonte *et al.*, 2002). Altres ratolins mutants anomenats Loa (Legs and odd angles) i Cra1 (cramping1), aconseguits per mutagènesis amb N-etil-N-nitrosourea, porten mutacions sense sentit en el gen de la cadena pesada de la dineïna (Hafezparast *et al.*, 2003). Aquests ratolins heterozigots desenvolupen una malaltia de la MN deguda al mal funcionament del transport retrògrad.

Tau és una proteïna associada a l'estabilitat dels microtúbuls. Existeixen 6 isoformes derivades d'un únic gen via splicing alternatiu del transcrit primari. Anormalitats en aquesta proteïna en humans es coneixen com a taupaties, i s'hi inclouen malalties com Alzheimer o la malaltia de la MN associada a demència i parkinsonisme de la illa de Guam. Ratolins transgènics sobreexpressors de la isoforma més curta de la tau desenvolupen degeneració axonal en neurones espinals i debilitat motora (Ishihara *et al.*, 1999). Aquests ratolins transgènics es caracteritzen per la presència d'agregats filamentosos de proteïna tau hiperfosforilada, no només en el còrtex i tronc de l'encèfal, sinó també en neurones espinals (Trojanowski *et al.*, 2002). Les inclusions contenen filaments tau-positius de 10 a 20 mm de llargada. També s'ha detectat gliosis en la medul·la espinal amb degeneració d'axons en les arrels ventrals. Els neurofilaments estan associats a aquests agregats, demostrant que anormalitats en la proteïna tau poden afectar directament els neurofilaments. Creuaments amb ratolins transgènics per la tau amb knockouts per NF-L mostren un alleujament de la malaltia ocasionada per la tau relacionada amb un menor contingut de neurofilament (Ishihara *et al.*, 2001).

1.5.4 Ratolins knockout per ALS2

Al 2001, Hadano *et al.*, van publicar una deleció en un nou gen anomenat ALS2 en pacients joves malalts d'una forma autosòmica recessiva d'ELA. El gen ALS2 s'expressa ubíquament, i codifica per una proteïna amb dominis homòlegs a GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), que se sap que activen petites GTPases pertanyents a la família Ras. Els dominis RCC-like, DH/PH i VPS9 són GEF per petites GTPases com Ran (Ras-related nuclear), Rho (Ras homologous member) i Rab5 (Ras related in brain 5) respectivament. Ratolins knockout per ALS2 han estat generats (Cai *et al.*, 2005, Hadano *et al.*, 2006), mostrant que l'absència de Als2 no produeix alteracions severes en ratolins. No obstant, els estudis realitzats per Cai *et al.*, 2005 demostren que aquest ratolí desenvolupa dèficits en coordinació motora edat-depenent, i els cultius primaris, les MNs sense Als2 són més susceptibles a l'estrès oxidatiu. El grup de Hadano han demostrat que aquests ratolins mostren una pèrdua progressiva de cèl·lules de Purkinje cerebel·lars, una reducció dels axons motors ventrals durant l'envelliment, astrogliosis i dèficits en el transport endosomal.

El knockout generat per Julien (Gros-Louis *et al.*, 2008) mostra una degeneració motora mitjana, determinada pel test Rotarod. Així, la microscòpia electrònica revela canvis patològics, com la presència d'axons degenerants en tractes corticoespinals.

1.5.5 Ratolins amb alteracions en l'element de resposta a la hipòxia.

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) és una citokina crucial per l'angiogènesis. El transtorn dirigit en ratolins VEGF δ/δ en l'element de resposta a la hipòxia en el gen de VEGF comporta dèficits motors els 5-7 mesos d'edat, amb canvis semblants a la ELA com acúmuls de neurofilaments en neurones motores del tronc de l'encèfal i medul·la espinal (Oosthuyse *et al.*, 2001). El mecanisme de la malaltia encara no està clar, però s'ha suggerit que una insuficiència vascular crònica i la pèrdua de la neuroprotecció per VEGF podria resultar en la degeneració de les MNs. Els ratolins fruit del creuament de ratolins SOD1^{G93A} amb VEGF δ/δ moren aviat degut a una degeneració motora severa (Lambrechts *et al.*, 2003) i a més hi ha una evidència de desregulació en la resposta a la hipòxia en malalts amb ELA (Moreau *et al.*, 2006).

1.6 Els receptors purinèrgics.

La primera vegada que es va proposar l'ATP com a responsable de la transmissió noradrenèrgica va ser al 1972 per Burnstock. Al principi hi va existir una resistència a creure el fet que l'ATP podia jugar un paper important en processos bioquímics, i

que podia ser utilitzat com a missatger extracel·lular; el concepte de transmissió purinèrgica porta implícit l'existència de receptors postsinàptics. Els receptors purinèrgics van ser definits per primera vegada al 1976 per Burnstock. Dos anys més tard van ser definides les bases per distingir els dos tipus de purinoreceptors, identificats com a P1 i P2 (per adenosina i per ATP/ADP respectivament). Una mica després, dos subtipus de receptors P1 van ser definits (van Calcar *et al.*, 1979), però no va ser fins al 1985 quan es va proposar una base farmacològica per distingir els dos tipus de receptors P2 (P2X i P2Y) (Burnstock i Kennedy, 1985). Al 1994 Abbracchio i Burnstock, en la base de l'estructura molecular i els mecanismes de transducció, van proposar que els receptors purinèrgics podrien pertànyer a dos famílies majors: la família P2X lligada a canals iònics i la família P2Y lligada a proteïnes G (Figura 2). Aquesta nomenclatura ha estat adoptada arreu i s'han definit 7 tipus de receptors P2X i 8 tipus de receptors P2Y, on s'inclouen receptors sensibles tan a pirimidines com a purines (Ralevic *et al.*, 1998, North *et al.*, 2002). S'ha comprovat que la senyalització purinèrgica és un sistema primitiu involucrat en mecanismes neuronals i no-neuronals, incloent secreció endocrina i exocrina, respostes immunes, inflamació, agregació plaquetària i vasodilatació (Burnstock *et al.*, 2004). La proliferació, la diferenciació i la mort cel·lular que tenen lloc durant el desenvolupament i regeneració també estan regulades per receptors purinèrgics (Abbracchio i Burnstock, 1998).

Els primers cDNAs codificants per P2X van ser aïllats al 1994. Els membres de la família de receptors ionotòpics P2X₁₋₇ mostren una subunitat amb motius consensuats de protein-kinases, dos de regions transmembrana (TM1 i TM2) amb varies lisines conservades, un loop extracel·lular amb 10 cisteïnes conservades formant una sèrie de ponts disulfur, una regió hidrofòbica H5 i un lloc d'unió a ATP, que pot incloure les regions del loop extracel·lular adjacent a TM1 i TM2 (Figura 3). Els receptors P2X₁₋₇ mostren del 30-50% d'identitat en la seqüència peptídica (North *et al.*, 2002, Stojilkovich *et al.*, 2005). Per l'estequiometria d'aquests receptors, es creu que involucren tres subunitats, que formen trímers o hexàmers de trímers units. Es creu també que 3 molècules d'ATP es poden unir als dominis extracel·lulars (North *et al.*, 2002).

La llargada dels receptors pot variar de 384 aminoàcids per P2X₄ a 595 aminoàcids per P2X₇ (Roberts *et al.*, 2006). Tots tenen dues regions hidrofòbiques i tots tenen seqüències consens per N-glicosilació. Existeixen 7 gens per les subunitats de P2X. Per P2X₄ i P2X₇ els gens estan localitzats a prop de l'extrem del braç llarg del cromosoma 12 (North *et al.*, 2002), i són els receptors més semblants pel que fa la seqüència d'aminoàcids. Totes les proteïnes tenen de 11 a 13 exons, i totes comparteixen una estructura comuna, amb les límits exó-intró ben definits.

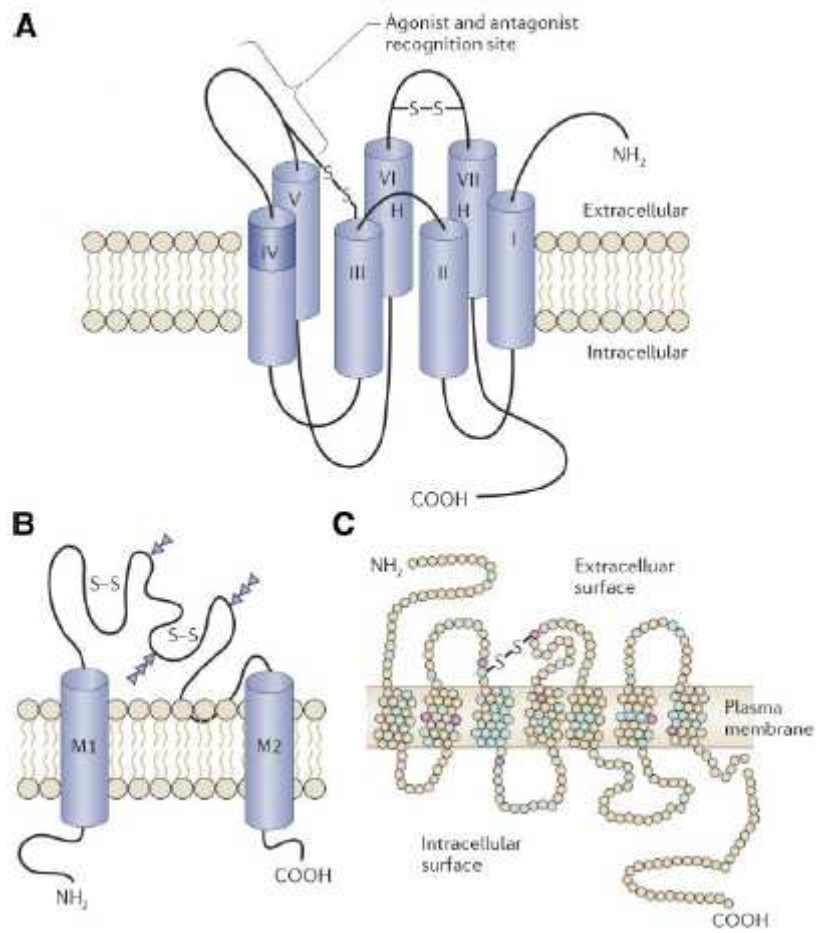


Figura 2: Receptors d'adenosina i ATP extracel·lular de membrana. A. La família de receptors P1 per adenosina extracel·lular són proteïnes tipus G associades a receptors. B. La família P2X està associada a canals iònics. C. La família P2Y són proteïnes tipus G associades a receptors (de Burnstock *et al.*, 2007).

En invertebrats no hi ha constància de seqüències homòlogues, malgrat existeix l'evidència funcional que l'ATP extracel·lular i altres nucleòtids actuen en canals iònics en invertebrats (Roberts *et al.*, 2006).

Se sap que els receptors P2X estan àmpliament expressats en el sistema nerviós, tant en neurones com en glia (North *et al.*, 2002), i tant P2X₂ com P2X₄ s'han localitzat en sinapsis excitadores en cervell (Rubio *et al.*, 2001), en regions on el receptor AMPA es troba en baixa densitat.

Aquests receptors tenen un paper important en la inflamació, descobert arran que l'ATP estava relacionat en el processament de citokines pro-inflamatòries, particularment interleukina 1 i interleukina 6, ja que els macròfags del ratolí

deficient per P2X₇, no produeixen interleukina1b en resposta a ATP (Solle *et al.*, 2001)

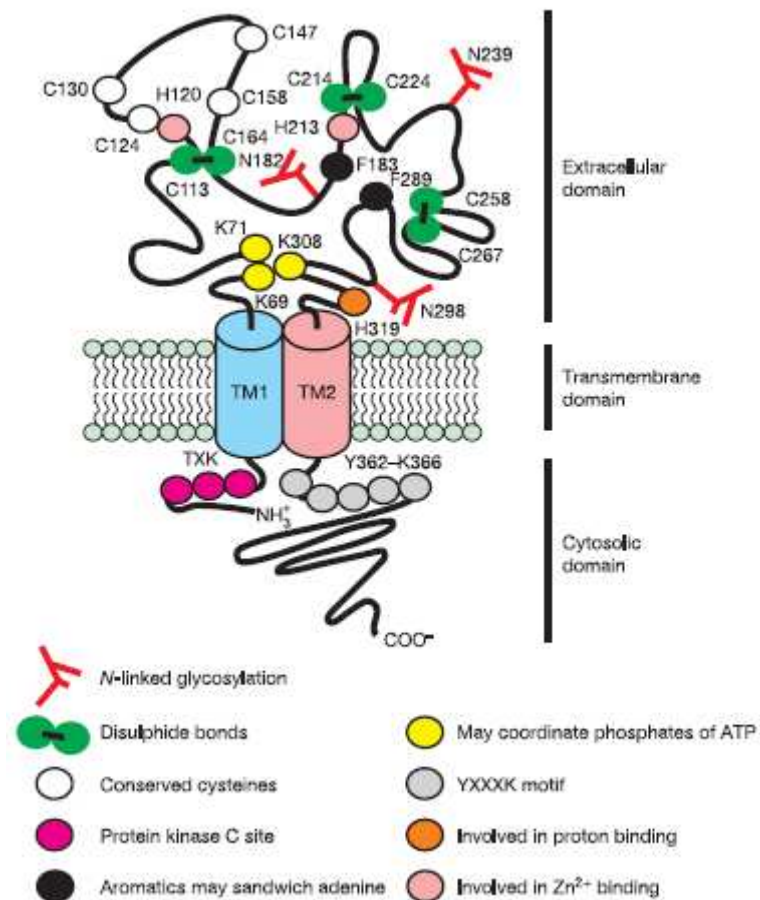


Figura 3: Estructura dels receptors P2X (de Khakh *et al.*, 2006).

La farmacologia dels subtipus de receptors P2X recombinants expressats en oòcits o altres tipus cel·lulars sovint és diferent de la farmacologia d'aquests receptors en condicions naturals (Gever *et al.*, 2006). Molts factors poden contribuir en aquestes diferències. Primer, els heteromultímers i els homomultímers estan involucrats en la formació del canal (Nicke *et al.*, 1998). Per exemple, els heteromultímers estan clarament establerts per P2X_{2/3}, P2X_{1/2}, P2X_{1/5}, P2X_{2/6}, P2X_{4/6}, i per P2X_{1/4}. Els receptors P2X₇ no formen heteromultímers. Segon, variants d'splicing de P2X poden jugar papers importants, com una variant de P2X₄ que no és funcional per sí sola, pot potenciar l'acció de l'ATP (Townsend-Nicholson *et al.*, 1999).

1.6.1. P2X₄.

Els receptors P2X són àmpliament expressats, no només en sistema nerviós, sinó en molts altres tipus cel·lulars. P2X₄ s'ha trobat en molts teixits, i el seu paper en epitelis i endotelis ha portat un interès particular. En epitelis hi ha molts d'aquests receptors, com en glàndules salivals i en l'epiteli bronquiolar. En els bronquiols, els receptors semblen tenir el paper de manteniment del moviment dels cilis que mouen la capa mucosa (Ma *et al.*, 2006).

El primer fenotip descrit pel ratolí knockout per P2X₄ va ser l'increment de la pressió sanguínia. En l'epiteli vascular, l'elevació del calci intracel·lular és degut a l'entrada de calci via receptor P2X₄. En absència de P2X₄, s'obté menys òxid nítric i la vasodilatació normal evocada per increment de flux sanguini és menor. El ratolí knockout té una pressió sanguínia més alta que els animals control, i no mostra cap adaptació com a resposta a aquesta disfunció en la pressió de la sang (Yamamoto *et al.*, 2006).

1.7 Perspectives terapèutiques

1.7.1 Fàrmacs

De moment no existeix cap tractament farmacològic efectiu per la ELA (Jackson *et al.*, 2002). El riluzol, un antagonista del glutamat, és l'únic medicament aprovat pel tractament de la ELA. El tractament va ser aprovat als Estats Units al 1995 després de dos assajos clínics independents que augmentaven modestament l'esperança de vida en malalts d'ELA (Bensimon *et al.*, 1994, Lacombez *et al.*, 1996). Malauradament, aquests malalts no mostraven enlentiment en la progressiva pèrdua de força ni millora de la funció muscular. Malgrat la seva eficàcia limitada, els resultats amb riluzol donaven suport a la hipòtesis del component excitotòxic per glutamat en les rutes de mort cel·lular en la ELA. En ratolins transgènics SOD1^{G93A}, el riluzol és capaç d'augmentar l'esperança de vida entre 10 i 15 dies, sense afectar l'inici de la malaltia (Gurney *et al.*, 1998).

Des de fa dues dècades hi ha hagut un gran nombre de proves i test en milers de pacients d'ELA. Molts s'han basat en l'eficàcia en models animals, que mostren algunes de les característiques de la ELA humana, i molts han obtingut resultats negatius en l'assaig humà. Això inclou assajos amb BDNF (Kasarkis *et al.*, 1999), amb CNTF (Akbar *et al.*, 1997) o IGF1 (Borasio *et al.*, 1998).

Altres medicaments testats han tingut només un efecte més aviat modest en models animals, com per exemple la vitamina E o la Gabapentina (Gurney *et al.*, 1996). S'ha comprovat també que la injecció intra cerebroventricular de N-Benziloxilcarbonil-Val-Ala-Asp-Fluorometilketona (zVAD-fmk) en ratolins transgènics SOD1^{G93A} augmenta la neuroprotecció, augmentant l'esperança de vida d'aquests ratolins uns 27 dies (Li *et al.*, 2000). El tractament amb Celecoxib s'ha trobat que retrassa l'inici de la debilitat muscular i pèrdua de pes, allargant la supervivència un 25%. Aquesta droga és un inhibidor de la Ciclooxygenasa 2 (Cox-2), un enzim que juga un important paper en el procés inflamatori i en la producció de prostaglandines, que poden estimular l'alliberament de glutamat per part dels astròcits (Drachman *et al.*, 2002). La minociclina, una tetraciclina de segona generació amb propietats antiinflamatòries, incrementa la supervivència en dos ratolins transgènics diferents, utilitzant pautes d'administració diferents (Kriz *et al.*, 2002, Van den Bosch *et al.*, 2002). La minociclina podria conferir neuroprotecció mitjançant diverses rutes, reduïnt l'activació microglial, caspasa-1, caspasa-3, iNOS, p38 MAP kinasa i l'alliberació de citocrom C en mitocòndries. A més, l'addició de riluzol i nimodipina encara augmenten més la supervivència de la minociclina (Kriz *et al.*, 2003). Un altre antibiòtic, el β -lactàmic ceftriaxone, confereix certa protecció en models animals d'ELA, presumiblement a través de l'elevació de l'expressió del transportador de glutamat EAAT2 (Rothstein *et al.*, 2005). Una elevació de EAAT2 podria atenuar la neurotoxicitat per glutamat.

Aquestes i altres drogues que s'han testat prèviament amb models animals actualment s'estan testant amb estudis clínics realitzats en humans amb ELA (Traynor *et al.*, 2006), amb resultats en alguns casos prou esperançadors. Tot i això, cal tenir en compte que els resultats obtinguts amb models animals no sempre es reproduïen en humans, com és el cas de la creatina, que en ratolins transgènics, administrada amb l'aigua, allarga la seva longevitat (Klivenyi *et al.*, 1999), però que no té efectes en pacients humans d'ELA (Groeneveld *et al.*, 2003).

Un exemple de nous medicaments a testar és el tamoxifen. El tamoxifen és un inhibidor de la protein kinasa C, d'ús comú en quimioteràpia contra el càncer de mama. A partir de l'observació d'una pacient amb ELA que desenvolupà a més un càncer de mama, el tractament del qual amb tamoxifen produí una millora clínica en la seva força muscular, s'han desenvolupat assajos clínics amb aquest fàrmac per validar la possible aplicació generalitzada en la ELA (Traynor *et al.*, 2006).

Així, els resultats en animals s'han d'interpretar amb precaució. Cal tenir en compte factors com ara les farmacocinètiques, les vies d'administració dels medicaments i

el seu temps d'administració. També cal tenir en compte que aquests models animals representarien només el 2% del total de casos d'ELA humana.

1.7.2 Factors neurotròfics i teràpia gènica

Els factors neurotròfics (FNTs) són proteïnes que tenen la propietat d'afavorir la supervivència de determinats tipus neuronals, i a més, en alguns casos promouen també la regeneració axonal o la diferenciació durant l'embriogènesis. A partir del descobriment del *nerve growth factor* (o NGF, primer factor neurotròfic, identificat per Rita Levi Montalcini i Stanley Cohen al 1956, fet pel qual van rebre el Premi Nobel de Medicina al 1986) i especialment en les últimes dècades, s'han identificat molts altres FNTs, cada un amb característiques pròpies en quant a especificitat d'acció sobre els diferents tipus neuronals. Per exemple, el NGF té una important acció promotora de la supervivència de neurones del sistema nerviós perifèric sensorial i simpàtic. Els FNTs es troben normalment en petites quantitats en diversos teixits de l'organisme, tot i que poden obtenir-se en quantitats notables en forma recombinant per processos biotecnològics. Els factors que es mostren actius promovent la supervivència de MNs han despertat, lògicament, l'interès en el context de la ELA. Entre ells cal destacar el *ciliary-derived neurotrophic factor* o CNTF, la *cardiotrophin 1* o CT-1, el *glial cell-derived neurotrophic factor* o GDNF, el *insulin-like growth factor* o IGF-1 i el *vascular endothelial cell growth factor* o VEGF. L'ús dels factors neurotròfics com agents terapèutics en malalties neurodegeneratives planteja el problema de la seva administració, ja que són productes que deuen actuar sobre les neurones a través de receptors específics i no poden travessar la barrera hematoencefàlica. Per tal de fer arribar aquests factors a la seva diana cal injectar-los directament en el líquid cefaloraquídi, a l'interior de les cavitats ventriculars del cervell, o per via intratecal, per infusió a través d'un catèter i una bomba. Una alternativa a aquest procediment és la implantació intracerebral de cèl·lules manipulades genèticament amb l'objectiu que secretin FNTs, aconseguint així una font més permanent d'aquests factors en les àrees afectades. D'altra banda, les MNs situades a la medulla espinal, que projecten els axons cap a músculs, podrien ser diana de la injecció intramuscular de FNTs, ja que aquests podrien ser captats pels terminals neuromusculars i transportats retrògradament al cos cel·lular de les MNs espinals. Una altra estratègia seria aconseguir la síntesis d'un factor neurotròfic en la pròpia MN, que hauria estat transfectada per un vector viral adequat, injectat al múscul. Totes aquestes possibilitats han estat ja testades experimentalment (Miller *et al.*, 2006) i, malgrat les primeres decepcions pel que fa el IGF1 (Borasio *et al.*, 1998), BDNF (BDNF

StudyGroup, 1999) o CNTF (ALS CNTF Treatment StudyGroup, 1996) després s'han aconseguit resultats satisfactoris, com en el cas de la injecció intramuscular d'adenovirus com vectors d'expressió de IGF-1 (Kaspar *et al.*, 2003) o la injecció intratecal (Nagano *et al.*, 2005). Un altre factor que ha despertat gran interès és el VEGF. Aquest és un element crucial en el control del creixement dels vasos sanguínis, encara que també s'ha descrit l'acció tròfica sobre les MNs, cosa important respecte les implicacions en la ELA (Wang *et al.*, 2007). Primerament cal dir que s'han identificat polimorfismes en la regió promotora del gen del VEGF que constitueixen un factor de risc de patir ELA (Chen *et al.*, 2007).

L'administració de vectors virals expressors de VEGF incrementa en un 30% l'expectativa de vida de ratolins amb ELA (Azzouz *et al.*, 2004, Lambrechts *et al.*, 2006) però el més interessant és que la infusió intracerebroventricular de VEGF recombinant en rata ha millorat també l'expectativa de vida i els símptomes dels animals transgènics (Storkebaum *et al.*, 2004).

El GDNF està descrit com un dels factors més potents per la supervivència neuronal. Quan aquest és expressat en astròcits, la mort cel·lular programada (PCD) es redueix durant el període embrionari, a més de promoure la supervivència neuronal post-axotomia (Zhao *et al.*, 2004). També s'ha vist que adenovirus que expressen GDNF prevenen de mort neuronal i allarguen l'esperança de vida de ratolins transgènics SOD1^{G93A} (Wang *et al.*, 2002). Malgrat tot, Guillot *et al.* (2004) han demostrat que una forta expressió de GDNF mediada per lentivirus en la zona lumbar no té efecte en MNs espinals malaltes.

1.7.3 Teràpia gènica

Amb el descobriment de que la mutació a la proteïna SOD1 comportava una propietat tòxica de la proteïna (Reaume *et al.*, 1996), les estratègies per limitar el producte gènic mutant són una eina terapèutica a tenir en compte. Hi ha dues estratègies: RNA silencing (si RNA) i l'utilització d'oligonucleòtids sense sentit. Els experiments utilitzant siRNA codificat en lentivirus i injectat en múscul de ratolins transgènics joves SOD1^{G93A} han augmentat l'edat d'inici de la malaltia en 108 dies i la seva esperança de vida en 99 dies (Ralph *et al.*, 2005). Tot i això, amb aquesta eina la malaltia no es aturada completament, segurament pel fet que el silenciament pot arribar a les MNs, via transport retrògrad, però no a altres cèl·lules del sistema nerviós central.

La injecció viral directa en la medul·la espinal i l'ús del RNA d'interferència, dirigida a les MNs i les cèl·lules veïnes, retrassa la seva degeneració en models animals, però no està determinat si afecta la progressió de la malaltia (Raoul *et al.*, 2006).

Els vectors virals actuals no presenten cap tipus de mecanismes per modular la dosis i la continuïtat de la teràpia, a més de la problemàtica de tenir com a diana grans àrees del SNC.

L'altra alternativa seria l'administració d'oligonucleòtics en el SNC, de petites seqüències de nucleòtids (15-25) que s'unirien a mRNA de forma seqüència-específica. El RNA com a heterodúplex seria substrat a degradació catalítica i intranuclear per RNAases endògenes. Aquesta premisa ha estat utilitzada amb èxit mitjançant injecció intraventricular en rosegadors i en primats per Smith *et al.*, (2006), donant un punt de referència a la teràpia amb humans.

Aquests estudis estableixen que l'administració d'oligonucleòtics anti-sense pot ser efectiva i dosis-regulable per tractar malalties neurodegeneratives com la ELA. A més, la injecció directa de dúplex de siRNA aporta una possibilitat terapèutica addicional, incloent la possibilitat de dirigir el mRNA cap a la forma mutada i no la *wildtype* (Xia *et al.*, 2006)

1.7.4 Cèl·lules mare

La selectiva i edat-depenent mort de les MNs en la ELA ha fet d'aquesta malaltia una candidata a utilitzar la substitució de les cèl·lules malmeses per cèl·lules mare. Les cèl·lules mare són cèl·lules totipotencials aïllades de teixits embrionaris o també adults que, adequadament tractades, poden diferenciar-se en virtualment qualsevol tipus cel·lular adult, obrint així una nova forma de teràpia cel·lular regenerativa en la que les cèl·lules malmeses són potencialment substituïdes per noves cèl·lules (Nayak *et al.*, 2006). Tot i això, s'originen problemes ètics perquè la font essencial de les cèl·lules mare més potents són embrions humans (Cibelli, 2007). Els embrions produïts per fecundació *in vitro* (FIV) o provinents d'avortaments van ser la primera font per investigacions sobre cèl·lules mare humanes.

Les estratègies utilitzades amb ratolins SOD1^{G93A} serien: a. Cèl·lules mare humanes injertades en la medul·la espinal (Yan *et al.*, 2006). b. Cèl·lules humanes de cordó umbilical transfusionades a la circulació sistèmica (Garbuzova-Davis *et al.*, 2003). c. transplantament de cèl·lules de medul·la òssia (Corti *et al.*, 2004).

Una altra idea és l'estimulació del conjunt de cèl·lules mare endògenes per tal de substituir les MNs degenerants. En ratolins SOD1^{G93A} s'ha observat un increment de proliferació de cèl·lules neurals precursors, de la migració i neurogènesis en la regió lumbar de la medul·la espinal en resposta a la degeneració de MNs (Chi *et al.*, 2006). Recentment s'ha aconseguit la diferenciació *in vitro* de cèl·lules mare induïdes provinents d'una pacient amb ELA familiar amb mutació a la SOD1^{L144F} a

MN, obrint encara més portes a la recerca de teràpies utilitzant aquesta troballa com a nou model d'experimentació (Dimos *et al.*, 2008).

Existeixen resultats experimentals que indiquen que les cèl·lules mare de medul·la òssia tenen efectes neuroprotectors, augmentant l'esperança de vida i disminuint les afectacions motores de ratolins transgènics per la hSOD1 (Huang *et al.*, 2006). També s'ha demostrat com les cèl·lules mare tenen efectes neuroprotectors sobre la excitotoxicitat mediada per glutamat en MNs en cultiu i, una vegada implantades en el nervi perifèric poden prevenir *in vivo* la mort de MNs induïda per lesió del nervi perifèric (Lladó *et al.*, 2004).

Experiments on s'han utilitzat models de mort aguda de MNs mostren que implants de cèl·lules mare dins la medul·la espinal poden produir axons funcionals que inervin múscul (Gao *et al.*, 2005; Deshpande *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). Les condicions de diferenciació alterades produïrien un gran nombre de MNs derivades de les cèl·lules mare, i es generarien altres tipus de connexions a més de les unions neuromusculars (Deshpande *et al.*, 2006).

El fet que les segones MNs tinguin el seu coscos cel·lulars repartits al llarg de tota la medul·la espinal implicaria pel tractament múltiples injeccions espinals en tots els nivells. Així, encara que els problemes d'inhibició de creixement axonal en el SNC se superessin, el re-creixement i correcta unió dels llargs axons amb la seva diana requeririen com a mínim un any assumint la màxima velocitat de creixement axonal, observada en el desenvolupament postnatal.

Altres estudis assenyalen que cèl·lules mare que han derivat en microglia, funcionals, poden migrar selectivament dins el cervell però no en teixits perifèrics després d'un transplantament intravenós. La supressió farmacològica de l'activació microglial derivada de cèl·lules mare en models de ratolins transgènics d'ELA pot retardar la progressió de la malaltia (Tsuchiya *et al.*, 2005; Beers *et al.*, 2006; Boillee *et al.*, 2006b).

Amb el reconeixement de la contribució a la toxicitat de cèl·lules no-neuronals (Boillee *et al.*, 2006b, Clement *et al.*, 2003), altres estratègies amb *stem cells* es podrien utilitzar per substituir aquests precursors no-neuronals.

1.7.5 Immunoteràpia

Estudis realitzats per Moalem *et al.*, (1999) han demostrat que la recuperació de neurones danyades del SNC requereixen l'activitat de cèl·lules del Sistema Immune contra proteïnes emmagatzemades dins d'aquestes neurones, introduint així el terme d'autoimmunitat protectora (Schwartz *et al.*, 1999).

Així, la potenciació de l'autoimmunitat és una candidata pel que fa les teràpies de les malalties neurodegeneratives. S'ha comprovat l'efectivitat de vacunes protectores contra condicions degenerants en models animals (Kipnis *et al.*, 2000). Un agonista capaç d'activar cèl·lules T autoreactives podria proporcionar una teràpia per diverses malalties neurodegeneratives. L'acetat glatiramer, o copolímer-1 (Copaxone®, Cop-1) és un clar candidat. Aquesta substància, administrada diàriament, és un tractament utilitzat per l'esclerosi múltiple (Sela *et al.*, 1999).

Una sola immunització amb Cop-1 s'ha vist que evoca resposta de les cèl·lules T. Aquestes cèl·lules són atretes per certs antígens de llocs danyats del SNC, resultant en la producció de citokines i de factors de creixement però no en la seva proliferació. El Cop-1 pot passar les barreres específiques i potenciar la supervivència neuronal en diferents models animals de degeneració del SNC (Schori *et al.*, 2001).

Resultats positius també han estat trobats per Avidan *et al.*, 2004, que utilitzant un model de lesió intraocular per injecció de proteïna β -amiloide han trobat que la vacunació amb Cop-1 produeix una activació de la micròglia via activació de cèl·lules T, beneficiosa per reduir la pèrdua de neuronal ocular.

En models animals transgènics s'ha comprovat l'efectivitat de la immunoteràpia. S'ha comprovat que en ratolins transgènics SOD1^{G73R} s'allarga l'esperança de vida immunitzant repetidament amb anticossos anti SOD1 mutada abans de l'aparició dels símptomes. No passa això amb ratolins SOD1^{G93A}, però en aquest cas, fent immunització passiva mitjançant injecció intraventricular, es poden alleujar els símptomes i allargar també l'esperança de vida (Urushitani *et al.*, 2007).

Pel que fa el tractament de la ELA, trobem que alguns resultats obtinguts són bastant satisfactoris, tot i que alguns altres resultats mostren el contrari. Un exemple és l'estudi realitzat per Angelov *et al.* (2003) amb Cop-1 on s'ha comprovat que protegeix neurones degenerants degut a estímuls aguts i crònics. Cop-1 allarga l'esperança de vida en ratolins transgènics SOD1^{G93A} i millora les capacitats motores, probablement potenciant la resposta immunitària local per tal de destruir els elements associats amb la mort neuronal.

Aquests resultats, malgrat tot, no han estat reproduïts per Haenggeli *et al.*, (2007), ja que han trobat que, administrant diferents dosis d'aquest polímer a ratolins mSOD^{G93A} i ^{G73R}, la malaltia continua el seu procés.

1.8 Semaforines

En aquest treball s'han trobat evidències que en el sèrum de pacients amb ELA es troben anticossos anti Semaforines. Les semaforines (o colapsines) són molècules secretades pel sistema nerviós amb activitat quimiorrepulsiva i de guia axonal (Kolodkin *et al.*, 1993, Kolodkin, 1996). Hi ha més de 20 tipus de semaforines (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999) que s'han classificat en 8 grups en base a la organització dels seus dominis en l'estructura primària i en el seu origen en les espècies. Les classes 1 i 2 són semaforines d'invertebrats, de la 3 a la 7 són de vertebrats i la classe V es correspon a semaforines virals. La característica de tot el grup de semaforines és un domini particular d'aproximadament 500 aminoàcids en la part amino terminal, anomenat domini semaforina, que inclou varis blocs conservats de 6 a 12 aminoàcids (Nakamura *et al.*, 2000). Aquestes seqüències suggereixen que algunes semaforines són secretades i altres són proteïnes transmembrana amb un domini extracel·lular, i poden associar-se a diferents elements transductors de senyals (Eckhardt *et al.*, 1997). La dimerització sembla que és crucial per l'activitat biològica de les semaforines (Koppel *et al.*, 1998, Wong *et al.*, 1999). Entre la classe 3 de les semaforines, la Sema3A (o colapsina 1) ha estat estudiada amb més detall. El grup 3 de semaforines se sintetitza majoritàriament com a precursors proteics inactius que requereixen processament proteolític. Els resultats del procés proteolític resulten en diferents isoformes que difereixen de la seva activitat repulsiva depenent del tall realitzat per furin-proteases. Si el tall es realitza a prop de l'extrem C-terminal s'augmenta l'activitat repulsiva de Sema3A, però si el tall es produeix dins el domini Sema, la seva activitat queda inhibida (Adams *et al.*, 1997). Ben coneguts són els experiments de Raper i Kapfhammer (1990) on van assajar el colapse de conus de creixement en embrió de pollastre. Sema3A és un potent inhibidor dels creixement axonal del gangli raquídi (dorsal root ganglion, DRG) embrionària (Luo *et al.*, 1993), ganglis simpàtics (Koppel *et al.*, 1997) i de MNs 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). Amb experiments amb ratolins Sema3A2/2, ratolins mutants sense Sema3A, s'ha observat l'absència d'anomalies, suggerint que la guia de les neurones és controlada per altres molècules (Catalano *et al.*, 1998).

La neuropilina-1 (Np-1) va ser identificada com el receptor de Sema3A (He and Tessier-Lavigne, 1997). Es tracta d'una proteïna trans-membrana amb múltiples dominis que actua com a receptor de Sema3A, Sema3B, Sema3C, Sema3D, Sema3E i Sema 3F, mentre que el receptor Neuropilina-2 s'uneix a Sema3B, Sema3C i Sema 3F (Chen *et al.*, 1998). La inhibició de Np-1 i Np-2 bloqueja la repulsió induïda per Sema 3A (Chen *et al.*, 1998). L'expressió de Neuropilina-1 no es limita al Sistema Nerviós; s'ha trobat en el mesènquima que envolta els vasos sanguinis, actuant com a coreceptor de VEGF (Soker *et al.*, 1998).

Les plexines són una família de proteïnes trans-membrana amb un domini citoplasmàtic altament conservat. En mamífers es troben 9 gens de plexines que es classifiquen en 4 grups diferents (de A a D) (Tamagnone *et al.*, 1999). En l'extrem amino terminal contenen un domini Sema. En vertebrats les plexines estan relacionades amb processos de desenvolupament del SNC i de nervis perifèrics (Cheng *et al.*, 2001). Tant les Np com les plexines, en presència de Sema3A, s'organitzen formant clusters necessaris per la transducció de la senyalització (Lemmon *et al.*, 1994).

2. MATERIAL I MÈTODES

2. MATERIAL I MÈTODES

2.0 Animals i anestèsia

Els animals utilitzats en els experiments van ser rates mascles i femelles de la soca Sprague-Dawley i ratolins mascles i femelles de la soca C57BL/6J.

Les rates transgèniques es van obtenir de Taconic Farms (Germantown, NY, USA), o es va inserir un NTac: SD-TgN (SOD1^{G93A}). Les rates control (Wild-type) Sprague-Dawley del mateix fons genètic van ser obtingudes també de Taconic Farms. Els ratolins van ser obtinguts de Jackson Laboratories (Maine, USA). Des de la seva arribada, els animals es van mantenir en un estricte control ambiental.

Per tots els experiments es van seguir els protocols apropiats (Generalitat de Catalunya DOGC 2073, 1995) evitant al màxim el patiment dels animals.

Per tècniques immunocitoquímiques els animals rosegadors van ser anestesiats amb pentobarbital i perfosos intracardiàcament amb serum salí fisiològic (NaCl 0.9%) seguit de paraformaldeid al 4% en 0.1M Tampó fosfat (phosphate buffer (PB)) a pH 7.4. Per tal d'aconseguir una bona preservació del teixit, els animals van ser sacrificats utilitzant la guillotina. Seguidament els teixits a analitzar van ser ràpidament dissecats, submergits en nitrògen líquid i emmagatzemats a -80°C.

Pel que fa els embrions de pollastre, ous fertilitzats (provinents de SADA, Lleida) van ser incubats al laboratori a 37,5°C i 45% d'humitat relativa. Els embrions van ser estudiats d'acord amb Hamburguer i Hamilton, 1951. Mitjançant una finestra oberta a la closca, directament sobre la membrana corioalantoidea, els diferents tractaments van ser administrats del dia embrionari (E) 5 fins a E9 del desenvolupament. Els embrions van ser sacrificats a E10.

El curs temporal de la progressió de la malaltia que desenvolupen els animals pot tenir petites variacions entre animals, però, generalment, una vegada s'inicien els primer símptomes, la progressió de la malaltia és relativament ràpida, causant la mort de l'animal, com a molt, als 5 mesos d'edat.

2.1 Preparació dels sèrums

En un inici es van rebre 11 sèrums diferents de pacients diagnosticats de diferents malalties neurodegeneratives. Els sèrums van ser cedits per la Dra. Isabel Illa, del Servei de Neurologia de l'Hospital Sant Pau de Barcelona. 5 dels sèrums corresponien a malalts d'ELA, 5 sèrums eren de pacients amb Lower Motoneuron Disease (LMD) i 1 sèrum corresponia a un pacient amb Paràlisi Bulbar Progressiva (PBP). A més, es van rebre 8 sèrums controls de persones sense afectacions neurològiques.

Tots els sèrums es van tractar amb un xoc tèrmic de 30 minuts a 56°C per tal d'inactivar el sistema del complement i es van dialitzar amb membranes de diàlisi (D9527, Sigma) a 4°C durant 24 hores contra sèrum fisiològic per tal d'eliminar les molècules més petites de 12000Da.

Els sèrums van ser al·lquotats i emmagatzemats a -80°C pel seu ús posterior.

2.1.1 Separació d'Immunoglobulines G dels sèrums

El protocol que es va utilitzar va ser el recomanat pel kit GammaBind Plus (Amersham. Ref. 17-0886-02)

- En un tub posar 8 ml de PBS i 2 ml de proteïna G i agitar
- Centrifugar a 6000 rpm (revolucions per minut) i descartar el Sobrenadant (SN)
- Fer un altre rentat amb PBS
- Centrifugar i descartar SN
- Afegir 4 ml de PBS i 500 µl de sèrum
- Agitar en braç rotatori 2h a RT
- Centrifugar i guardar SN (sèrum deplecionat de IgG)
- Fer tres rentats de la proteïna G+IgG amb PBS
- Preparar un tub amb 1.5 ml de Tris 1M pH=8
- Al tub amb IgG+proteïna afegir 2.5 ml de glicina 0.2M pH=2.5
- Agitar
- Centrifugar i afegir el SN (1^a elució) al tub amb el Tris 1M pH=8
- Tornar a afegir 2.5 ml de glicina 0.2 M pH=2.5 al pellet de prot. G
- Agitar
- Centrifugar i afegir 2^o SN (2^a elució) al tub amb la 1^a elució i el Tris
- Dialitzar front PBS durant 1-2 dies fent 2 canvis cada dia
- Calcular la concentració de proteïna.

2.2 Tractament d'embrions

Ous fertilitzats (provinents de SADA, Lleida) es van incubar al laboratori a 37.5°C i 45% d'humitat relativa amb una pauta de moviment suau. Els embrions van ser estadiats d'acord a Hamburger i Hamilton, 1951.

Els sèrums patològics i els sèrums controls van ser injectats als embrions de pollastre, mitjançant una finestra oberta a la closca, directament sobre la membrana corioalantoïda de E5 fins a E9 del desenvolupament i els embrions van ser sacrificats a E10. Durant tot aquest temps els ous van ser mantinguts a l'incubador a 37.5°C i 45% d'humitat relativa sense moviment. El volum de sèrum injectat va ser de 5 a 20 µl per ou. El mateix volum de sèrum fisiològic va ser injectat a altres ous com a control intern.

2.3 Recompte de MNs

Els embrions es van fixar amb solució de Carnoy (60% etanol absolut, 30% cloroform, 10% àcid acètic) 24 hores i disseccionats amb etanol 70°. A partir d'aquí, el protocol per la inclusió en parafina va ser:

- Eosina alcohòlica 1 hora
- Etanol 96° 2 hores
- Etanol 96° durant 24 hores
- Etanol 100° 2 hores
- Etanol 100° 2 hores
- Etanol 100° durant 24 hores
- 3 banys de xilè, 1 hora/bany
- parafina 4-6 hores
- Muntatge de blocs de parafina
- Tall de les mostres a 8 µm, a nivell de la medul·la lumbo-sacra (obtinguts amb microtom Reichert-Jung)
- Muntatge dels tall sobre portaobjectes amb albúmina de Mayer

Després es va procedir a la tinció amb tionina:

- Deixar assecar els portaobjectes a 60°C 1-2 dies
- Escalfar els portaobjectes 30 minuts a 60°C
- hidratació:
 - 3 banys de xilè, 10 minuts/bany
 - 2 banys d'etanol 100°, 5 minuts/bany
 - 2 banys d'etanol 96°, 5 minuts/bany
 - 1 bany d'etanol 60° 5 minuts
 - 1 bany d'H₂O destilada 10 minuts
- Tinció 25 minuts amb tionina (NaOH 1N, àcid acètic 1N, tionina 0.5%)
- Rentar ràpid amb H₂O destil·lada
- deshidratació:
 - etanol 70° 1 minut
 - etanol 96° 2 minut
 - etanol 100° 5 minut, 2 incubacions
- 1 bany amb xilè, 10 minuts
- 1 bany amb xilè-eucaliptol (1:1), 10 minuts
- Muntatge amb DPX

Es van contar les MNs d'una columna motora lateral lumbar (LMC) cada 20 seccions, d'acord amb els criteris de Clarke i Oppenheim, 1995.

2.4 Visualització de la innervació intramuscular en whole mount

Els embrions van ser sacrificats i fixats amb solució de Dent (Metanol/ DMSO 4:1) a -20°C durant 4 hores.

Es va dissecar el múscul Iliofibularis (IFIB). A partir d'aquí, la tècnica utilitzada va ser l'Immuno-whole mount staining, d'acord amb Calderó *et al.*, 1998:

- Blanqueig dels músculs amb 10% H₂O₂ amb fixador de Dent 1-2 dies a temperatura ambient.
- Rehidratació, amb successives incubacions amb 80, 50, 30 i 0% metanol, fins PBS-0.25% Tritó.
- Bloqueig en TBS+20% horse serum amb 0.4% tritó X-100 2 hores.
- Incubació amb TUJ-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 1 µg/ml).
- Rentat 5 vegades amb PBS/0.02% Tween 20 (TBST).
- Incubació amb Anticòs secundari (Alexa 488, Anti mouse Ig- HRP 1:500, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA,), 18 hores a 4°C.
- Rentat 3 vegades amb TBST.
- Muntatge amb glicerol.

Els músculs IFIBs van ser observats mitjançant microscòpia confocal (Olympus BX51 (Hamburg, Germany) equipat amb càmera CCD (DP30BW)).

Les mostres van ser visualitzades amb FluoView 500 d'Olympus i analitzades amb Visilog 6.3 (Noesis, Orsay, France).

2.5 Tècniques proteòmiques

2.5.1 Fraccionament cel·lular

Medul·les espinals de rata van ser extretes i reservades en tampó d'homogenització fred (homogenization buffer, 0.32 M sucrosa, 10 mM HEPES pH 7.4, 2 mM EDTA, inhibidors de proteases) i homogenitzades utilitzant homogenitzador de vidre-teflon 10-15 vegades. Les mostres van ser centrifugades a 1000 g 15 minuts per tal d'eliminar el pellet (pelleted nuclear fraction (P1)).

Els Sobrenedants (S1) van ser recuperats i centrifugats a ~200,000 g (50,000 rpm durant 30 minuts amb un rotor 70.1 Ti) per separar la fracció citosòlica (crude cytosol, (S2)) i la fracció membranosa (crude membrane pellet (P2)).

Els pellets van ser resuspesos en tampó homogenització i centrifugats de nou a ~200,000 g per aconseguir el pellet rentat (washed crude membrane pellet (P2')).

Els pellets van ser resuspesos en *HEPES-Lysis buffer* (50 mM HEPES pH 7.4, 2 mM EDTA, inhibidors de proteases).

Es va mesurar la concentració de proteïna i les mostres van ser emmagatzemades a -80°C.

2.5.2 Immunoprecipitació de la fracció citosòlica

- Incubació de les mostres S2 i P2' amb anticòs primari 1:250 (anti-SOD1, Calbiochem, Gibbstown, USA, anti-P2X4, Alomone, Jerusalem, Israel) a 4°C durant 24 hores.
- Incubació de 100 mg de Sepharose protein A (Amersham Pharmacia Biotech, Ref. 17-0780-01) amb 1 ml tampó PBS (0.3M NaCl, 5mM KCl, Tampó fosfat 0.2 M) durant 1 hora.
- Rentat amb PBS 2 vegades
- Eliminació del Sobrenedant (SN) i afegir 400 µl de tampó de lisis (20 mM Tris HCl pH=8, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 1% NP-40, 2 mM EDTA).
- Incubació de les boles de sefarosa amb la mostra durant 4 hores a 4°C.
- Centrifugat i eliminació del SN, netejant cada vegada amb el tampó de lisis.
- Afegir el tampó de càrrega (0.3M Tris HCl, 8.5% SDS, 30% glicerol, 0.01% blau de bromfenol, 4% mercaptoetanol) i bullir durant 3 minuts. Les mostres ja estan preparades per l'assaig per Western Blot.

2.5.3 Cromatografia d'afinitat

El protocol utilitzat va ser l'aconsellat per MICROLINK PROTEIN COUPLING KIT (PIERCE, Ref. 20475)

- Les mostres provinents de la fracció soluble S2 van ser prèviament dialitzades durant 24 hores amb Coupling buffer (kit).

PROCÉS D'UNIÓ

1. Equilibrar els reactius i el gel a temperatura ambient.
2. Posar la columna dins el tub de col·lecció i centrifugar a 1000 g durant 2 minuts.
3. Resuspendre el gel de la columna afegint 300 µl de *coupling buffer* (kit) i descartar el SN. Repetir aquest pas.
4. Afegir 300 µl d'anticòs primari (0.5-1.5 mg/ml) al gel.
5. Afegir 2 µl de Sodium Cyanoborohydre (kit) i barrejar.
6. Incubar a 4°C durant tota la nit.
7. Centrifugar i si cal, quantificar l'elut.
8. Afegir 300 µl de *coupling buffer* (kit) i barrejar. Centrifugar i eliminar el SN. Repetir.

BLOQUEIG DE LLOCS D'UNIÓ ACTIUS

1. Afegir 300 µl de *quenching buffer* (kit) i barrejar.
2. Centrifugar i eliminar el SN. Repetir.
3. Afegir 4 µl de Sodium Cyanoborohydre (kit) i barrejar. Incubar 30 minuts a temperatura ambient, barrejant als 15 minuts.

4. Posar la columna al tub de col·lecció, centrifugar i eliminar el SN.

PURIFICACIÓ PER AFINITAT

1. Afegir 200-300 µl de mostra al gel i barrejar.
2. Incubar a 4°C tota la nit.
3. Centrifugar i reservar el SN per quantificar la proteïna.
4. Afegir 300 µl de *wash solution* (kit) 1:1 i invertir la columna 10 vegades.
5. Centrifugar i descartar el SN.
6. Afegir 300 µl de *coupling buffer* (kit) i invertir la columna 10 vegades.
7. Centrifugar i descartar el SN.
8. Afegir 300 µl de *coupling buffer* (kit) per les parets de la columna. No barrejar.
9. Centrifugar i descartar el SN.

ELUCIÓ

1. Afegir 100 µl de *Immuno Pure Elution Buffer* (kit) per les parets de la columna i incubar 10 minuts a temperatura ambient.
2. Centrifugar i afegir a l'elutit 5 µl Tris 1M pH=9. Quantificar la concentració de proteïna.

2.5.4 Immuno-aïllament de la fracció membranosa

El protocol utilitzat va ser el recomanat per Dyna-beads[®] M-500 Subcellular (Dyna, ref 150.01), utilitzant la tècnica directa. El primer pas va ser unir l'anticòs secundari a Dyna-beads[®] M-500 Subcellular:

- Fer una suspensió de les boles magnètiques, Dyna-beads[®] M-500 Subcellular, vortejant durant 2 minuts.
- Resuspendre les boles magnètiques en tampó borat 0.1M pH=9.5 i afegir 10 µg d'anticòs secundari/10⁷ Dynabeads.
- incubar 24h a 37°C amb rotació lenta.
- després de la incubació, posar el tub a l'íman i eliminar el sobrenedant (SN).
- rentar les boles magnètiques un total de 4 vegades: 2x PBS pH=7.4 amb 0.1% (w/v) BSA (bovine serum albumin) 5 min. a 4°C, 1x 0.2M Tris pH=8.5 0.1% (w/v) BSA 24h. a 20°C o 4h. a 37°C i 1x PBS pH=7.4 amb 0.1% (w/v) BSA 5 min. a 4°C.

La tècnica d'aïllament directa consisteix en:

- Afegir 8 µg d'anticòs primari/10⁷ Dynabeads i barrejar 2 min.
- Incubar 30 min. 4°C amb rotació bidireccional.
- Després de la incubació, posar el tub a l'íman i eliminar el SN.
- Rentar les boles magnètiques 4x PBS pH=7.4 amb 0.1% BSA (w/v) 5 min. a 4°C.

Tot seguit es va procedir a la unió de la mostra cel·lular amb l'anticòs específic unit a les boles magnètiques:

- Resuspendre les boles magnètiques en 700 µl de tampó A (PBS pH=7.4, 2mM EDTA, 5% BSA).
- afegir 700 µl. de les boles magnètiques a 300 µl. de la mostra i incubar 12h. amb moviment constant.
- Després de la incubació, posar el tub a l'íman i reservar el SN com a fracció no retinguda per les boles magnètiques-anticòs primari (fracció SN).
- Rentar les boles magnètiques 3x15 min amb 1ml tampó A.
- Resuspendre les boles magnètiques en el tampó de càrrega i bullir-les 5 min. pel seu anàlisi posterior per SDS-PAGE.

2.5.5 Electroforesis unidimensional i Western Blot

Els teixits de rata de diferents edats o d'embrió de pollastre, que van ser obtinguts a l'estadi E10 de desenvolupament es van emmagatzemar a -20°C.

Els extractes de les diferents mostres van ser obtinguts afegint tampó de lisis (125 mM Tris HCl pH=6.8, 2% SDS) i homogenitzats, primer amb una punta de pipeta i després amb una agulla d'insulina.

La concentració de proteïna dels homogenitzats va ser quantificada (BioRad, ref 500-0114) i les mostres preparades per ser utilitzades per l'electroforesis, afegint-hi el mateix volum de tampó de càrrega (0.3M Tris HCl, 8.5% SDS, 30% glicerol, 0.01% blau de bromfenol, 4% mercaptoetanol) i bullides durant 3 minuts.

Les mostres van ser carregades en un gel d'acrilamida/bisacrilamida (BioRad, ref. 161-0158) i es va fer l'electroforesi, fixant sempre la intensitat a 25mA.

Després d'haver fet l'electroforesis, el gel d'acrilamida va ser electrotransferit a una membrana de nitrocel·lulosa. A partir d'aquest punt es va procedir a realitzar el Western Blot.

- Bloqueig de la membrana: Membrana amb Tampó B (Tampó TBS-T: 2M Tris HCl ph=8, 2.5M NaCl, 0.1%Tween 20 més 5% llet en pols) tota la nit 4°C
- Incubació de l'anticòs 1ari, normalment 1h T^a ambient a la dilució adequada, amb el Tampó I (veure taula 1).
- Rentats de la membrana amb TBS-T: 1x15 min, 2x5 min
- Rentat 10 min amb Tampó I (Tampó TBS-T +0.25% llet en pols)
- Incubació anticòs 2ari, 30 min a T^a ambient a la dilució adequada amb el Tampó I
- Rentats de la membrana amb TBST: 1x15 min, 1x10 min, 3x5 min
- Revelat amb quimioluminiscència: incubació 5 min amb reactiu SuperSignal (Pierce, ref. 34075) i exposició a Lumi-Imager.

ANTICÒS PRIMARI	CASA COMERCIAL	DILUCIÓ
Actina	Sigma-Aldrich	1:5000
Cromogranina A	Santa Cruz Biotechnology	1:100
Cromogranina B	Santa Cruz Biotechnology	1:100
CSP	Chemicon International	1:5000
Grp 78	Stressgen Biotechnologies	1:500
Grp 94	Stressgen Biotechnologies	1:500
Hsc70	Stressgen Biotechnologies	1:1000
LC3	Santa Cruz Biotechnology	1:500
P2X ₁	Alomone Labs	1:200
P2X ₂	Alomone Labs	1:200
P2X ₃	Alomone Labs	1:200
P2X ₄	Alomone Labs	1:200
P2X ₇	Alomone Labs	1:200
P2Y ₁₂	Alomone Labs	1:200
PDI	Stressgen Biotechnologies	2µl/ml
Porina	Molecular Probes	1:500
Semaforina	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Semaforina	Abcam	1:500
SOD1	Calbiochem	1:1000
Synaptofisina	DakoCytomation	1:100
TGN-38	Abcam	1:500

Taula 1: Llistat d'anticossos primaris utilitzats pel Western Blot.

2.5.6 Electroforesis bidimensional

Un cop les mostres van ser obtingudes, van ser congelades a -80°C. Per tal d'extreure les proteïnes de forma compatible per electroforesis bidimensional, es va utilitzar el següent tampó d'extracció:

9M urea, 4% CHAPS, 1% DTT, 0.8% Biolytes pH 3-10, Biorad,, ref 163-2094)

La mostra es va homogenitzar amb el tampó d'extracció amb una punta blava, es va centrifugar a 12000 rpm 5 minuts i es va recuperar el sobrenedant.

La concentració de proteïna es va quantificar (BioRad, ref 500-0114) i les mostres van ser preparades per ser utilitzades per l'electroforesis bidimensional amb tampó de rehidratació d' electroforesis bidimensional (8M urea, 0.5% CHAPS, 1% DTT, 0.8% Biolytes pH 3-10, Biorad, ref 163-2094).

Els gels utilitzats per la rehidratació i l'isoelectroenfoc van ser tires de 11 cm, pH 3-10 NL de Biorad (IPG Strip, ref. 163-2016).

El protocol de rehidratació i d'isoelectroenfoc va ser diferent per mostres de medul·la de rata i de pollastre.

Per pollastre, el protocol utilitzat va ser:

Rehidratació activa 18°C 50V O/N

1 hora 500V

1 hora 1000V

1 hora 2000V

4 hores 8000V

1 hora 500V.

Per rata, el protocol utilitzat va ser:

Rehidratació activa 18°C 50V 2 hores

6 hores 30 V,

3 hores 60V,

1 h 200V,

1 hora 500V,

4 hores 5000 V,

1 hora 8000 V.

Un cop les tires van ser processades, es va procedir al seu equilibrat, per tal de reduir-les i alquilar-les, incubant-les durant 10 minuts amb:

-Solució equilibradora I: 6M urea, 2% SDSm, 1.5M Tris-HCl, 20% glicerol i 130 mM DTT.

-Solució equilibradora II: 6M urea, 2% SDSm, 1.5M Tris-HCl, 20% glicerol i 135 mM Iodoacetamida.

En aquest punt les tires ja estan preparades per carregar-les en un gel d'acrilamida/bis i córrer la segona dimensió.

2.5.7 Tècniques d'espectrometria de masses-MALDI TOF

Un cop es va fer l'isoelectroenfoc de les mostres i es van córrer 2 gels de poliacrilamida iguals, un d'ells es va revelar amb fluorescència amb Flamingo Fluorescent Gel Stain (BioRad, ref. 161-0491):

-Preparació de 1x Flamingo de la solució stock 10x amb H₂O mili Q

-Fixació del gel: 2h en Etanol 40% amb Àcid Acètic 10%

-Remplaçament de la solució de fixació per Flamingo 1x

-Incubació durant 3h

-Visualització del gel amb fluorescència

L'altre gel es va transferir a una membrana de nitrocel·lulosa i es va fer una Immunodetecció per Western Blot. La proteïna reconeguda per l'anticòs en aquest gel va ser retallada del gel no transferit i es va passar a la placa *Zip-plate* per tal de procedir a l'aplicació del protocol preparatiu de mostres per MALDI-TOF de Millipore (Montage In-Gel Digest Kit, Ref. LSKGDZP96):

-REDUCCIÓ-ALQUILACIÓ:

1. Afegir 100 µl (50mM ABC (ammonium bicarbonate)/ 50% etanol) i incubar 15 minuts a temperatura ambient.
2. Aplicar el buit màxim (Full vacuum, 15-20 mm Hg).
3. Afegir 100 µl d'etanol 100% per deshidratar el gel, incubar 15 minuts a temperatura ambient.
4. Aplicar Full vacuum.
5. Afegir 200 µl (10 µM DTT (Dithiothetriol)/ 50mM ABC) i incubar 1 hora a 56°C controlant la humitat.
6. Aplicar Full vacuum.
7. Afegir 200 µl (55mM Iodoacetamina (IAA)/ 50 mM ABC)
8. Incubar 30 minuts a temperatura ambient, protegir la *Zip-plate* de la llum.
9. Afegir 200 µl 50 mM ABC i incubar 15 minuts a temperatura ambient.
10. Aplicar Full vacuum.
11. Repetir els passos 9 i 10.

-DIGESTIÓ AMB TRIPSINA

1. Afegir 100 µl de *Buffer* 1 (kit) i incubar 30 minuts a temperatura ambient.
2. Aplicar Full vacuum.
3. Afegir 100 µl de *Buffer* 2 (kit) i incubar 30 minuts a temperatura ambient.
4. Aplicar Full vacuum.
5. Repetir passos 3 i 4.
6. Afegir 200 µl d'acetonitril 100%. Incubar 10 minuts a temperatura ambient.
7. Aplicar Full vacuum durant 2 minuts per tal d'eliminar totalment l'acetonitril dels pous.
8. Afegir 15 µl de la solució de treball de tripsina (kit) i digerir a 30°C durant tota la nit.
9. Afegir 8 µl d'acetonitril directament al fons del pou on hi ha la resina evitant que quedi sobre els trossos de gel i incubar 15 minuts a 37°C.

-EXTRACCIÓ I RENTAT DELS PÈPTIDS.

1. Afegir 130 μ l de *Wash solution* (kit) i incubar 30 minuts.
2. Aplicar low vacuum (5-8 mmHg).
3. Afegir 100 μ l de *Wash solution* (kit). No cal incubació.
4. Aplicar Full vacuum.
5. Repetir els passos 3 i 4.

-ELUCIÓ DELS PÈPTIDS

1. Fer el muntatge de la placa amb la *Zip-plate*.
2. Aplicar Full vacuum i baixar-lo fins a 4 mmHg.
3. Afegir 2 μ l de la solució formada per la matriu (α -cyano-4-hidroxicinnamic acid, α -CHCA) i la solució d'elució (kit).
4. Tancar el buit lentament i treure la *Zip-plate* del muntatge amb compte.
6. Carregar els calibrants a la placa.
7. Deixar assecar les gotes

Es va introduir la placa dins l'aparell de MALDI-TOF (Voyager De-Pro, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) i es va disparar el làser per tal d'obtenir espectres operant amb 20kV com a voltatge d'acceleració, 90ns com a temps de retard, 75% de grid voltage i 0.005% de guidewire voltage. Els espectres van ser acumulats, visualitzats i analitzats utilitzant Data Explorer software version 4.2 (Applied Biosystems). Els pics monoisotòpics van ser utilitzats per la identificació usant el software Protein Prospector MS-Fit software version 3.2 using Swiss-Prot com a base de dades.

2.5.8 Desnaturalització i immunoprecipitació de hSOD1 in vitro

La proteïna hSOD1 d'eritròcits humans va ser obtinguda de Sigma (ref. S9636). Per la seva desnaturalització, l'estoc de SOD1 106 μ M en 50mM Hepes pH=7.5 es va diluir a 2 μ M i es va incubar en 8M urea, 2mM ditiotreitòl (DTT) i 1mM àcid tetracètic etilendiamina (EDTA) durant tota la nit a T^a ambient per provocar la desnaturalització de la proteïna. La solució estoc de hSOD1 va ser incubada amb PBS 1/20 en les mateixes condicions com a control de la proteïna plegada. Tot seguit es va procedir a la seva immunoprecipitació amb boles de Sefarosa (descriu anteriorment) i les mostres van ser preparades pel seu posterior anàlisi per SDS-PAGE.

2.6 Tècniques Immunohistoquímiques

2.6.1 Tècniques immunohistoquímiques

Els animals van ser perfosos intracardiàcament. La medul·la espinal, el cervell i músculs de la cama (tibialis, gastrocnemicus, extensor digitorum longus, EDL, i soleus) van ser disseccionats i reservats durant tota la nit a 4°C. Després van ser submergits en sucrosa al 30% en 0.1 M PB i van ser congelats.

Les medul·les espinals van ser tallades en seccions transversals de 16µm i el cervell en seccions coronals, obtingudes amb un criostat Microm HM560. Els músculs van ser tallats en seccions longitudinals.

Les seccions van ser muntades en portaobjectes gelatinitzats i emmagatzemades a -80°C.

Per obtenir seccions seriadades, es va utilitzar el Vibratom Leica VT 1000S. Després les seccions van ser recollides amb 0.1M PB, i processades per marcatge amb immunoperoxidasa d'acord amb el protocol ABC (Vectastain, Vector, Burlingame, CA). Les seccions van ser finalment muntades en portaobjectes gelatinitzats i cobertes amb cobreobjectes amb DPX.

El protocol utilitzat va ser el següent:

-Pre-tractament amb tampó fosfat salí (phosphate buffered saline (PBS)) amb 0.1% Tritó X-100 durant 15 minuts.

-Bloqueig de les mostres amb 3% normal goat serum (NGS) durant 30 minuts.

-Incubació amb anticòs primari durant tota la nit a 4°C. Els anticòs utilitzats van ser anti P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, and P2X₇, d'Alomone Labs (Jerusalem, Israel). També es van utilitzar Mouse monoclonal antibody anti-neuronal nuclei (NeuN; Chemicon International, Temecula, CA) com a marcador neuronal, Mouse monoclonal antibody anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; diluted; Chemicon), com a marcador astròglial, Rat monoclonal antibody anti-serotonin (Chemicon), que reconeix neurones serotoninèrgiques, Mouse monoclonal antibody anti-CD11b (MRC OX-42, Serotec, Oxford, UK), com a marcador de la microglia en la rata, anti-MAP-LC3, present en els autofagosomes (Santa Cruz Biotechnology) com a marcador d'autofàgia, Mouse monoclonal antibody anti-tyrosine hydroxylase (TH; Sigma-Aldrich, Alcobendas, Spain), i que reconeix neurones noradrenèrgiques, Mouse monoclonal antibody anti-calbidin-D-28K (Sigma-Aldrich), que reconeix cèl·lules de Purkinje del cervell, Monoclonal antibody anti-TuJ-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) com a marcador de la β-tubulina neuronal tipus III de citosquelet, Rabbit polyclonal antibody anticlaved caspase-3 (Asp175; Cell Signaling, Beverly, MA), com a marcador d'apoptosi en cervell de rata. Per posar de manifest les cèl·lules microglials, algunes medul·les espinals van ser incubades amb la lectina *Bandeiraea*

simplicifolia conjugada amb FITC (BS-1, de Sigma Aldrich, Alcobendas, Espanya) (veure taula 2). Totes les dilucions van ser fetes en PBS.

-Incubació amb l'anticòs secundari apropiat, unit a Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene OR), Cy3 o Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA,) diluïts 1:500. El Fluorochrome 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) va ser aplicat a 50 ng/ml.

El marcatge per deoxynucleotidyl transferase-UTP nick-end labeling (TUNEL) va ser realitzat amb el kit de detecció de mort neuronal amb fluorescència in situ de Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany).

Per revelar els Receptors d'Acetilcolina (AChRs) en les sinapsis neuromusculars, les seccions van ser incubades amb α -bungarotoxina conjugada amb Alexa-Fluor 488 (1 μ g/ml; Molecular Probes).

-Les seccions van ser examinades utilitzant un microscopi d'epifluorescència Olympus BX51 (Hamburg, Germany) equipat amb una càmera CCD (DP30BW). Les imatges van ser visualitzades amb el microscopi confocal laser scanning FluoView 500 Olympus. Per analitzar les imatges es va utilitzar el Visilog 6.3 (Noesis, Orsay, France).

ANTICÒS PRIMARI	CASA COMERCIAL	DILUCIÓ
Calbindina	Sigma-Aldrich	1:1000
GFAP	Chemicon International	1:400
Iba-1	Wako Chemical GmbH	1:500
NeuN	Chemicon International	1:500
OX-42	Serotec	1:100
P2X ₁	Alomone Labs	1:500
P2X ₂	Alomone Labs	1:500
P2X ₃	Alomone Labs	1:500
P2X ₄	Alomone Labs	1:500
P2X ₇	Alomone Labs	1:500
P2Y ₁₂	Alomone Labs	1:500
P53	Cell Signaling	1:50
Serotonin	Chemicon International	1:100
SOD1	Calbiochem	1:1000
TUJ-1	R&D Systems	1:500
Tyrosin hidroxilasa	Sigma-Aldrich	1:100

Taula 2: Llistat d'anticòs primaris utilitzats en Immunohistoquímica.

2.6.2 Tècniques immunocitoquímiques per fluorescència de cèl·lules en cultiu

Per realitzar la immunocitoquímica de les cèl·lules NSC-34 en cultiu el protocol utilitzat va ser el següent:

- eliminació del medi de cultiu de les cèl·lules i rentat amb PBS.
- fixació amb Paraformaldehid 4% 1 hora a 4°C.
- eliminar el Paraformaldehid 4% i mantenir les cèl·lules amb PBS.
- rentat amb PBS-tritó 0.1% 20 min.
- incubació amb NGS (Normal Goat Serum) 10% 1 hora.
- incubació amb l'anticòs primari (Anti-P2X₄, Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya, 1:500).
- 3x10 min rentats amb PBS.
- incubació amb l'anticòs secundari 1 hora a temperatura ambient (anti rabbit Cy3 1:500, anti rabbit Cy5 1:500, Alexa 455 1:500, DAPI 1:100).
- 3x10 min rentats amb PBS.
- muntatge amb PBS-glicerol i observació a microscòpia confocal (Olympus BX51 (Hamburg, Germany) equipat amb càmera CCD (DP30BW)).

2.6.3 Tècniques Immunohistoquímiques- Free Floating.

El següent protocol va ser utilitzat per analitzar les seccions de cervell prèviament tallades al criostat provinents de rosegadors als quals se'ls havia practicat Estereotàxia.

- incubació de les seccions amb 1% H₂O₂ en PBS 1 hora
- 3 x rentats amb PBS de 10 minuts cadascun
- incubació amb Normal Goat Serum al 10% en PBS 1 hora
- incubació amb l'anticòs primari tota la nit a 4°C (anti IBa-1 policlonal, 1:500, Santa Cruz Biotechnology).
- 3 x rentats amb PBS-Tritó 0.1% de 10 minuts cadascun
- incubació amb l'anticòs secundari 1 hora a temperatura ambient.
- 3 x rentats amb PBS de 10 minuts cadascun
- incubació de les seccions amb Vectastain ABC reagent 1 hora a temperatura ambient.
- 3 x rentats amb PBS de 10 minuts cadascun
- revelat durant 6 minuts amb DBA (àcid diaminobenzoic)
- 2 x rentats amb PBS de 10 minuts cadascun
- disposar les mostres en portaobjectes gelatinitzats
- deshidratació de les mostres:
 - 10 minuts en aigua destil·lada

- 10 minuts en aigua destil·lada
 - 10 minuts en etanol 70° (1)
 - 10 minuts en etanol 96° (1)
 - 10 minuts en etanol 96° (2)
 - 10 minuts en etanol 100° (1)
 - 10 minuts en etanol 100° (2)
 - 10 minuts en xilè
 - 10 minuts en xilè/eucaliptol
- muntatge de les mostres amb DPX

2.7 Tècniques de Biologia Molecular

2.7.1. Plàsmids

Els plàsmids pEGFP-N1 amb SOD1^{WT}, SOD1^{G93A} i SOD1^{A4V} van ser obtinguts gràcies a la col·laboració del Dr. Turner (Howard Florey Institute of Experimental Physiology and Medicine, University of Melbourne, Australia), Figura 1.

Els plàsmids amb Semaforina 3A van ser obtinguts gràcies a la col·laboració del Dr. Kolodkin (The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA). La construcció es va realitzar utilitzant el vector pBK-CMV on es va inserir AP-SemaIII tenint com a origen de l'insert PBKAPSemDP1b, entre els llocs EcoRI i XhoI. Figura 2.

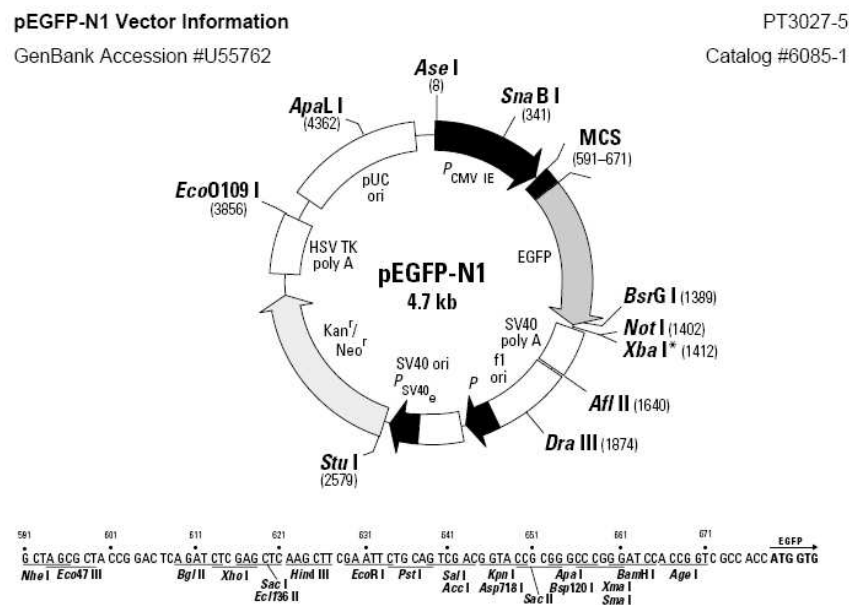
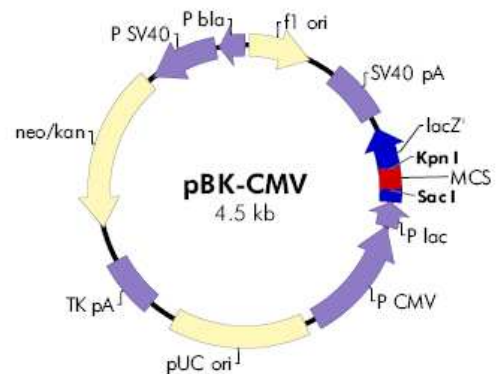


Figura 1: Plàsmid pEGFP, utilitzat per la clonació dels diferents tipus de SOD1.

f1 origin 24–330
 SV40 polyA 469–750
 β-galactosidase α-fragment 812–1183
 multiple cloning site 1015–1122
 lac promoter 1184–1305
 CMV promoter 1306–1895
 pUC origin 1954–2621
 HSV-TK polyA 2760–3031
 neomycin/kanamycin resistance ORF 3209–4000
 SV40 promoter 4035–4373
 bla promoter 4392–4518



**pBK-CMV Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 952–1196)**

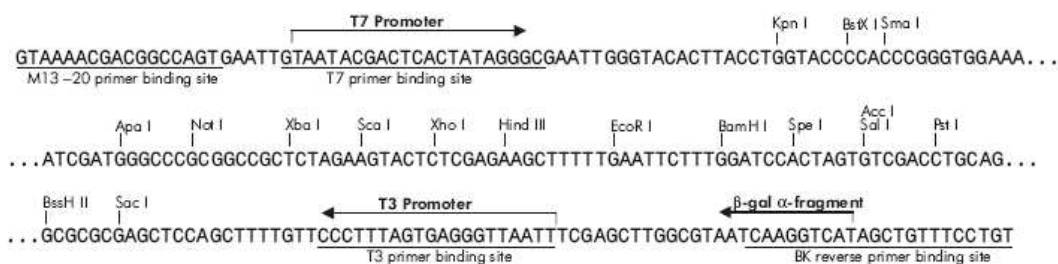


Figura 2: Plàsmid pBK, utilitzat per la clonació de la Semaforina 3A.

2.7.2 Transformació de *E. Coli*.

El protocol utilitzat per la transformació va ser el següent:

- Retallar els plàsmids del paper i posar el paper dins un tub eppendorf.
- Afegir 50 µl de Tris 10mM pH=7.6.
- Rehidratar durant 5 minuts.
- Centrifugar a 8000rpm durant 2 minuts
- Treure el SN i tornar a centrifugar 10 minuts
- Descongelar les cèl·lules de *E. Coli*, la soca XL-1 Blue per transformar amb Sema 3A i la soca DH10B per hSOD1, en fred.
- Barrejar 1 µl de la solució del plàsmid amb 200 µl de cèl·lules durant 10 minuts.
- Xoc tèrmic durant 2 minuts a 42°C.
- Incubació en gel durant 1 minut.
- Afegir 800 µl medi LB (Luria-Bertoni: triptona 1%, extracte de llevat 0.5% i NaCl 1%, a pH=7.5).
- Incubar 1 hora a 37°C a 220 rpm
- Sembrar en plaques amb medi LB+ antibiòtic segons el plàsmid (Ampicil·lina 50 µg/ml o Kanamicina 50 µg/ml)
- Incubar 24 hores a 37°C

- Picar una colònia aïllada i posar-la dins un tub amb medi LB +antibiòtic i incubar amb agitació a 37°C.

2.7.3 Purificació del DNA del plàsmid recombinant (“mini-prep”)

El protocol utilitzat per purificar la Sema3A va ser el recomanat pel kit utilitzat Minitools Miniprep Kit (Biotools, Ref. 21022), a partir de 1.5 ml de cultiu.

- Centrifugar el cultiu 2 minuts a 13000 rpm
- Descartar el SN
- Resuspendre completament el pellet en 100 µl solució I de resuspensió (kit) per pipeteig
- Afegir 100 µl de solució II de lisis (kit) i barrejar suaument per inversió 5 vegades.
- Afegir 100 µl de solució III de neutralització (kit) i barrejar suaument per inversió 5 vegades.
- Incubar 5 minuts en gel
- Centrifugar 10 minuts a 13000 rpm
- Recollir i reservar el SN
- Afegir 10 µl de la matriu de sílice (kit)
- Incubar durant 10 minuts a temperatura ambient barrejant suaument cada 2 minuts
- Carregar la barreja a la columna i centrifugar 5 minuts a 13000 rpm
- Eliminar l'eluït del fons de la columna
- Col·locar el tub de col·lecció i afegir 300 µl de Wash Solution (kit) freda.
- Centrifugar 1 minut a 13000 rpm i llençar l'eluït
- Repetir el rentat
- Centrifugar 1 minut a 13000 rpm per eliminar resta de Wash Solution
- Transferir la columna a un eppendorf net
- Afegir 50 µl de TE buffer (kit) i aigua a 65°C
- Incubar 2 minuts a temperatura ambient
- Recuperar l'eluït amb el DNA centrifugant 2 minuts a 13000 rpm
- Digerir el DNA durant 3 hores a 37°C:
 - 11.5 µl plàsmid, 1 µl enzim de restricció Eco RI (Fermentas, Burlington, Canada),
 - 1 µl enzim de restricció Not I (Fermentas, Burlington, Canada), 1.5 µl tampó O
- Comprovar el resultat de la miniprep amb un gel d'agarosa:
 - 1% agarosa en tampó TAE 1x (TAE 50x= 2M Tris-acetat, 250mM EDTA)
 - pH=8
 - solidificar en cubeta
 - afegir 5 µl de buffer de càrrega+15 µl mostra

fixar el voltatge a 50 v i fer córrer la mostra .

tinció i visualització amb bromur d'etidi

El protocol utilitzat per purificar la hSOD1 va ser el recomanat pel kit utilitzat Nucleospin (Macherey-Nagel, Ref. 740 588.50), a partir de 1.5 ml de cultiu:

- Centrifugar el cultiu durant 30 s. a 11000g i descartar el SN.
- Afegir 250 µl de buffer A1 (kit) i resuspendre el pellet.
- Afegir 250 µl de buffer A2 (kit) i invertir el tub 6 vegades. Incubar a temperatura ambient 5 min
- Afegir 300 µl de buffer A3 i invertir el tub 6 vegades.
- Centrifugar 5 min a 11000 g
- Posar la columna nucleospin en un tub de col·lecció i passar el SN del pas anterior dins la columna
- Centrifugar 1 min a 11000 g i descartar l'eluit
- Afegir 600 µl de wash solution, també anomenat buffer A4, centrifugar 1 min a 11000 g i descartar l'eluit
- Centrifugar 2 min a 11000 g
- Eluir el DNA afegint 50 µl de buffer AE centrifugant 1 min. a 11000 g
- Comprovar el resultat de la miniprep amb un gel d'agarosa

2.7.4 Purificació del DNA del plàsmid recombinant ("midi-prep")

El protocol utilitzat pels dos tipus de plàsmid va ser el recomanat pel kit utilitzat MidiPrep Kit (Quiagen, Ref.12143), a partir de 250 ml de cultiu.

- Cultiu de 250 ml medi LB +250 µl antibiòtic (a créixer el dia anterior a 37°C speed 220 *overnight*)
- Centrifugar durant 15 minuts a 8000 rpm a 4°C
- Resuspendre el pellet amb 4 ml tampó P1 (kit)
- Traspasar a tub corex de 30 ml
- Afegir 4 ml tampó P2 (kit) i deixar 5 minuts a RT, barrejant 6 vegades
- afegir 4 ml tampó P3 (kit) i deixar 5 minuts a RT, barrejant 6 vegades
- Incubar en gel 15 minuts
- Centrifugar durant 30 minuts a 12000 rpm a 4°C
- Equilibrar la columna Qiagen-Tip 100 (kit) amb 4 ml QBT (kit) deixant que surti el líquid per gravetat
- Afegir el SN a la columna
- Rentar 2 vegades amb 10 ml de tampó QC (kit)
- Eluir el DNA amb 5 ml tampó QF (kit)
- Recollir l'eluit amb tub corex de 15 ml
- Precipitar el DNA amb 3.5 ml d'isopropanol

- Barrejar per inversió suau
- Centrifugar durant 30 minuts a 11000 rpm a 4°C
- Treure el SN amb pipeta i rentar el pellet amb 2 ml d'etanol al 70%
- Centrifugar durant 10 minuts a 11000 rpm a 4°C
- Deixar assecar el pellet 5-10 minuts en campana
- Resuspendre el pellet amb 200 µl d'aigua miliQ
- Quantificar el DNA i emmagatzemar-lo a 4°C
- Digerir el DNA de Sema3A durant 3 hores a 37°C
- Comprovar la midiprep amb un gel d'agarosa

2.7.5 Transfecció del DNA

Els DNA de Sema 3A va ser transfectat a cèl·lules COS-7, i els DNAs de hSOD1 van ser transfectat a cèl·lules NSC-34. El medi utilitzat per cultivar aquestes cèl·lules va ser:

- DMEM/F-12 (HAM) 1:1 (Biological Industries, ref: 01-170-1A)
- FBS (Fetal Bovine Serum) 10 %
- Penicil·lina (50 U/ml) / Streptomycina (50 µg/ml)
- L- Glutamina (200mM)

Transfecció de cèl·lules COS-7 i NSC-34

El procés de transfecció va ser realitzat mitjançant Lipofectamine-2000 (Ref. 11668-027, Invitrogen, California). El protocol utilitzat va ser el següent:

- Diluir 10 µl de Lipofectamine-2000 en 500 µl Opti-Mem i incubar 5 min.
- Barrejar el DNA amb 500 µl de medi Opti-MEM sense sèrum i incubar 30 min amb la Lipofectamine-2000.
- Afegir la barreja de DNA-Lipofectamine-2000 a les cèl·lules amb una confluència del 90% i incubar durant 4 hores a 37°C

2.7.6 Purificació de la Semaforina recombinant

El medi de cultiu de les cèl·lules COS7 va ser prèviament concentrat mitjançant Amicon Ultra, de Millipore (Barcelona, Spain). La semaforina es va purificar partint de 7 ml de medi de cèl·lules COS-7, transfectades amb DNA recombinant amb un tag de fosfatasa alcalina AP (Affinity Chromatography, Biogene Ltd, Kimbolton, UK, ref. Q330):

A. Preparació de la columna

1. Situar la columna de cromatografia en un suport.

B. Empaquetat de la columna

1. Afegir les boles de sefarosa amb AP conjugada a la columna
2. Equilibrar la columna amb 10 volums de Tris HCl pH=8 10mM.

C. Unió de la proteïna de fusió a la columna

1. Carregar el medi concentrat a la columna.
2. Recollir l'elutit de la columna i tornar-lo a passar per la columna.
3. Rentar la columna amb 30 volums de Tris HCl pH=8 10mM fins a OD>0.01.

E. Elució de la proteïna de fusió

1. Eluir la AP-fusion protein unida a la columna amb Antigen Elution Solution (Biogene, ref. Q341A) i recollir diferents fraccions d'elutit de 0.5ml cadascuna.
2. Neutralitzar la mostra obtinguda amb 50 µl Tris Hcl 1M pH=8
2. Quantificar la concentració de proteïna dels diferents vials.
3. Comprovar la presència de AP-Sema3A mitjançant Western Blot.

2.7.7 Experiments amb cèl·lules NSC-34

La línia cel·lular híbrida de MN de ratolí NSC-34 va ser obtinguda de CELLutions Biosystems (Toronto, Canada). Les cèl·lules van ser cultivades en plaques de 6 pous (2×10^5 cèl·lules/pou) i van ser transfectades transitòriament amb els diferents DNAs de SOD1 (SOD1^{WT}, SOD1^{G93A} i SOD1^{A4V}) o de EGFP (obtinguts gracies al Dr. Turner, Melbourne, Australia). Van ser tractades alhora amb liti per tal d'avaluar el seu efecte sobre els agregats de SOD1 que es formaven. Per fer-ho, un cop transfectades les cèl·lules van ser incubades amb el medi standard amb 1, 2, 5, 8 o 10mM de LiCl o sense ell com a control. El medi amb o sense liti es va mantenir durant 24, 48 i 72 hores. Posteriorment el medi va ser retirat, concentrat i analitzat amb SDS PAGE i western blot i les cèl·lules van ser tractades per realitzar el recompte d'agregats (veure Tècniques Immunocitoquímiques per fluorescència de cèl·lules en cultiu).

2.8 ELISAS

Mitjançant tècniques proteòmiques i d'espectrometria de masses es va poder constatar la presència d'anticossos anti-semaforina en sèrums patològics. Per tal de detectar la presència d'aquests anticossos d'una manera més ràpida i sistematitzada es van realitzar experiments d'ELISAs (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), seguint el protocol següent. Les plaques utilitzades van ser les Immuno-Plate MaxiSorp (Nunc, Demmark) i els rentats es van realitzar amb el rentador Das (Roma, Italia).

1. Incubar la proteïna recombinant sema3A overnight a 4°C en tampó bicarbonat Sòdic 100mM pH=8.5
2. Rentat amb PBS-tritó 0.1%

3. Bloqueig 2h amb PBS- tritó 0.1%-BSA 2%
4. Rentar amb PBS-tritó 0.1%
5. Incubació amb Anticòs 1ari 1:50 en PBS- tritó 0.1%-BSA 0.1% 4°C tota la nit
6. Rentar amb PBS-tritó 0.1%
7. Incubació amb Anticòs 2ari 1:1000 en PBS- tritó 0.1%-BSA 0.1% 1 hora a temperatura ambient
8. Rentar amb PBS-tritó 0.1%
9. Revelar amb Sigma P9187, 2 pastilles en 20 ml H₂O.
Afegir 100 µl/pou i esperar de 5 a 15 min. Parar amb 50 µl H₂SO₄ 2.5M i llegir OPD (490nm).

2.9 Cultiu de DRG i assaig de colapse

Per tal de corroborar la presència d'autoanticossos en sèrums de pacients d'ELA es van dur a terme cultius de gangli raquidi (Dorsal Root Ganglion, DRG) d'embrions de pollastre E7. Per fer-ho, es van dissecionar els ganglis i es van cultivar durant 24 hores en plaques M6 sobre cobreobjectes tractats prèviament amb 6 µg/ml de poli-lisina i 6 µg/ml laminina dissolts en medi L15. El medi de cultiu es componia de medi F12 suplementat amb glutamina 2mM, 100U/ml penicilina/streptomicina, 20ng/ml NGF 7S, 10⁻⁵M cytosine arabino-furanoside, 10⁻⁵M fluorodeoxy uridine, 5% fetal calf serum i 5% chicken serum.

Després de les 24 hores de cultiu, els ganglis van ser sotmesos a una deprivació de NGF afegint medi que contenia la mateixa composició que el medi inicial però que variava la concentració de NGF en 10ng/ml. Aquest nou medi era administrat 40 minuts abans del tractament corresponent.

Després dels 40 minuts s'hi afegia la dosis de Semaforina 3A que corresponia, juntament, si calia, amb el sèrum humà a diferents dilucions o amb l'anticòs anti Sema3A, preincubats durant 30 minuts.

El tractament s'incubava durant 1 hora i després es procedia a la fixació dels ganglis amb paraformaldehid 4% durant 15 minuts, rentat amb PBS i incubació amb Phalloidin-TRICT (Fluka, ref. 77418) durant 20 minuts. Fet després un altre rentat amb PBS, els ganglis ja podien ser muntats sobre un portaobjectes i observats a microscòpia de fluorescència.

2.10 Microscòpia electrònica

Procediments de pre i post-inclusió van ser aplicats per tal d'estudiar la localització intracel·lular de la immunoreactivitat de l'anticòs anti P2X4 en mostres de medul·la espinal de rates SOD^{G93A} de 150 dies.

Els animals van ser perfundits amb 4% paraformaldehid en 0.1 M PBS i 0.1% glutaraldehid.

Seguidament les medul·les espinals van ser disseccionades i submergides en el mateix fixador durant 6 hores.

Pre-inclusió.

Es van tallar seccions de 50 µm amb el vibratom que van ser tractades amb 50 mM de glicina durant 30 minuts i permeabilitzades amb PBS amb 10% normal goat serum (NGS) i 0.01% saponina durant 1 hora.

Les seccions van ser incubades amb l'anticòs primari anti P2X4 diluït 1:100 tota la nit a 4°C.

Després de 3 rentats de 10 minuts cadascun amb PBS, les mostres van ser incubades durant 1 hora amb anticòs secundari anti-rabbit biotinitat (1:100) de Vector Laboratories i amb Nanogold Streptavidina (1:100, Molecular Probes) durant 1 hora.

El procés utilitzat per la intensificació amb plata va ser el recomanat per Silver enhancement kit (Ref. L24919, Molecular Probes).

Les mostres van ser infiltrades amb reïna Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) dissolta en òxid de propilè. Es van utilitzar reïnes de concentració creixent (50%, 75% i 100%) fins la seva polimerització, disposades en fulles d'acetat de vinil. Es van obtenir seccions ultrafines de 70 nm de gruix amb Ultracut Reichert Jung sobre reixetes que es van contrastar amb acetat d'uranil i citrat de plom. Finalment aquestes seccions van ser observades amb el microscopi electrònic Zeiss EM 910 (Oberkochen, Germany), obtenint-se imatges a diferents augments.

Post-inclusió

Per la post-inclusió es va realitzar un protocol de crio-substitució. Després de la fixació del teixit de medul·la espinal, aquest es va seccionar a 200µm utilitzant un McIlwain Tissue Chopper (Mickle Laboratory Engineering, Gomshall, Surrey, UK). Es van procesar les mostres d'acord al protocol de crio-substitució a baixa temperatura amb reïna Lowicryl HM20 (Electromicroscopy Sciences).

Seccions ultrafines van ser recolectades, disposades sobre reixetes de níquel i tractades amb Tampó Tris amb 0.1% sodium borohydrate i 0.1% Tritó X-100 (TBST) i 50 mM Glicina.

Després de 3 rentats de 10 minuts amb TBST, les seccions van ser incubades amb anticòs primari rabbit anti P2X4 1:100 amb 10% Normal goat serum (NGS) durant 2 hores a temperatura ambient.

Posteriorment es van realitzar tres rentats més i es va incubar amb 10mm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) diluït 1:20 en TBST contenint 10% NGS i 5mg/ml polyethylenglycol 20000 durant 1 hora a temperatura ambient.

Després de rentar amb aigua destil·lada, les mostres van ser contrastades amb acetat d'uranil i citrat de plom per tal de ser observades amb el microscopi electrònic Zeiss EM 910 (Oberkochen, Germany).

2.11 Estereotàxia.

Els ratolins wild type de la soca C57BL/6J de 2 mesos d'edat van ser anestesiats amb isoflurà 3% durant 1 o 2 minuts. Després van ser injectats amb Rompum al 2% (Bayer, Kiel, Germany) i clorhidrat de Ketamina al 10% (Merial, Barcelona, Spain) en 0.9% de NaCl i col·locats en l'aparell d'estereotàxia (Asi Instruments, Houston, USA). Tot el material utilitzat va ser prèviament autoclavat. Els ulls van ser protegits amb gases amb tampó salí i el cap va ser posteriorment rasurat i desinfectat. L'estereotàxia del crani va ser realitzada en les coordenades -1mm lateral, -1.82mm rostro caudal i -2.3mm dorsoventral del bregma, a la zona corresponent a l'hipocamp. Els animals van rebre una injecció de 1 µl de hSOD1 comercial 1µg/µl o 1µl de la fracció purificada de la Cromatografia d'Afinitat identificada com a SOD1 mutada. La injecció va ser realitzada mitjançant una micropipeta acoplada a una xeringa Hamilton a una velocitat de 1µl/min. La micropipeta es va mantenir durant 1 minut en el lloc de la injecció i es va retirar lentament a una velocitat de 1mm/minut. Els animals van ser suturats i mantinguts a la gàbia per la seva recuperació 55 fins al moment del seu sacrifici, procedint després al seu anàlisis immunohistoquímic per Iba-1 en talls coronals de 80 µm mitjançant vibratom.

2.12 Detecció de Calci per Fura2.

Per la visualització dels nivells de calci, les cèl·lules transfectades van ser cultivades en plaques i sobre cobreobjectes de vidre. Les cèl·lules van ser incubades amb 5µM de Fura2 AM (invitrogen) dissolt en una solució extracel·lular fisiològica amb 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM Mg Cl₂, 20mM HEPES pH=7.4, 10mM glucosa i 0.1% BSA durant 30 minuts a 37°C. Els cobreobjectes van ser llavors insertats dins d'una cambra de perfusió PH1 (Warner Instrument Corp, Handem, HT), colocada alhora dins el microscopi de fluorescència invertit Nikon Eclipse TE200 equipat amb un monocromador i una càmera Orca ER (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japó). Els experiments van ser realitzats sota el control del software Aquacosmos (Hamamatsu Photonics) per la visualització del calci. Les cèl·lules van ser constantment perfoses amb la solució prèviament descrita. Els agents estimulants

van ser afegits a la cambra de perfusió. Les imatges van ser capturades amb l'objectiu d'immersió 40x 1.3 NA Nikon S Fluor i posteriorment analitzades.

3. RESULTATS

3. RESULTATS

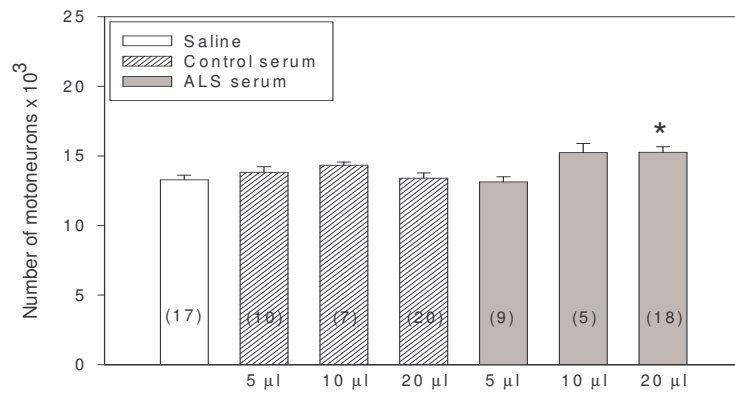
3.1. Efecte de sèrums patològics en models de desenvolupament neuronal.

3.1.1 Efecte dosi-resposta en el nombre de MNs per efecte de l'administració dels sèrums.

Després de la preparació i del tractament dels 11 sèrums patològics que havien estat cedits per l'Hospital Sant Pau (5 ALS, 5 LMD i 1 PBP) es va procedir a injectar diferents dosis d'aquests en embrions de pollastre per tal d'avaluar el seu efecte sobre les MN. Per fer-ho, es van utilitzar ous de pollastre fertilitzats que es van incubar al laboratori. En el dia 5 de desenvolupament (E5) es va fer una finestreta a la closca a través de la qual es van injectar diferents dosis dels onze sèrums patològics, de sèrums control, procedents de persones sanes, i de sèrum salí com a control intern. Concretament, es van injectar 5, 10 i 20 µl dels sèrums de ALS, LMD i Control en cada ou des de E5 fins a E9. Els embrions es van sacrificar a E10 i es van processar pel recompte de MN de la banya ventral de la medul·la espinal lumbar (LMC).

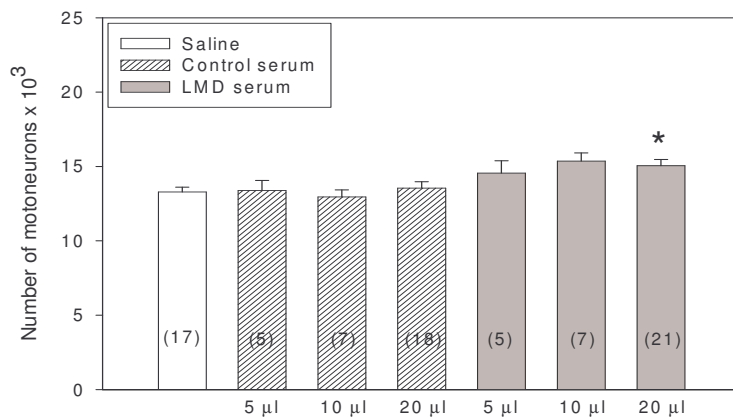
Cal dir que en aquests tipus d'experiments existeix un factor limitant molt important, que és la poca quantitat disponible de sèrums.

Veient els resultats del nombre de MN obtinguts després del tractament amb els diferents sèrums, es va poder determinar que la dosi de 20µl produïa un rescat significatiu de la mort de MN espinals en embrions de pollastre E10, tant per sèrums ALS (Figura 1) com per sèrums LMD (Figura 2). En els experiments realitzats amb sèrum PBP no es va poder determinar cap efecte de rescat de MN (Figura 3).



* p < 0.05 vs saline (one-way Anova)

Figura 1. Nombre de MNs x10³ després de la injecció de 20 µl de sèrum salí, 5, 10 i 20 µl de sèrums controls i 5, 10 i 20 µl de sèrums patològics ALS.



* p < 0.05 vs saline (one-way Anova)

Figura 2. Nombre de MNs x10³ després de la injecció de 20 µl de sèrum salí, 5, 10 i 20 µl de sèrums controls i 5, 10 i 20 µl de sèrums patològics LMD.

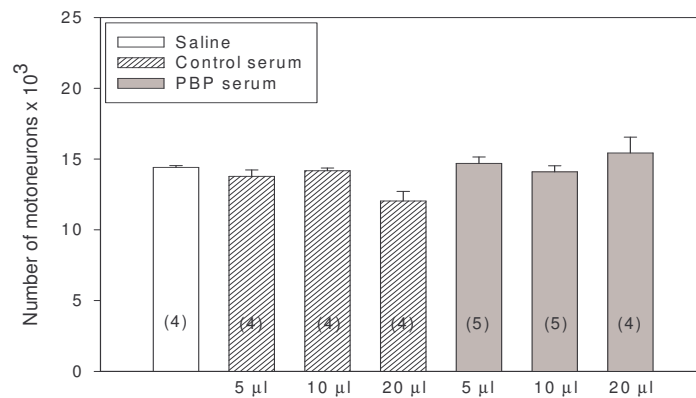


Figura 3. Nombre de MNs $\times 10^3$ després de la injecció de 20 μl de sèrum salí, 5, 10 i 20 μl de sèrums controls i 5, 10 i 20 μl de sèrum patològic PBP.

D'aquesta manera es va fixar la dosi de 20 μl de sèrums patològics ALS i LMD com la dosi de treball per experiments posteriors, ja que era la dosi que produïa un rescat significatiu de la mort de MN durant el període de PCD. Es va utilitzar aquesta dosi per testar tots els sèrums i es va veure que la majoria de sèrums produïen un rescat significatiu del nombre de MN durant la PCD (Figura 4, nombre de MN després de la injecció dels sèrums expressats individualment per cada sèrum, Figura 5, nombre de MN després de la injecció dels sèrums expressat agrupant les dades per malaltia). Cal dir que el sèrum PBP no produïa cap efecte de rescat de MN en el període de PCD, però que únicament es disposava de $n=1$ de sèrums d'aquest tipus de malaltia, per tant els resultats no són conclouents per aquesta patologia.

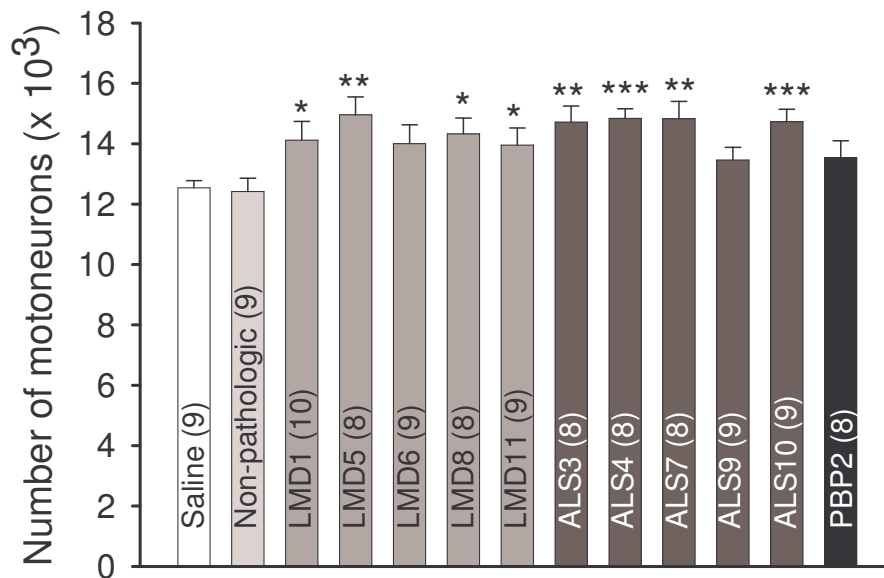


Figura 4. Nombre de MNs $\times 10^3$ després de la injecció de 20 μ l de sèrum salí, 20 μ l de sèrum control i 20 μ l de sèrums patològics ALS, LMD i PBP. Resultats individuals per sèrum. Entre parèntesis, nombre d'embrions contats per sèrum. * $p < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.001 one way ANOVA vs saline

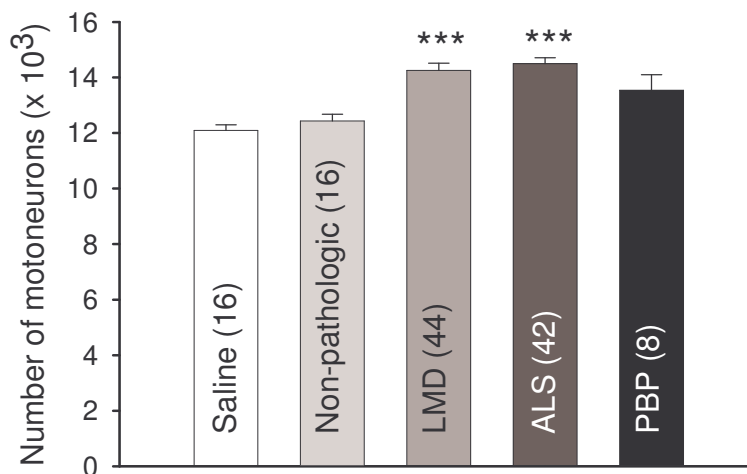


Figura 5. Nombre de MNs $\times 10^3$ després de la injecció de 20 μ l de sèrum salí, 20 μ l de sèrum control i 20 μ l de sèrums patològics ALS, LMD i PBP. Resultats agrupats per patologia. Entre parèntesis, nombre d'embrions contats per malaltia. * $p < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.001 one way ANOVA vs saline.

3.1.2 Efecte de l'administració d'Immunoglobulines G (IgG) de sèrums en el nombre de MNs.

Per tal de determinar la part dels sèrums que era responsable d'aquest rescat de MN durant el període de PCD es van processar els sèrums per tal de separar-ne les Ig G de la resta. Es va injectar, tant per sèrums ALS com per sèrums LMD, la fracció que contenia les IgG i la fracció sense IgG seguint el mateix procediment anterior. Per tots els casos, es van administrar 10 µl de sèrums amb una concentració proteica equivalent al sèrum inicial.

Després de fer tot el procés i el recompte, es va poder constatar que les IgG donaven xifres significativament superiors de MN respecte la fracció sense IgG i respecte el control per part dels sèrums patològics ALS (Figura 6) i LMD (Figura 7). Per tant, eren les responsables de l'efecte de rescat de la mort de MN durant la PCD.

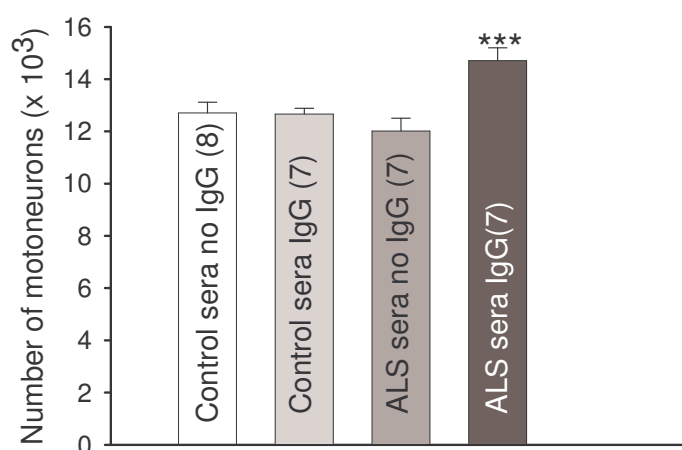


Figura 6. Recompte del nombre de MNs $\times 10^3$ després de la injecció de 20 µl de fracció sense IgG de sèrum control, fracció amb IgG de sèrum control, fracció sense IgG de sèrum ALS i fracció amb IgG de sèrum ALS. * $p < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.001 one way ANOVA vs control sera IgG.

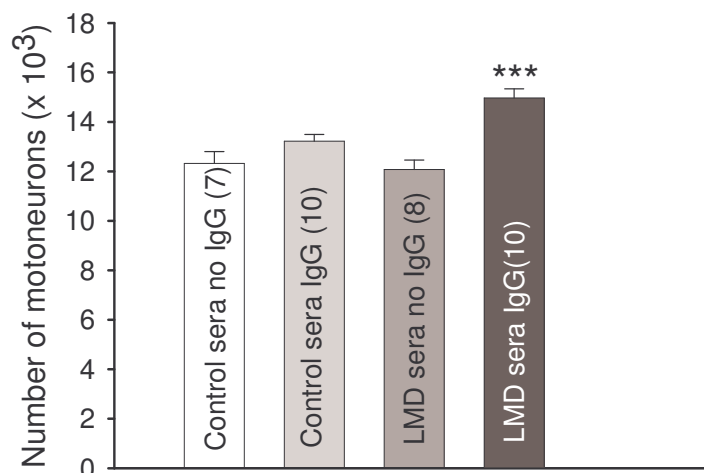


Figura 7. Recompte del nombre de MNs $\times 10^3$ després de la injecció de 20 μ l de sèrum salí, fracció sense IgG de sèrum control, fracció amb IgG de sèrum control, fracció sense IgG de sèrum LMD i fracció amb IgG de sèrum LMD. * $p < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.001 one way ANOVA vs control sera IgG.

3.1.3 Efecte de l'administració dels sèrums en la ramificació nerviosa intramuscular.

Per tal d'esbrinar si l'efecte inhibitor de la mort de les MN embrionàries era un procés intrínsec de la MN o bé depenia de la interacció de la MN amb la seva diana muscular, es va procedir a estudiar la ramificació nerviosa intramuscular del múscul Iliofibularis (IFIB), innervat pel grup de MN lumbar que prèviament s'havien recomptat.

La injecció de 20 μ l dels sèrums salí, controls, ALS, LMD i PBP es va produir de E5 a E7 i a E8 o a E10 es van processar les mostres per tal d'observar el patró de ramificació nerviosa en preparacions de múscul sencer. En la Figura 8 es pot observar el patró d'innervació del múscul IFIB d'embrions de pollastre E8 (Figura 8 A, B) i E10 (Figura 8 C, D) després del tractament amb els sèrums controls (Figura 8 A, C) i amb sèrums patològics (B, D) i el processament de les imatges per la seva quantificació (Figura 8 E-H).

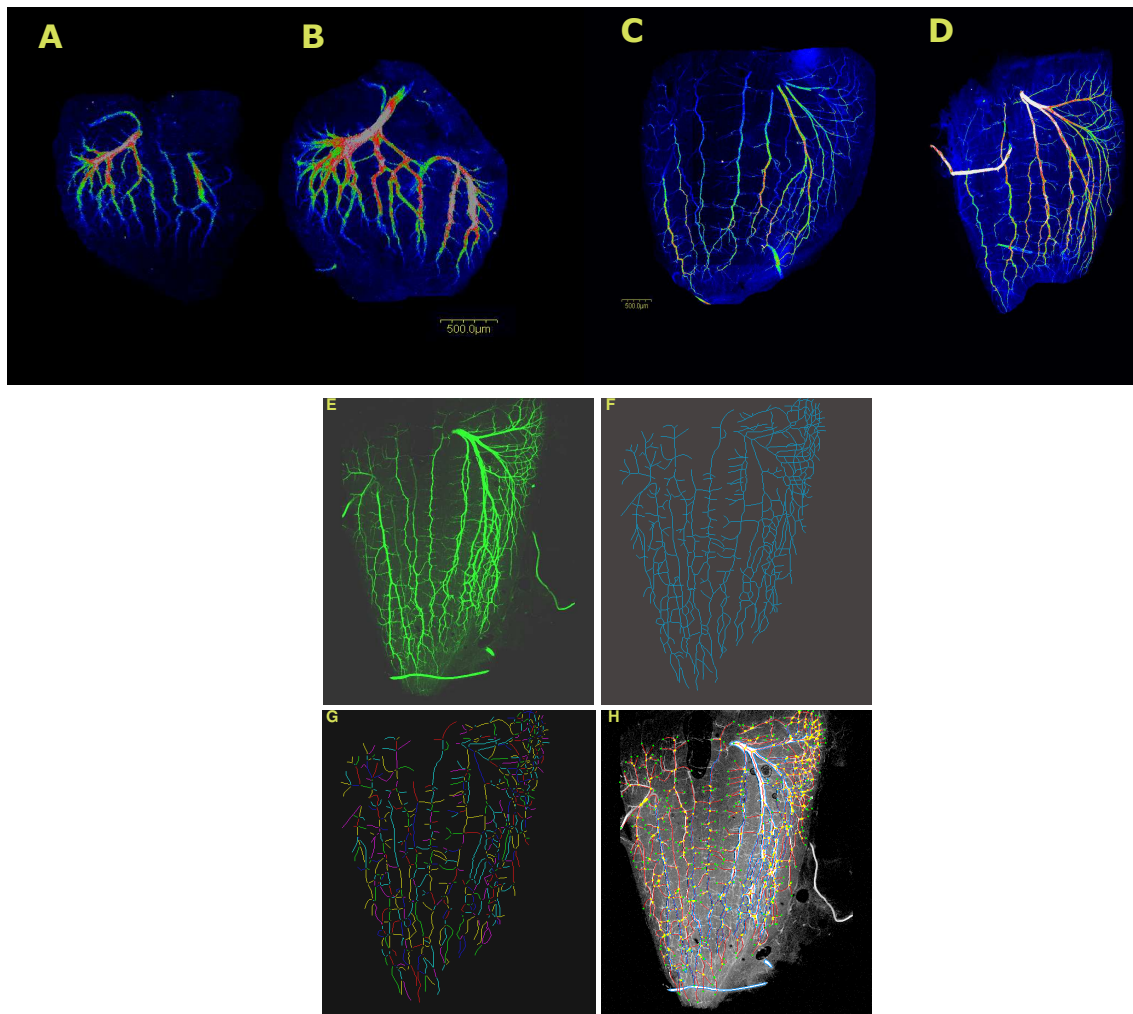


Fig. 8. Patró d'innervació del múscul IFIB d'embrions de pollastre E8 (A, B) i E10 (C, D) després del tractament amb els sèrums controls (A, C) i amb sèrums patològics (B, D). El patró d'innervació va ser quantificat després del processament de les imatges (E-H).

Per tal de quantificar l'efecte dels sèrums salí, controls i patològics, es va optar per utilitzar els següents paràmetres: nombre de Segments Totals (Figura 9), nombre de Segments Finals (Figura 10) i nombre de Trifurcacions (Figura 11), utilitzant com a valor de referència 100% el valor obtingut del sèrum salí. Es va observar que, tant per sèrums ALS com per sèrums LMD, els tres paràmetres augmentaven significativament, portant així a un augment de la ramificació intramuscular. En canvi, el sèrum PBP no només no aconseguia augmentar els tres paràmetres sinó que en produïa un decrement en comparació als sèrums controls i salí. Cal recordar que només es va utilitzar un sol sèrum PBP per realitzar aquests experiments.

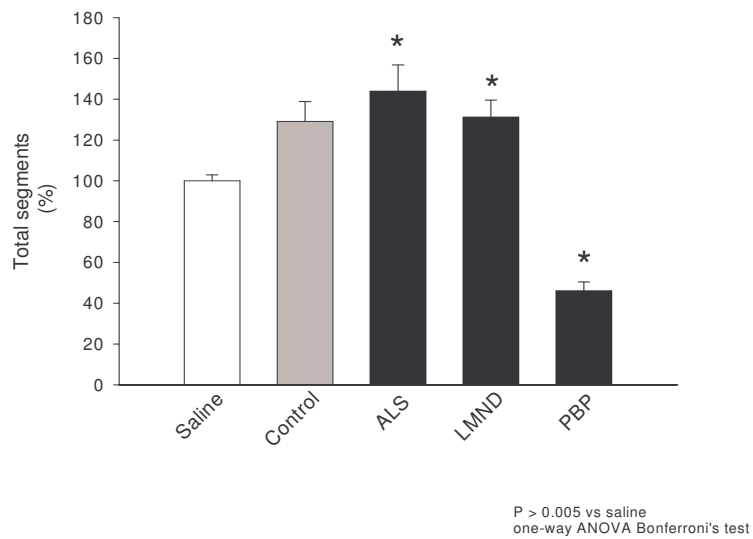


Fig. 9. Percentatge (respecte salí=100%) del nombre de segments totals de l'arbre nerviós del múscul IFIB després del tractament d'embrions de pollastre amb 20 µl. de sèrum salí, sèrums control, sèrums ALS, sèrums LMD i sèrum PBP.

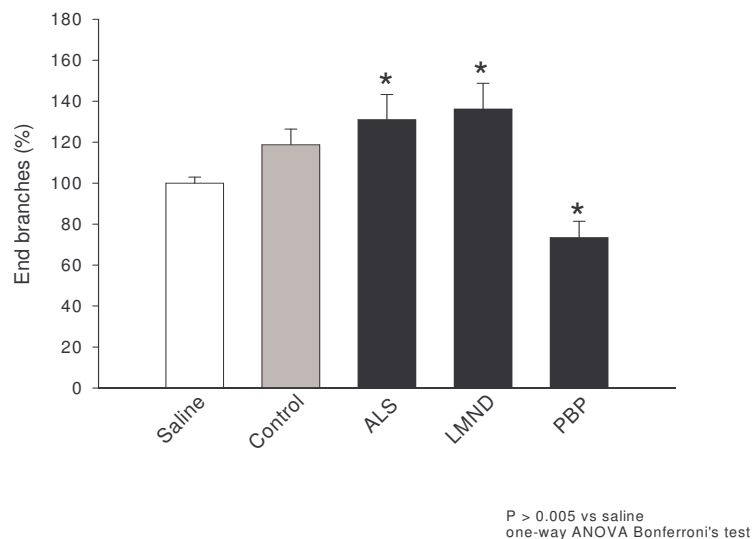


Fig. 10. Percentatge (respecte salí=100%) del nombre de Segments Finals de l'arbre nerviós del múscul IFIB després del tractament d'embrions de pollastre amb 20 µl de sèrum salí, sèrums control, sèrums ALS, sèrums LMD i sèrum PBP.

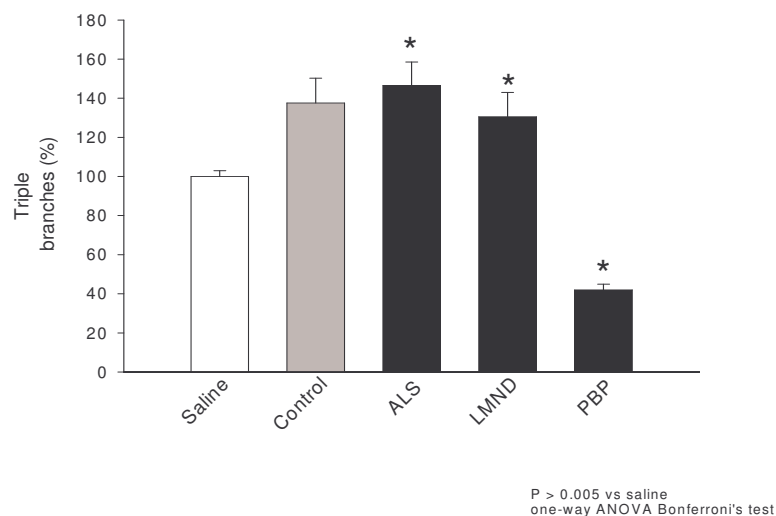


Fig. 11. Percentatge (respecte salí=100%) del nombre de Trifurcacions de l'arbre nerviós del múscul IFIB després del tractament d'embrions de pollastre amb 20 µl. de sèrum salí, sèrums control, sèrums ALS, sèrums LMD i sèrum PBP.

3.2. Determinació de la presència d'anticossos circulants en sèrums patològics.

3.2.1 Unió d'anticossos circulants a proteïnes dels sistema nerviós.

Un cop es va saber que els sèrums tenien efecte rescatador de MN durant el període de PCD, que concretament les responsables d'aquest efecte eren les IgG i que a més els sèrums produïen un augment de la innervació intramuscular, es va procedir a fer estudis proteòmics per tal d'identificar els antígens reconeguts pels anticossos presents en els sèrums patològics responsables de tots aquests canvis.

Primerament es van assajar alguns dels sèrums patològics per tal de veure si eren capaços d'unir-se a proteïnes de diferents teixits d'embrions de pollastre E10 mitjançant tècniques de Western Blot (Figura 12). Es van estudiar els següents teixits: cor, múscul, intestí, ronyó, medul·la espinal, fetge i pulmó, i es va poder determinar que els sèrums patològics eren capaços d'unir-se selectivament a proteïnes del sistema nerviós de l'embrió de pollastre (Figura 12a), essent les responsables d'aquesta unió les IgG (Figura 12b). En canvi, els sèrums control no mostraven senyals indicatives de capacitat d'unió a proteïnes de cap teixit de l'embrió de pollastre (Figura 13a), el mateix que les seves IgG (Figura 13b).

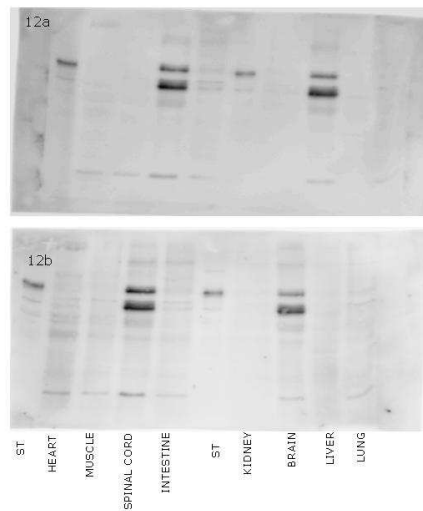


Figura 12. a. Western blot on es posa de manifest la unió específica de sèrums patològics a proteïnes del sistema nerviós de l'embrió de pollastre. b. Aquesta unió específica es deguda a les IgG de sèrums patològics.

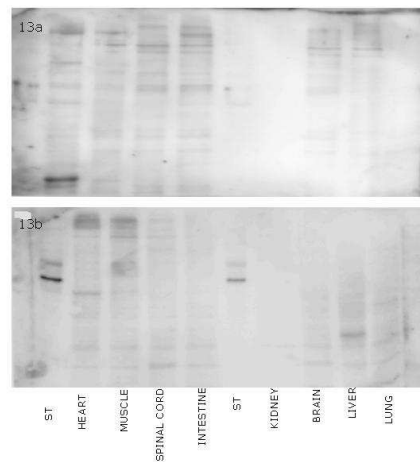


Figura 13. a. Western blot on s'observa que els sèrums control no s'uneixen a proteïnes del sistema nerviós de l'embrió de pollastre. b. Les IgG dels sèrums control tampoc tenen cap capacitat d'unió.

3.2.2 Identificació dels antígens reconeguts pels anticossos circulants per espectrometria de masses.

Un cop es va demostrar que algunes IgG de sèrums patològics eren capaces d'unir-se a proteïnes del Sistema Nerviós de pollastre, es va voler identificar quines eren les proteïnes reconegudes. Mitjançant tècniques d'Isoelectroenfoc (IEF) i Electroforesis Bidimensional (2D) (Figura 14a) i Western Blot (Figura 14b) es va

poder aïllar sobre gel de poliacrilamida i sobre membrana de nitrocel·lulosa respectivament una proteïna de medul·la espinal d'embrió de pollastre E10 a la qual s'unien les Ig G dels sèrums patològics.



Figura 14a: Electroforesi 2D de medul·la espinal d'embrió de pollastre E10 on s'observen el total de proteïnes de la mostra.

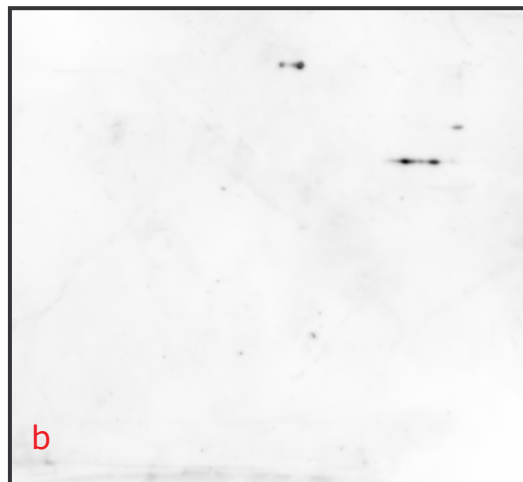


Figura 14b: Western blot provinent d'electroforesi 2D de medul·la espinal d'embrió de pollastre E10 utilitzant com a anticòs primari sèrum patològic. Les proteïnes aquí reconegudes poden ser identificades i retallades en el gel de poliacrilamida.

Amb tècniques d'espectrometria de masses-MALDI-TOF es va poder determinar que la proteïna reconeguda per les IgG provinents de sèrums humans patològics eren proteïnes de la família de la SEMAFORINA o relacionades amb la mateixa. Les semaforines són unes proteïnes implicades en senyalització del sistema nerviós en desenvolupament amb senyals inhibidores principalment, entre altres processos com angiogènesis o càncer. En la Figura 15 es pot observar l'espectre corresponent

a les masses dels pèptids després de tot el procés, aquest espectre va ser identificat posteriorment com el corresponent a la proteïna semaforina. Després de testar diferents sèrums patològics, aïllar els spots corresponents i fer la seva identificació, es va observar que tots els spots identificats es corresponien a proteïnes de la família de les Semaforines o proteïnes relacionades amb les seves vies de senyalització, com es pot veure en la Figura 16.

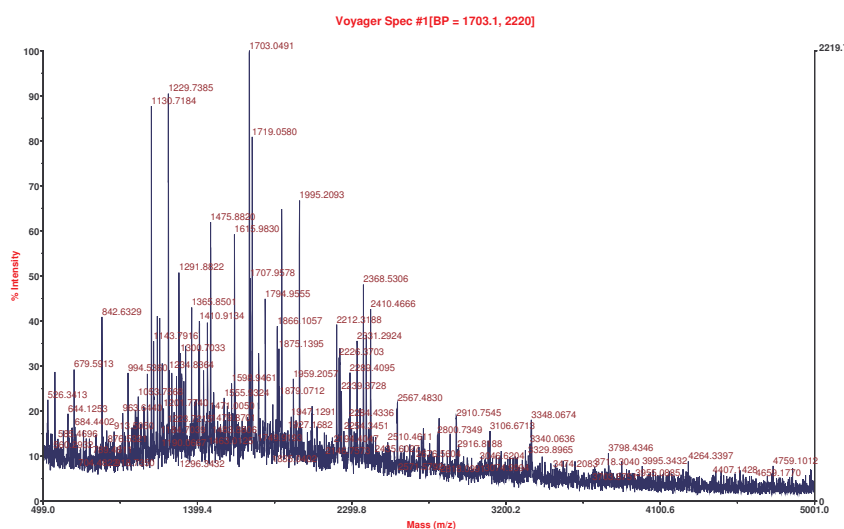


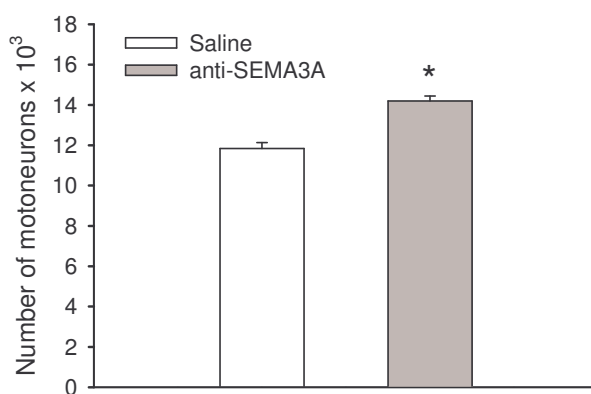
Figura 15. Espectre peptídic resultant de la digestió de la proteïna on s'unien els sèrums humans patològics, identificada posteriorment com a proteïna de la família Semaforina.

SÈRUM	PROTEÏNA RECONEGUDA
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)

Figura 16: Llistat de proteïnes reconegudes pels sèrums de persones afectades per la malaltia de la MN, després de seguir el protocol de MALDI-TOF i la posterior identificació dels espectres.

3.2.3 Efecte de la injecció d'anticòs anti-Sema3A sobre la supervivència de MNs d'embrions de pollastre.

Ja que s'havia comprovat que les IgG de sèrums patològics ALS i LMD eren responsables del rescat de MN de la PCD i alhora aquests sèrums reconeixien la proteïna Semaforina, es va voler comprovar si un anticòs comercial anti-Sema 3A tindria el mateix efecte promotor de supervivència de MN. Així, es van injectar embrions de pollastre de E5 a E9 amb un volum d'anticòs anti Sema 3A (Sta. Cruz) que equivalia en concentració a la concentració de IgG dels sèrums. Com es pot observar en la Figura 17, el nombre de MN a E10 en embrions tractats amb anti-Sema 3A és significativament superior al nombre de MN del tractament amb sèrum salí, per tant corrobora els resultats prèvis i afirma que són els anticossos anti-Semaforina els responsables del rescat de MN en el període de PCD i l'augment de ramificació nerviosa intramuscular.



* p < 0.0001 student t test

Figura 17: El nombre de MN x10³ en embrions tractats de E5 a E9 amb l'anticòs comercial anti-Sema 3A augmenta significativament en relació al nombre de MN del tractament amb sèrum salí.

Per tal de corroborar la presència d'anticossos anti Semaforina en els sèrums es va testar la proteïna comercial recombinant Sema 3A (R&D Systems) amb tècniques de Western Blot. El resultat de l'experiment es pot veure en la Figura 18. Es va carregar la proteïna comercial a un gel d'acrilamida i es va realitzar el WB utilitzant com a anticòs primari: 1. anti Sema 3A (Santa Cruz). 2. fracció IgG sèrum ELA. 3. fracció IgG sèrum control. En els altres carrils es van fer controls sense anticòs primari, carril 4 només anticòs secundari anti-goat i carril 5, només anticòs secundari anti-human. S'observa que tant l'anticòs comercial anti Sema 3A com les

IgG patològiques reconeixen la proteïna Sema 3A. Les Ig G de sèrums control i els altres controls interns van donar resultats negatius. Així, amb aquesta tècnica proteòmica es torna a demostrar que en sèrums humans patològics hi ha anticossos contra la proteïna Sema3A.

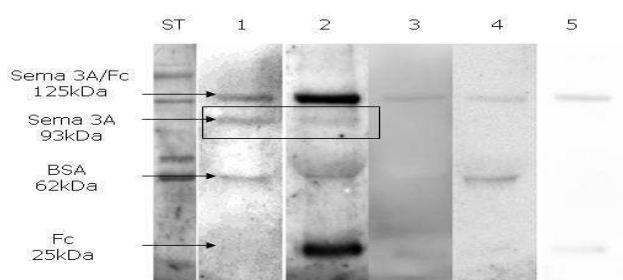


Figura 18: WB de proteïna recombinant Sema 3A on s'ha utilitzat com a anticòs primari: 1. anti Sema 3A (Santa Cruz). 2. fracció IgG sèrum ELA. 3. fracció IgG sèrum control. 4. només anticòs secundari anti-goat. 5. només anticòs secundari anti-human. El recuadre demostra que l'anticòs comercial i les IgG patològiques reconeixen la proteïna comercial.

3.2.4 Producció i purificació de proteïna Semaforina recombinant en cèl·lules COS7.

Per tal de poder fer més experiments i no tenir limitacions per la disponibilitat de la proteïna semaforina, es va decidir produir la proteïna recombinant al laboratori. Es va optar per produir Semaforina 3A, ja que aquesta havia estat identificada en el reconeixement d'un sèrum patològic i els experiments previs amb proteïna comercial havien estat fets amb aquesta forma proteica. Així, cèl·lules COS7 van ser transfectades amb el plàsmid que contenia AP-Sema 3A, i mantingudes en cultiu durant 72 hores. Passat aquest temps, el medi de cultiu es va recuperar i es va concentrar. Per tal de purificar la Sema 3A es va fer una cromatografia d'afinitat i posteriorment es va comprovar la presència de Sema 3A mitjançant un Western Blot utilitzant com a anticòs primari anti Sema 3A de Abcam. Com es pot veure en la Figura 19, la proteïna no apareixia en el primer eluït, ja que era la part que no va quedar retinuda en la matriu. En la carrera 2 i en la carrera 3 es pot veure com

l'anticòs reconeix la proteïna que ha estat eluïda amb la solució d'elució. És per això que amb aquest experiment queda comprovada la producció de Sema 3A en cèl·lules COS7 i la seva posterior purificació.

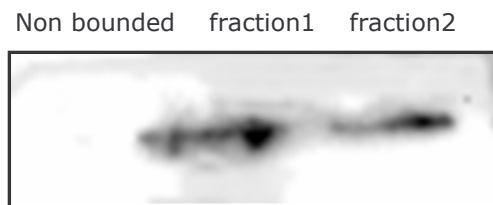


Figura 19: Western Blot utilitzant Anti Sema 3A (Abcam) com a anticòs primari de les diferents fraccions obtingudes de la purificació de Sema 3A amb una columna de cromatografia d'afinitat. En la segona i tercera carrera és on s'observa la proteïna Sema 3A. Non bounded: fracció no unida a la columna. Fraction: fracció unida a la columna i eluïda amb el tampó d'elució.

3.2.5 Unió dels anticossos circulants de sèrums patològics a proteïna Sema3A. ELISAs.

Per tal de caracteritzar sistemàticament i de forma estandaritzada la presència d'anticossos anti Semaforina en els sèrums es va optar per utilitzar un test d'ELISA. Donat que la única proteïna comercial de Sema 3A (R&D Systems) porta unida una regió constant Fc d'immunoglobulina humana i que l'anticòs secundari adequat per unir-se als sèrums humans és també un anti-humà, va ser impossible utilitzar aquesta proteïna comercial per fer el test. Així, es va produir la proteïna recombinant amb tècniques de biologia molecular. Els sèrums es van testar en la ELISA utilitzant-los com a anticossos primaris contra la proteïna recombinant AP-Sema 3A com a antígen, secretada per les cèl·lules COS-7 al medi de cultiu i posteriorment concentrada i purificada. Els sèrums utilitzats van ser: sèrums CONTROL (n=9), pertanyents a persones sanes sense cap malaltia neurodegenerativa diagnosticada, sèrums de pacients amb alguna malaltia neurodegenerativa (Alzheimer, Parkinson i Miastènia gravis), etiquetats com a PATOLÒGICS (n=10) i sèrums de pacients amb malaltia de la MN (ELA o LMD), etiquetats amb diferents números segons el codi aportat pels diferents centres hospitalaris que ens van cedir les mostres. Els resultats del test d'Elisa es poden veure en la Figura 20. Com es pot observar, en 7 dels 20 sèrums patològics ALS i LMD hi ha diferències significatives pel que fa la densitat òptica (que implica reconeixement de l'antígen Sema 3A per l'anticòs) respecte els sèrums PATOLÒGICS. Com a referència estadística es va utilitzar el valor dels sèrums PATOLÒGICS ja que es va observar que presentaven una diferència significativa pel

que fa la densitat òptica en relació als sèrums CONTROL. El significat d'aquest fet es desconeix. Així, es demostra la presència d'autoanticossos anti Sema 3A en alguns sèrums de pacients amb malalties de la MN. Aquesta presència seria pròpia només d'aquest tipus de malaltia i no d'altres malalties neurodegeneratives. El fet que utilitzant com a anticòs primari l'anticòs comercial ABCAM s'obtinguin valors de densitat òptica similars als valors significativament superiors dels sèrums ELA corrobora aquest fet.

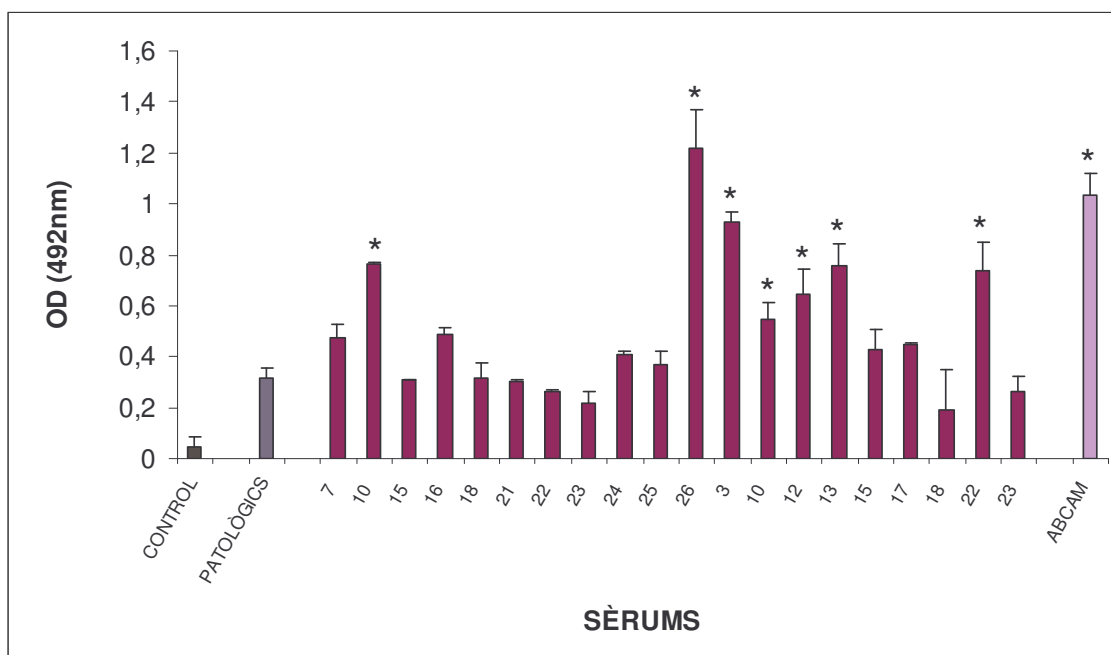


Figura 20: Representació gràfica dels resultats del test d'ELISA de l'assaig del reconeixement per part de diferents sèrums humans de la proteïna recombinant AP-Sema3A, on s'observa que alguns dels sèrums de malalts d'ELA mostren diferències significatives amb els sèrums CONTROL i PATOLÒGICS pel que fa la densitat òptica, que implica un reconeixement per part del sèrum de l'antígen Sema3A. * $p < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.001 ANOVA d'un factor post hoc DMS test vs PATOLÒGICS.

3.2.6 Assaig de colapse de conus de creixement amb Semaforina i la seva inhibició per part de sèrums patològics

Per tal d'investigar l'activitat funcional dels autoanticossos anti Sema 3A en sèrums de pacients amb ELA es va realitzar un assaig d'inhibició del colapse de conus de creixement en neurones de ganglis raquidis (DRG), estimulades amb NGF, d'embrió de pollastre E7. Segons Raper i Kapfhammer (1990) la Semaforina és capaç de colapsar i tancar els conus de creixements dels axons dels DRG, per tant, si en els

sèrums hi ha anticossos anti Semaforina, aquesta inhibició dels conus de creixement quedarà revertida i la morfologia oberta del conus es mantindrà.

Després de la seva dissecció, del seu cultiu amb medi amb concentració de NGF de 20ng/ml durant 24 hores i d'una pre-incubació amb medi de cultiu amb la concentració de NGF disminuïda (10ng/ml) durant 40 minuts, els ganglis van ser sotmesos durant 1 hora al tractament adequat. Després de fer el recompte de n=3 mínim de ganglis es va mesurar el percentatge de colapse induït com el ratio de conus tancats respecte el total de, com a mínim, 50 conus contats per cada gangli. Com a exemple, en la Figura 21 es pot observar la morfologia de conus de creixement oberts (a) i de conus de creixement colapsats i tancats (b).

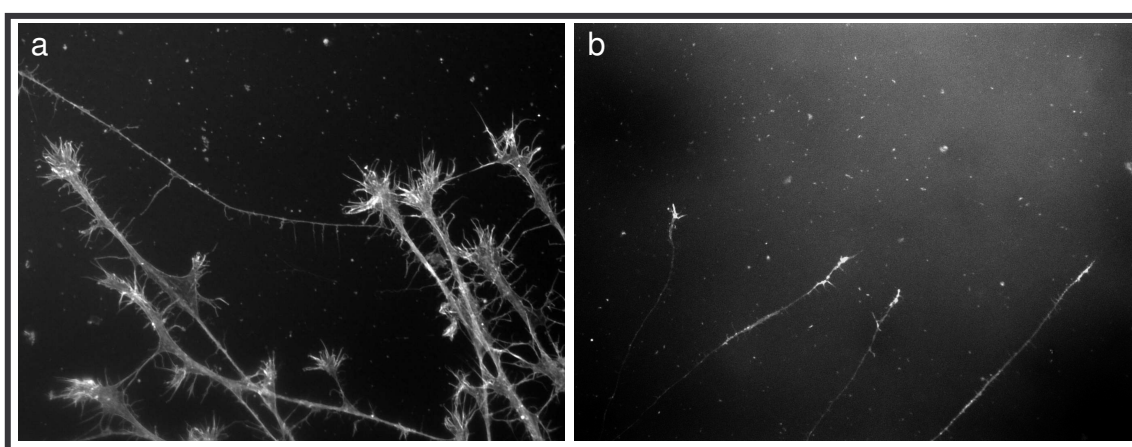


Figura 21: Imatges de conus de creixement oberts (a) i colapsats (b) provinents de ganglis de l'arrel dorsal d'embrió de pollastre de 7 dies.

El primer experiment que es va fer va tenir com a objectiu fixar la dosi de Semaforina 3A (R&D Systems) amb la qual es treballaria posteriorment. Es buscava la dosi mínima de treball amb la qual hi hagués un colapse significatiu de conus. Així, es van testar diferents concentracions de Semaforina 3A: 0, 25, 50, 100, 200 i 300 ng proteïna/ml. A partir d'aquest experiment es va decidir utilitzar la dosi de 25 ng/ml de Sema 3A per portar a terme l'assaig de colapse amb els sèrums humans, ja que aquesta era la dosi mínima que produïa un colapse significatiu (Figura 22).

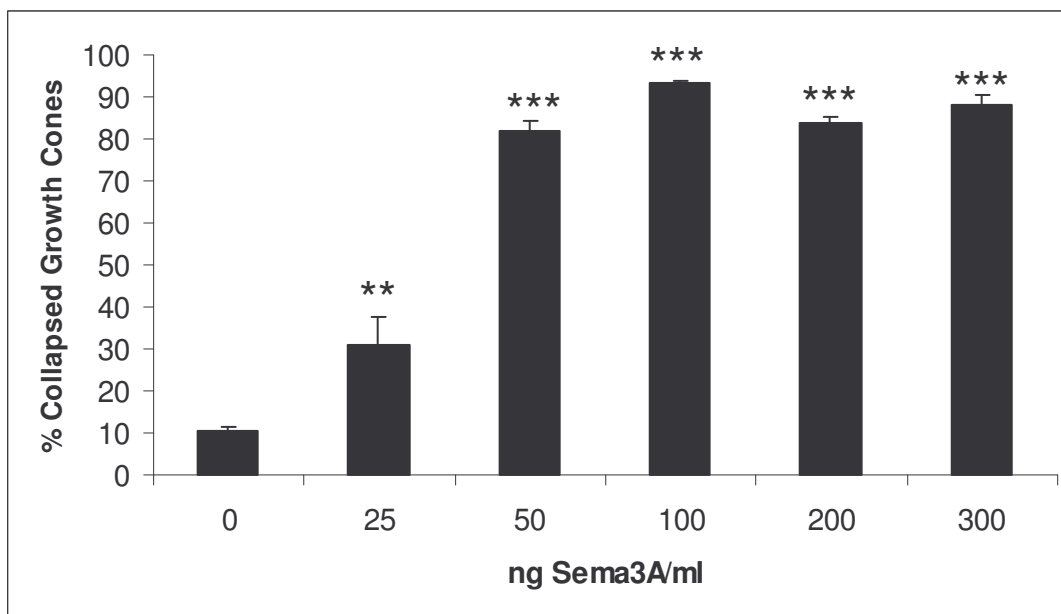


Figura 22: Percentatge de Conus de Creixement Colapsats després del tractament amb diferents concentracions de Semaforina 3A. * $p < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.001 ANOVA d'un factor post hoc DMS test vs 0 ng Sema 3A/ml.

Per comprovar que el mètode funcionava, es van fer experiments de colapse amb la Sema 3A (R&D Systems) i l'anticòs comercial anti Sema 3A (Abcam). El que caldria esperar és que l'efecte inhibitor del colapse de conus de la Sema 3A fós inhibit per l'anticòs anti Sema 3A. Així, el que es va fer va ser pre-incubar 1 hora els 25 ng/ml de Sema 3A (R&D Systems) amb diferents dilucions de l'anticòs. Es va veure que quan aquest es diluïa a 1:50 i a 1:100 amb els 25 ng de Sema 3A, els efectes del colapse eren revertits significativament, com s'observa en les diferències significatives entre aquestes dilucions i el control que es correspon al colapse sense l'anticòs (anomenat 25ng Sema) (Figura 23). D'aquesta manera es comprova l'efecte inhibitor del colapse per part de l'anticòs anti Sema 3A.

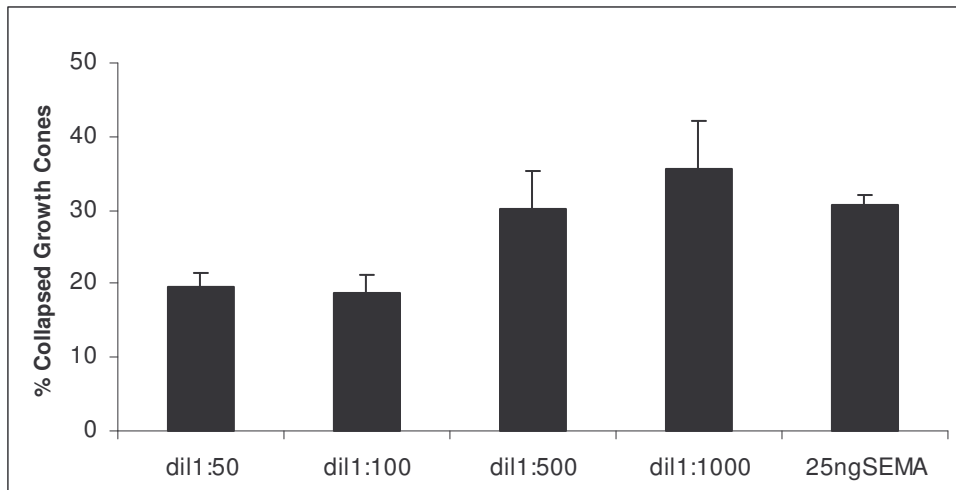


Figura 23: Representació gràfica del percentatge de Conus de Creixement colapsats després de la pre-incubació de la proteïna Sema 3A amb diferents dilucions de l'anticòs anti Sema 3A de Abcam, on s'observa que amb les dilucions 1:50 i 1:100 queda revertit l'efecte colapsant de la Semaforina 3A. * $p < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.001 ANOVA d'un factor post hoc DMS test vs 25 ng Sema.

Una vegada es van fer tots aquests experiments, es van analitzar llavors diferents dilucions d'un sèrum patològic que havia mostrat resultats positius en el test d'ELISA. Es va triar per fer aquest primer assaig de test de concentracions el sèrum número 26, i es van utilitzar dilucions de 1:10, 1:25 i 1:50. Com es pot veure en la Figura 24, de les dilucions de sèrum pre-incubades amb Sema 3A va ser la dilució 1:10 la que va permetre inhibir l'efecte de colapse de conus de creixement de la Sema 3A. Per contra, les dilucions 1:25 i 1:50 no eren suficientment potents per revertir l'efecte de colapse de la Semaforina. Un sèrum control 1:10 tampoc era capaç d'aturar l'efecte d'inhibició dels conus de creixement de la proteïna Sema 3A.

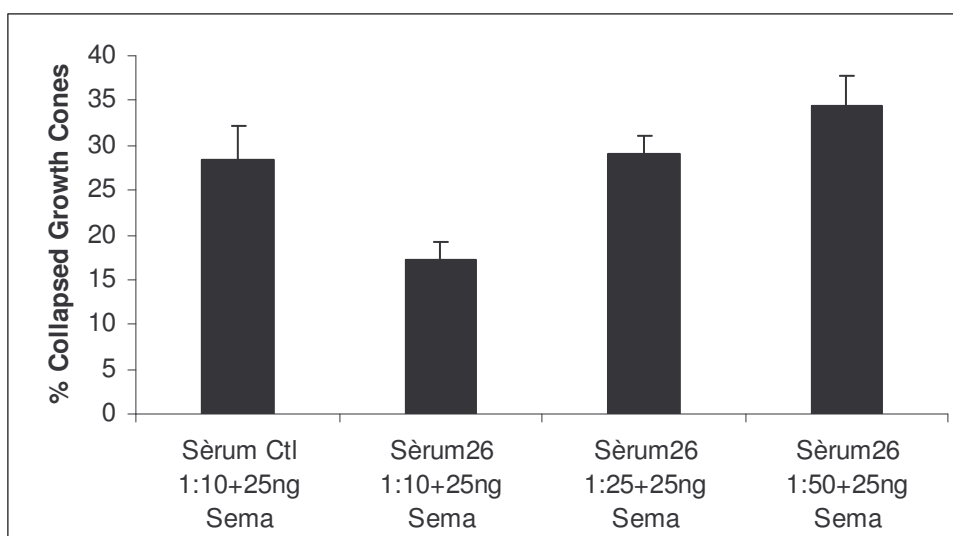


Figura 24: Representació gràfica del percentatge de conus de creixement colapsats després d'una pre-incubació de 25ng proteïna Sema 3A amb diferents dilucions de sèrum patològic número 26 (1:10, 1:25 i 1:50) i amb sèrum control a 1:10. Es pot observar que amb la dilució 1:10 del sèrum patològic es reverteix l'efecte colapsant de conus de la Semaforina 3A. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ANOVA d'un factor post hoc DMS test vs Sèrum Control.

Es va decidir provar llavors altres sèrums que havien obtingut un resultat significativament positiu en la ELISA amb una única dilució, 1:10. Es van triar per fer aquest experiment els sèrums 3, 10 i 13, a més d'un sèrum humà control. Es va procedir de la mateixa manera, pre-incubant els sèrums humans a dilució 1:10 amb els 25 ng de Semaforina 3A i fent després l'assaig de colapse amb els ganglis. Com es pot constatar en la Figura 25, els 3 sèrums triats per fer l'assaig de colapse van donar resultats significatius pel que fa el control, ja que van ser capaços de reduir significativament el percentatge de colapse dels conus de creixement respecte el sèrum control. Amb aquests experiments es va demostrar llavors que aquests tres sèrums patològics, el número 3, 10 i 13, a més del número 26, testat prèviament, eren capaços d'inhibir significativament el colapse de conus produït per la Semaforina 3A. S'afirma d'aquesta manera, amb mètodes diferents del MALDI TOF, de recomptes cel·lulars i de la ELISA, la presència d'autoanticossos anti Sema 3A, en alguns sèrums de malalts de malalties de la MN.

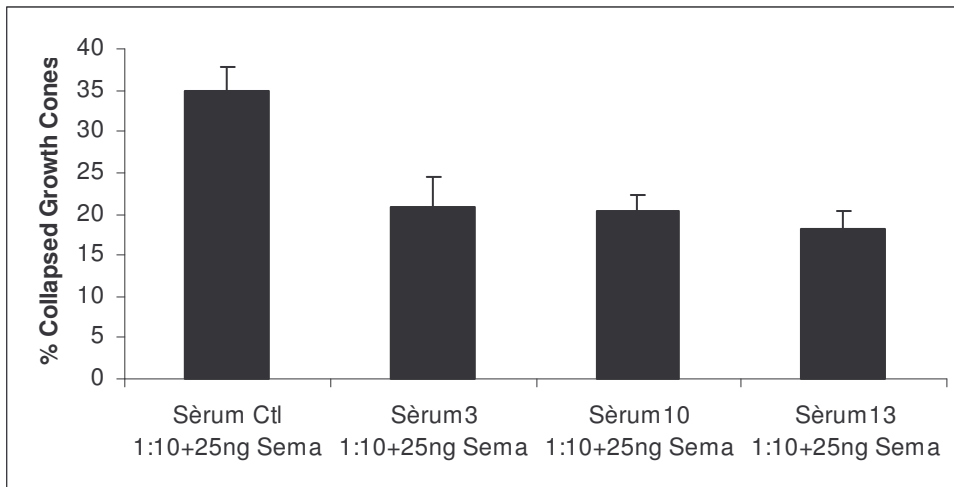


Figura 25: Representació gràfica del percentatge de colapse de Conus de creixement després d'una pre-incubació de 25ng proteïna Sema 3A amb diferents sèrums patològics, que havien donat resultats significatius en les ELISAs, a dilució 1:10. Els resultats mostren una reducció en el percentatge de conus colapsats respecte el sèrum control també a dilució 1:10. * $p < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.001 ANOVA d'un factor post hoc DMS test vs Sèrum Control.

3.2.7 Unió dels anticossos circulants de sèrums de ratolins transgènics SOD1^{G93A} a proteïnes del sistema nerviós de pollastre.

Paral·lelament es va voler investigar sobre la presència d'anticossos circulants en el sèrum de ratolins transgènics hSOD1^{G93A}. Es van testar sèrums d'animals de diferents edats (60 dies post natal, P60, P90 i P120) com a anticossos primaris contra proteïnes de diferents teixits d'embrió de pollastre. Com s'observa en la Figura 26, els sèrums dels animals transgènics són capaços de reconèixer proteïnes del Sistema nerviós de l'embrió de pollastre. Aquestes eren proteïnes de pes molecular al voltant de 90 kDa. Malgrat aquesta troballa, no es van identificar aquestes proteïnes reconegudes.

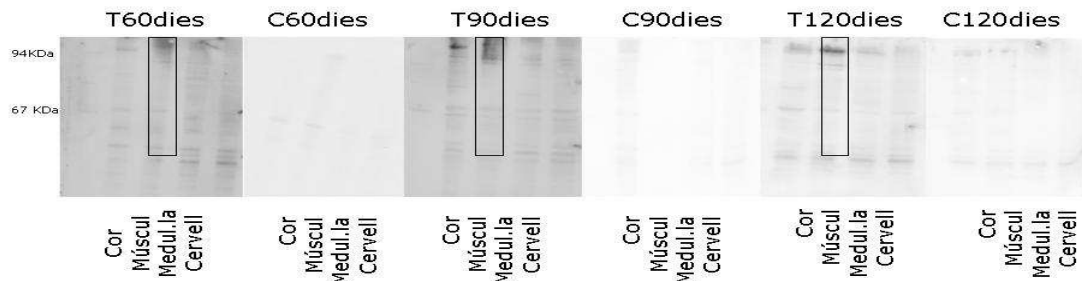


Figura 26: WB de diferents teixits d'embrió de pollastre E10 utilitzant com a anticòs primari diferents sèrums de ratolins Wild type (C) i transgènics hSOD1^{G93A} (T) de 60, 90 i 120 dies.

3.3. Reactivitat de l'anticòs anti-P2X4 en el model de rata transgènica SOD1^{G93A}

3.3.1 Expressió de P2X en el model de rata transgènica SOD1^{G93A}

Per tal d'explorar si els receptors P2X juguen un paper important en la degeneració de MN en la patologia de ALS, es va estudiar l'expressió de P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, i P2X₇ en la medul·la espinal de rates transgèniques hSOD1^{G93A}. Com es pot veure en la Figura 27, les imatges d'immunohistoquímiques d'animals transgènics de 120 dies no presentaven marcatge per P2X₁, P2X₂, P2X₃ i P2X₇, a excepció del marcatge de P2X₂ de cèl·lules en contacte amb el líquid cefaloraquídi (d'acord amb les troballes de Stoeckel *et al.*, 2003) i del marcatge de P2X₇ associat a microglia. En aquest últim cas, hi havia més marcatge en animals transgènics que en els wild type degut a l'activació microglial que presenten els primers en estadis avançats de la malaltia.

Pel que fa P2X₄, en el cervell normal, cèl·lules mononucleades perivasculars mostraven un cert grau de immunoreactivitat d'acord amb el prèviament descrit per Xiang i Burnstock (2005). A més, cossos cel·lulars neuronals adjacents al quart ventricle i al nucli vestibular lateral també mostraven aquest marcatge.

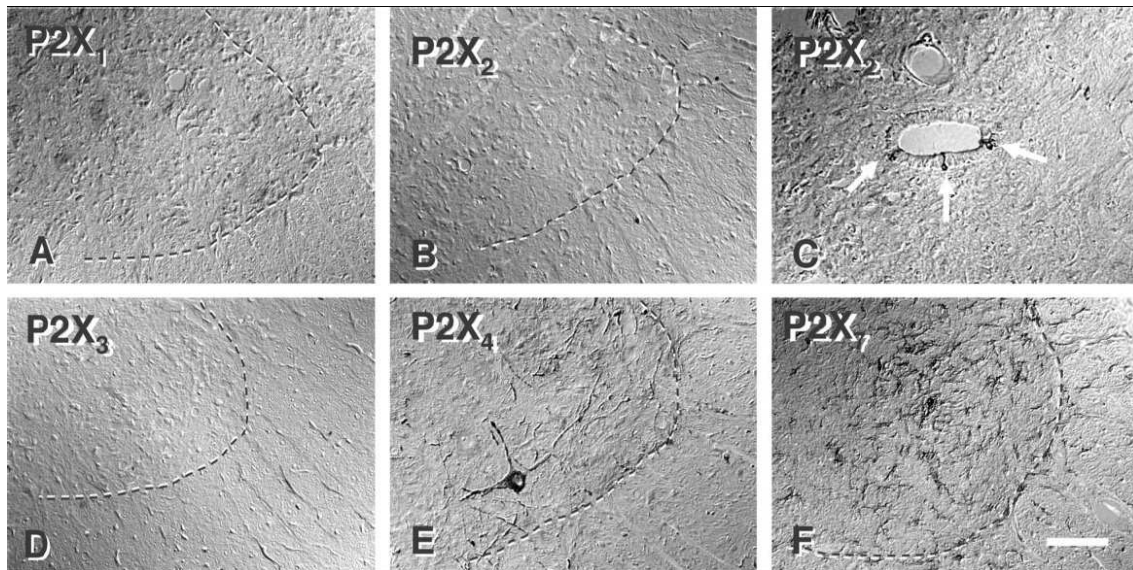


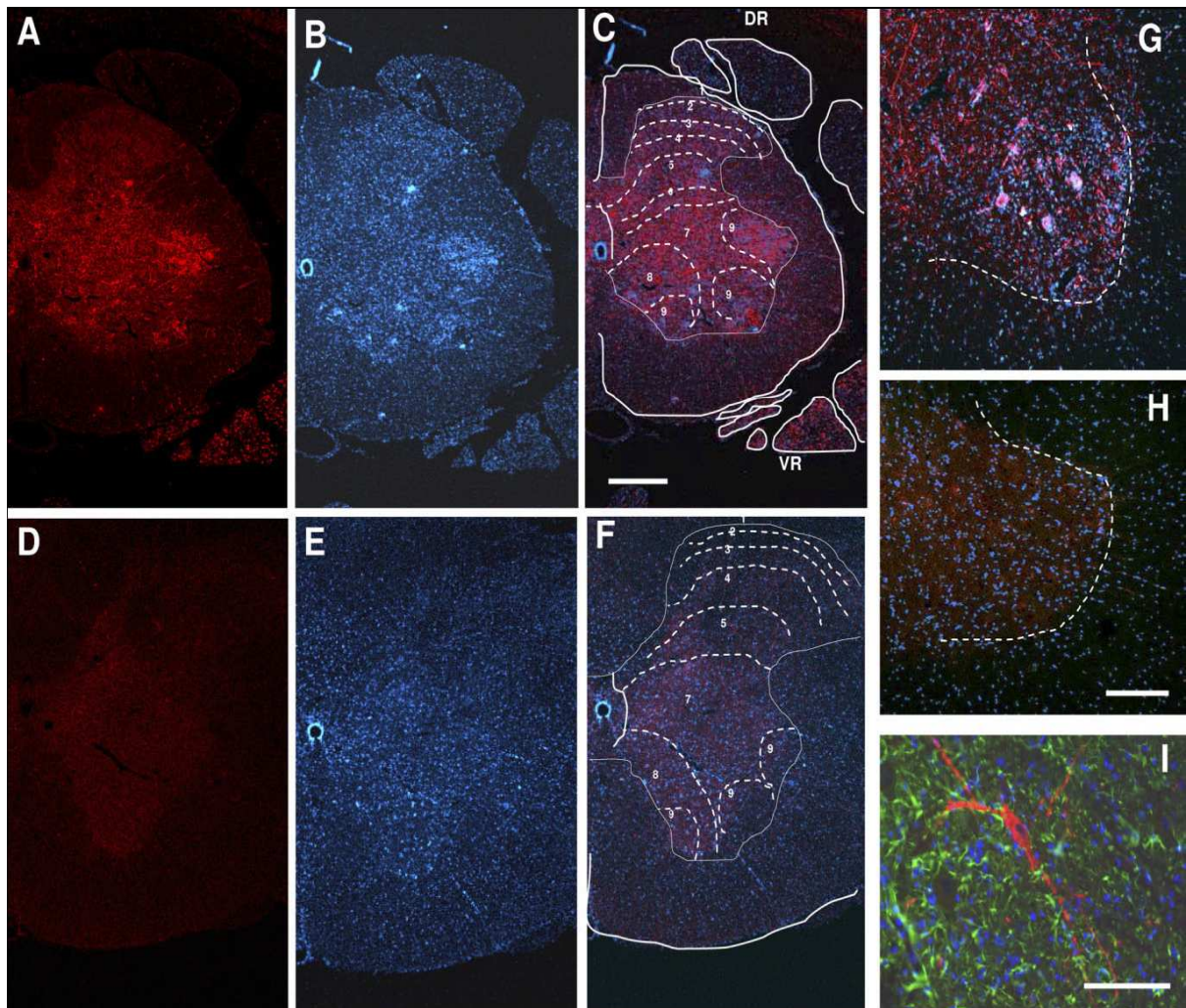
Figura 27: Marcatge del receptor P2X en medul·la espinal de rates transgèniques hSOD^{G93A} observat a microscòpia de contrast de fases. A, B, D: absència de marcatge per P2X₁, P2X₂, P2X₃. C: positivitat de P2X₂ en cèl·lules en contacte amb el líquid cefaloraquídi. E: fort marcatge a P2X₄ de MN de la banya ventral i fibres nervioses. F: marcatge per P2X₇ associada a microglia. Escala : 100µm.

3.3.2 Immunoreactivitat de l'anticòs anti-P2X₄ associada a MNs degenerades en el model de rata transgènica mSOD1^{G93A}

No obstant, es va observar un elevat marcatge de P2X₄ en matèria grisa de rates mSOD^{G93A} i en la làmines Rexed 5, 6, 7, 8 i 9. En la làmina 4 el marcatge era molt menys intens, i en les làmines 1, 2 i 3 el marcatge era totalment absent. Les estructures P2X₄ positives es corresponien a fibres i grans cossos neuronals. Aquests últims es trobaven principalment en la làmina 9, identificant-se com a MN de la banya ventral.

Per tal de determinar si aquest marcatge de P2X₄ era realment una diferència entre animals controls i transgènics es van realitzar dobles immunofluorescències (Figura 28) de medul·la espinal dels dos tipus de rates (A-C i G, rates transgèniques, D-F i H, rates control) de 150 dies. Com s'observa, en la mostra transgènica hi havia un marcatge de P2X₄ a nivell de banya ventral (VR) molt més elevat que a nivell d'arrel dorsal (DR). El marcatge per P2X₄ era pràcticament inexistent en la mostra control. (A i D, marcatge per P2X₄, B i E marcatge per DAPI, C i F: unió d'ambdós). En la Figura 28G es mostren detalls de la banya ventral d'una rata transgènica de 150 dies, i en la Figura 28H d'una rata control de la mateixa edat, delimitades per una línia discontinua, on es va fer un doble marcatge de P2X₄ (vermell) i DAPI

(blau). Es pot veure clarament el fort marcatge per P2X₄ en la mostra transgènica però no en la control. Observant la Figura 28 I, J, K, L, P es pot veure que la immunoreactivitat de P2X₄ no colocalitzava amb el marcatge per astròglia de GFAP (verd), ni amb marcatge per micròglia amb BS-1 (Figura 28M, N, O, Q). El que se'n dedueix és que el tipus cel·lular que immunoreacciona amb P2X₄ són les MN. No obstant, el que sí s'observa és que les MN marcades amb P2X₄ són embolcallades per cèl·lules fagocítiques microglials (M-O).



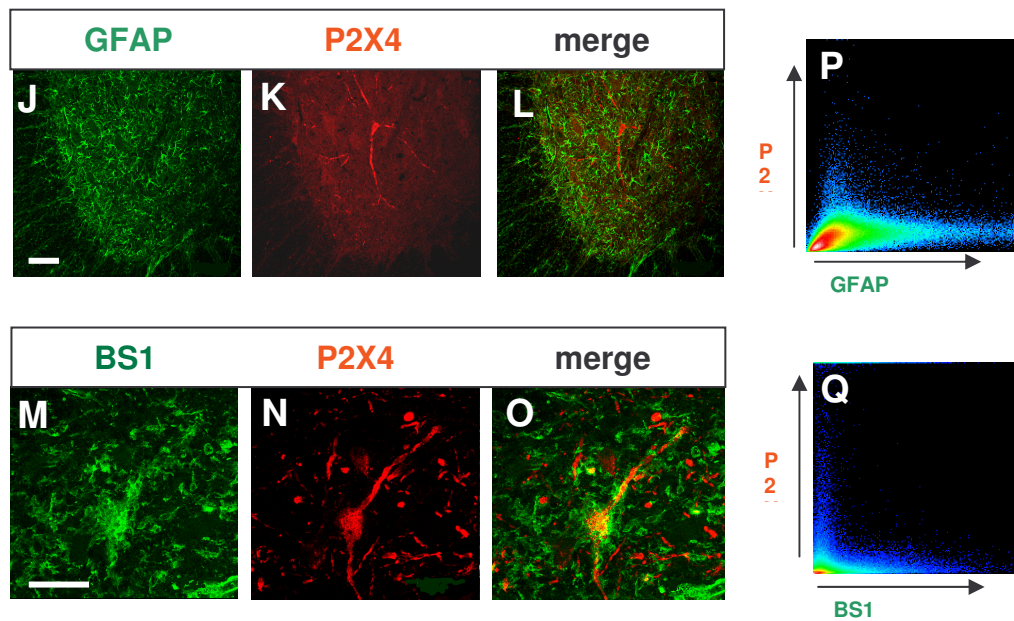


Figura 28: Immunoreactivitat de P2X₄ en seccions de medul·la lumbar de rata transgènica (A-C, G) o wild-type (D-F, H) on es posa de manifest marcatge per P2X₄ (A i D, vermell) i per DAPI (B, E, blau). C i F: superposició de les dues imatges respectives. G i H: detall de la banya ventral amb un doble marcatge de P2X₄ (vermell) i DAPI (blau) de medul·la espinal de rata transgènica (G) i control (H). I, J, K, L: el marcatge amb P2X₄ (vermell) no colocalitza amb el marcatge amb GFAP (verd) ni amb el marcatge per la Lectina BS-1 (M, N, O). En els dos casos, l'anàlisi de la colocalització determina l'absència de doble marcatge en estructures cel·lulars (P, Q). Escala: 500 μm en A-F, 200μm en G, H, 100 μm en I, 100μm en J, K, L, 50 μm en M, N, O.

Quan el marcatge de P2X₄ es combinava amb un marcador neuronal, com NeuN (Figura 29), s'observava que les cèl·lules positives per P2X₄ no ho eren per NeuN, cosa que suggeria que la positivitat per P2X₄ implicava una pèrdua de marcatge per NeuN (Figura 29 A, B), és a dir, una pèrdua de viabilitat neuronal. Els contactges de cèl·lules positives per NeuN indicaven una pèrdua neuronal a P90 en rates transgèniques, que queia dràsticament a P120-P150. Contràriament, el marcatge de P2X₄ començava a P90 (Fig. 29 D, E i F) i augmentava notablement a P120-P150 (Fig. 29 G, H i I). Així, la intensitat de fluorescència va ser mesurada per MN individuals i es va poder observar la relació inversa d'intensitat dels dos marcadors, ja que en estadis avançats de la malaltia (P120-150) la positivitat per P2X₄ era molt superior que en estadis presimptomàtics (P30) (Figura 30 A, B, E-M), al revés que el marcatge per NeuN, que era molt més evident en rates joves i quasi inexistent

en animals malalts. La relació $P2X_4/NeuN$ és 4.34 vegades major en animals transgènics vells que en joves (Figura 30 C,D), cosa relacionada amb la pèrdua motora d'aquests animals simptomàtics (Figura 29 C).

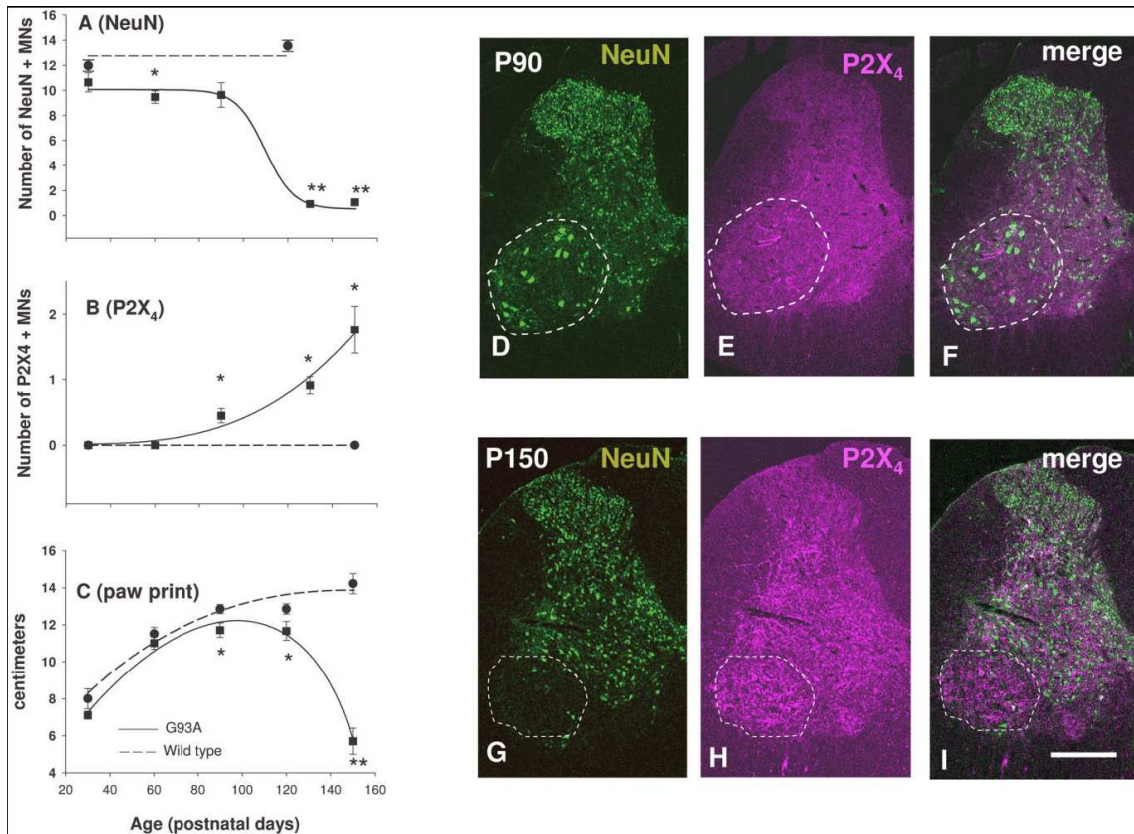


Figura 29: Curs temporal de la immunoreactivitat de $P2X_4$ en medul·la espinal de rata $mSOD1^{G93A}$ i la seva relació amb la progressió de la malaltia. A, B: mitjana \pm SEM del nombre de MN de la banya ventral de la medul·la espinal positives a NeuN (A) o $P2X_4$ (B). C: Resultat del test de Paw-print de rates WT i transgèniques de diferent edat. A destacar la relació inversament proporcional entre el nombre de MN NeuN positives i el marcatge de $P2X_4$ i la seva correlació amb la capacitat motora dels animals. D i I: Seccions representatives de talls de medul·la espinal lumbar de rates P90 (D-F) i P150 (G-I) amb un doble marcatge per NeuN (D,G, verd) i $P2X_4$ (E, H, magenta) i la unió d'ambdues (F, I). El nombre de MN va ser obtingut després de contar de 20 a 72 seccions de dos animals diferents de cada condició. Pels Paw-prints, cada punt representa la mitjana de 4 a 19 animals per cada condició, test Mann-Whitney Mann-Whitney: **, $P < 0.0001$; *, $P < 0.01$ vs wild type en A. Mann-Whitney test: *, $P < 0.0001$ vs wild type en B. ANOVA test: **, $P < 0.0001$; *, $P < 0.05$ vs wild type en C. Barra: 500 μ m.

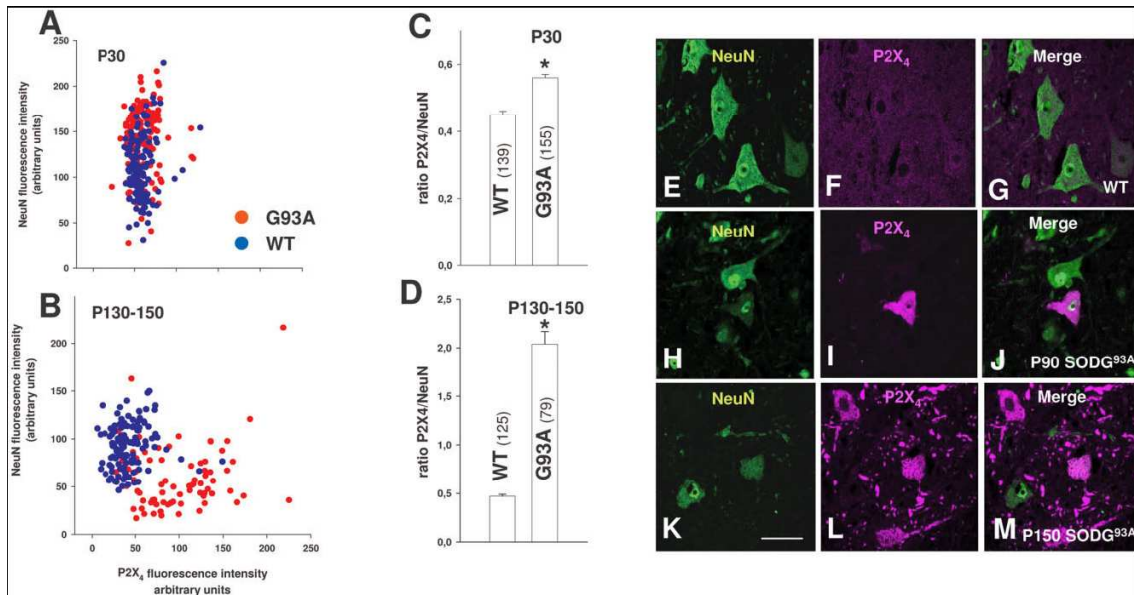


Figura 30: Dissociació del marcatge per immunofluorescència de MN individuals de rates que han desenvolupat la malaltia. A, B: intensitat de fluorescència de NeuN i P2X₄ mesurada i quantificada en MN de la banya ventral de la medul·la espinal de rates control i transgèniques de P30 i P150. C, D: Mitjana de la ratio de fluorescència de P2X₄/NeuN mesurada en els cossos cel·lulars de MN de cada condició, representada en barres verticals. Test Mann-Whitney: *, $P < 0.0001$ vs wild type. E-M: Cossos cel·lulars representatius mesurats. Barra: 50 μ m.

Malgrat algunes fibres P2X₄ positives es van detectar a la medul·la espinal d'animals transgènics P60, la forta immunoreactivitat per P2X₄ en el soma i dendrites de MN s'observava bàsicament a partir de P90. En aquesta edat, el marcatge era homogeni i sovint s'estenia al nucli (Figura 31). El marcatge per DAPI indicava que les MN P2X₄ positives no tenien la cromatina especialment condensada. A P120-150, les MN P2X₄ positives estaven sovint encerclades per nuclis de cèl·lules no neuronals, suggerint que un reclutament microglial apareixia. Les MN P2X₄ positives mostraven també signes de neuronofagia, on grups de cèl·lules microgials semblaven estar completament immerses en el citoplasma neuronal desintegrat.

La destrucció del citoplasma de les MN implicava alhora pèrdua d'immunoreactivitat per P2X₄. La natura microglial del fenomen es confirmava amb un marcatge per OX-42. Semblava que, en estadis inicials de l'adquisició de la forta positivitat per P2X₄ (P90), les MN no mostraven una íntima associació amb cèl·lules microgials. Això indicaria que primer s'adquiria el marcatge per P2X₄ i després es mobilitzaria la micròglia.

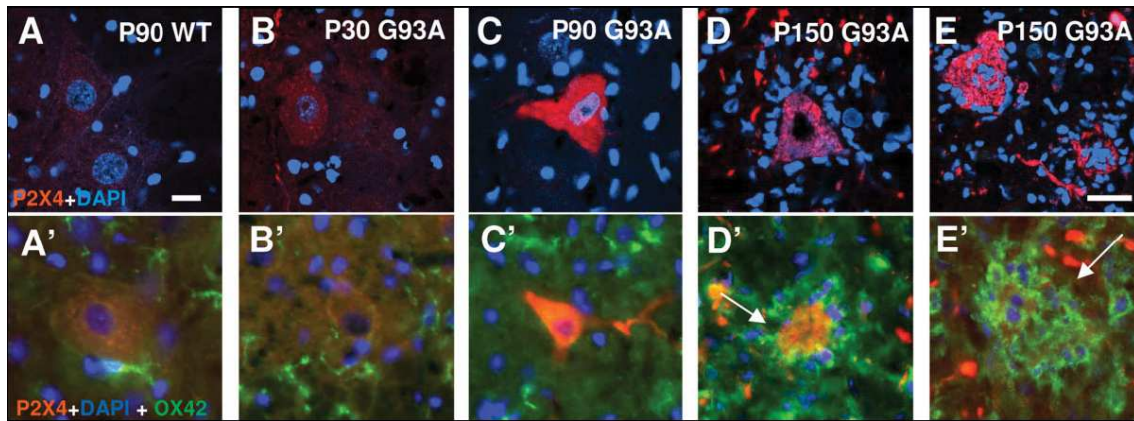


Figura 31: L'adquisició de la immunoreactivitat per P2X₄ continua amb la interacció amb microglia. A, A': en el control, poques cèl·lules microglijals ocasionalment interaccionen amb MN, sense marcatge per P2X₄. B, B': en estadis presimptomàtics (P30) MN d'animals transgènics mostren un dèbil marcatge per P2X₄ i poca presència de cèl·lules microglijals a la banya ventral de la medul·la espinal. C, C': cossos cel·lulars positius a P2X₄ són primer detectats a P90 sense estar en contacte amb microglia. D, D', E, E': a P150, cèl·lules microglijals envolten cèl·lules P2X₄ positives, i algunes pateixen processos de desintegració per neuronofagia (Fletxes). Barra: 20 μm.

D'acord amb l'absència de cromatina condensada, les MN degenerants P2X₄ positives no manifestaven marcatge per TUNEL (Fig. 32A-D). D'altra banda, el baix nombre de cèl·lules TUNEL positives observades en la medul·la espinal d'animals transgènics SOD^{G93A} tenien condensada la cromatina però no mostraven marcatge per P2X₄ (Fig. 32E-H).

Malgrat el doble marcatge de P2X₄ amb Caspasa-3 no era factible perquè els dos anticossos són fets en conill, quan ambdues immunoreactivitats eren estudiades en talls consecutius, es podia observar que les MN amb un fort marcatge per P2X₄ no eren marcatges amb Caspasa-3 (Fig. 32 I-J). Aquests resultats indicaven que la forta immunoreactivitat per P2X₄ no s'associava a la típica apoptosi. Per corroborar la dissociació entre la mort apoptòtica i el marcatge amb P2X₄ es van realitzar experiments d'axotomia del nervi ciàtic. Es va poder confirmar que la mort apoptòtica de MN després de 3 dies d'axotomia no produïa marcatge per P2X₄ (Fig. 32K, L)

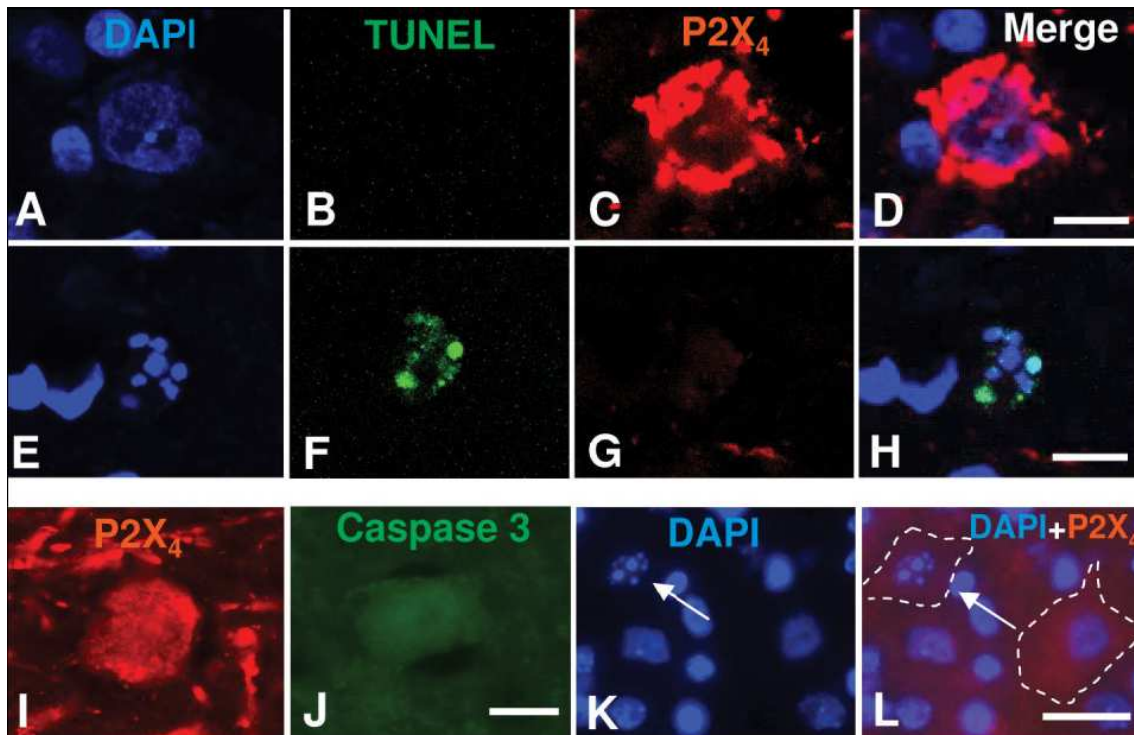


Figura 32: Absència d'associació entre marcatge per P2X₄ i marcadors de mort cel·lular per apoptosi. A-D: un exemple de cèl·lules degenerants presents a medul·la espinal d'animals transgènics mostrant que la immunoreactivitat per P2X₄ (C,I) no està lligada a morfologia apoptòtica (A), positivitat per TUNEL (B) o positivitat per caspasa-3 (J). E-H: cèl·lula amb nucli apoptòtic (E) mostrant positivitat per TUNEL (F), que no queda marcada amb P2X₄ (G). K, L: apoptosi MNs (fletxes) van ser induïdes en la medul·la espinal d'una rata de 3 dies postnatal (P3) per axotomia del nervi ciàtic. Les MN amb morfologia apoptòtica no presenten positivitat per P2X₄ (L, en vermell). Els somes de les MN han estat delimitats per una línia discontinua. Barra: 10 µm en A-H, 25 µm en I-L.

Els axons ventrals de rates transgèniques, però no els dorsals, van ser marcats positivament amb anticossos P2X₄ en etapes inicials del desenvolupament de la malaltia. En individus WT el marcatge era absent tant en arrels dorsals com ventrals (Figura 33 A, D). En animals transgènics a P30, quan els axons de la banya ventral no mostraven encara canvis degeneratius apreciables, com alteracions a la mielina, i quan la positivitat a P2X₄ en la medul·la no s'havia desenvolupat encara, les arrels ventrals i els axons motors de la substància blanca mostraven un intens marcatge per P2X₄ (Fig. 33 B, E). En etapes finals, P150, quasi tots els axons de les arrels ventrals eren englobats per cèl·lules de Schwann fagocítiques, mostrant-se com a residus axonals fortament marcats per P2X₄ (Fig. 33 C, F). Tots aquests aspectes estan clarament reflectits en la Figura 33 H, on la intensitat del marcatge

de P2X₄ en arrels ventrals vs. arrels dorsals és unes 7 vegades major en animals transgènics que en controls.

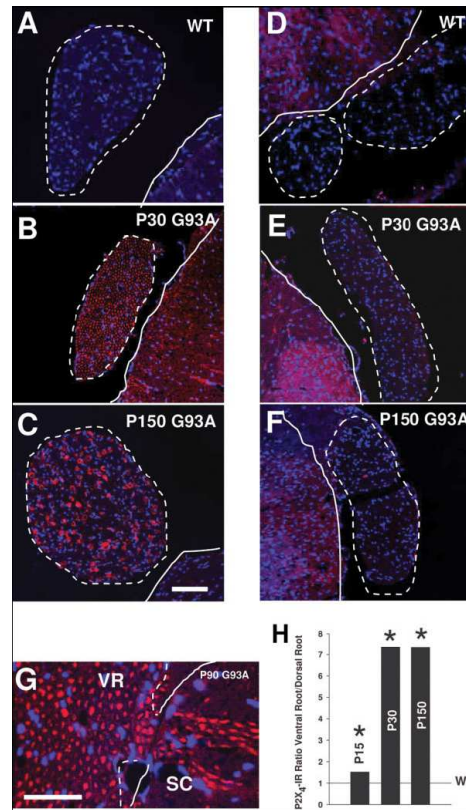


Figura 33: Marcatge per P2X₄ en medul·la espinal i arrels dorsals d'animals controls i transgènics. A-G: en animals controls, el marcatge per P2X₄ és pràcticament absent en arrels dorsals i ventrals (A, D). El marcatge és adquirit en arrels ventrals (A-C, G) però no en dorsals (D-F) en rates transgèniques malaltes. La positivitat per P2X₄ en axons ventrals de rates transgèniques comença a P30, quan encara els canvis morfològics degeneratius no s'han desenvolupat (B). A P150 la majoria dels axons ventrals estan degenerant, i el marcatge per P2X₄ és molt elevat (C). Un detall d'axons positius a P2X₄ emergint de la medul·la espinal (SC) per formar l'arrel ventral (VR) es pot observar a (G), on les arrels estan delimitades per una línia discontinua i el límit de la medul·la espinal està delimitat per una línia contínua. H: la ratio de valors d'intensitat de marcatge per P2X₄ en arrels dorsals comparades amb arrels ventrals va ser mesurada. La línia horitzontal representa el valor de 1 observat en animals controls. Com a mínim 5 arrels van ser mesurades per cada condició. Test de Mann-Whitney, *, P < 0.002 vs wild type. Les barres d'error són massa petites per ser representades. Barra: 100µm.

3.3.3 Localització ultraestructural del marcatge de P2X₄

El marcatge ultraestructural de P2X₄ de medul·la espinal d'animals mSOD^{G93A} a P150 mostrava que, a part dels axons, dendrites i cossos degenerants, el marcatge s'associava amb estructures citoplasmàtiques de MN de la banya ventral que, d'altra banda, no mostraven canvis ultraestructurals indicatius de neurodegeneració (Figura 34). Per exemple, no hi havia signes de condensació de cromatina o dany als orgànuls. Semblaria que els dipòsits immunoreactius es localitzarien entre la superfície de petites vesícules membranoses, amb mitocòndries i citoesquelet desprovistos de marcatge. En dendrites i axons, el marcatge seguiria una distribució similar: els terminals presinàptics en la sinapsi axodendrítica no estaven marcats.

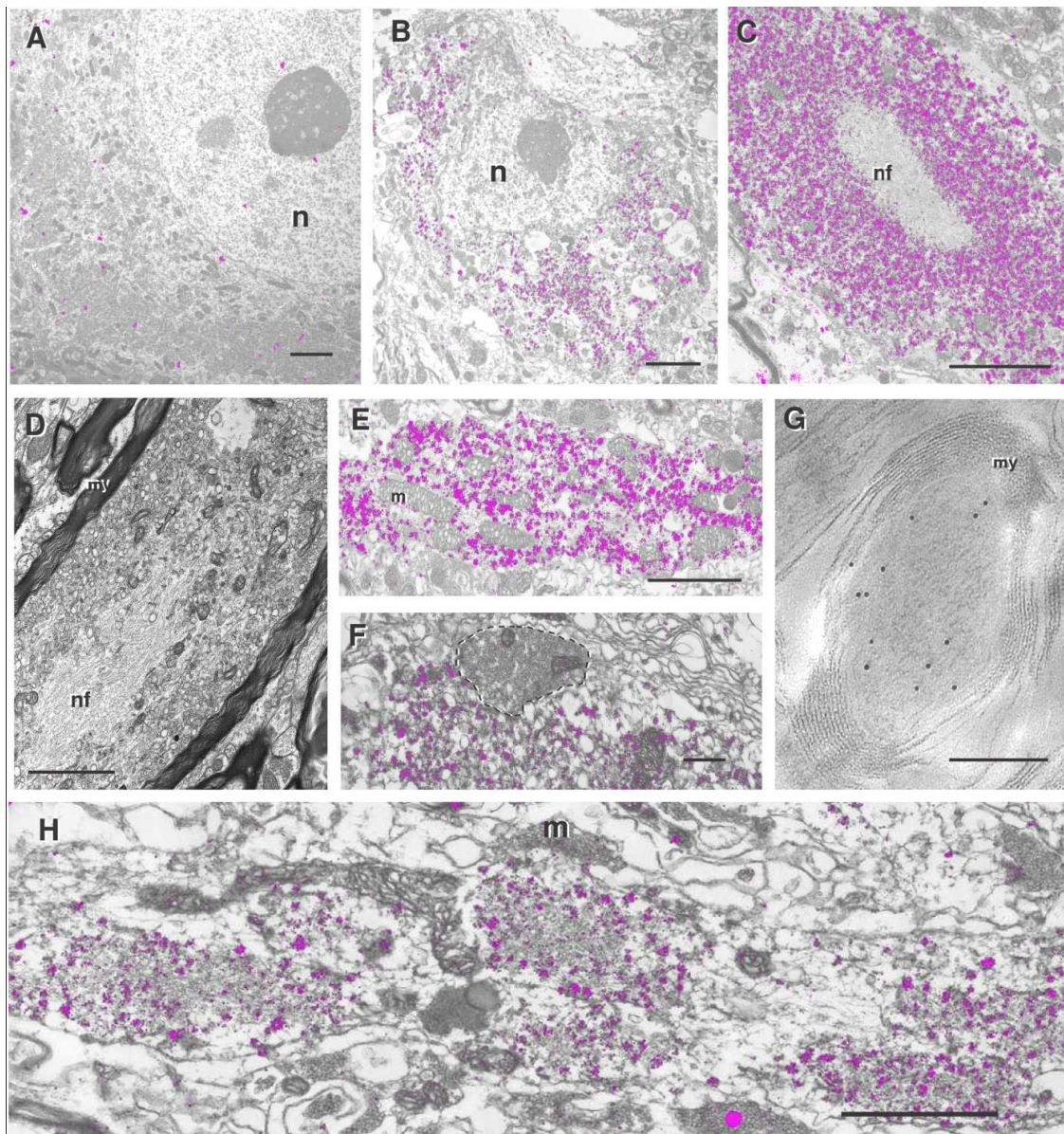


Figura 34: Localització ultraestructural de la immunoreactivitat de P2X₄ en la banya ventral lumbar d'animals control i transgènics en etapes finals de la malaltia. Es mostren els resultats de pre-embedding (A-F, H) i de post-embedding (G). Per facilitar la identificació dels dipòsits de plata del pre-embedding s'ha sobreposat una capa magenta. A: cos de MN control amb escàs marcatge per P2X₄. N: nucli. B: exemple de cos de MN on el marcatge per P2X₄ és principalment localitzat en el citoplasma. El nucli (n) no mostra condensació de la cromatina, i no s'observen canvis degeneratius en aquesta MN. El marcatge adquireix una distribució equivalent a la distribució granular observada a microscòpia òptica. C: Fort marcatge per P2X₄ en un axó d'una MN degenerant mostra que els feixos de neurofilament (nf) estan desproveïts d'immunoreactivitat. D: Imatge ultrestructural presa d'una mostra processada per microscòpia electrònica convencional que mostra l'aspecte d'un axó degenerant equivalent a C però sense visualitzar el marcatge. E: Magnificació del marcatge per P2X₄ en una dendrita on s'observa l'absència de marcatge en mitocòndries (m). F: Dipòsits de P2X₄ distribuïts entre orgànuls membranosos dendrítics. A destacar l'absència de marcatge en el terminal presinàptic en aquesta sinapsi axodendrítica (encerclada). G: exemple de marcatge amb or de P2X₄ en un axó mielinitzat obtingut per procés de freeze-substitution post-embedding. My: beina de mielina. Les partícules d'or es concentren en l'axó. H: detall de marcatge per P2X₄ mostrant la distribució ultraestructural equivalent a l'aparença granular observada a microscòpia òptica. Barra: A-E, H: 2µm, F: 0.5µm, G: 0.2 µm.

3.3.4 Localització del marcatge de P2X₄ en la unió neuromuscular.

Es va observar el marcatge per P2X₄ en unions neuromusculars de rates transgèniques SOD^{G93A}. En la majoria de casos els músculs van ser estudiats utilitzant simultàniament quatre fluorocroms: DAPI, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 i Cy5, per revelar, respectivament, localització de DNA, Receptor Nicotínic d'Acetilcolina (AChRs), marcatge per P2X₄ i axons intramusculars (Figura 35).

En animals controls no es van observar sinapsis neuromusculars marcades amb P2X₄ (Fig. 35A-C). A P17 moltes de les plaques estaven invades però sense marcatge per P2X₄. A P30 les unions neuromusculars detectades en el múscul gastrocnemicus (bessons) estaven ocasionalment marcades, però no mostraven immunopositivitat els axons intramusculars. A P60 i P90 moltes de les plaques observades en el extensor digitorum longus (EDL), soleus, tibial i gastrocnemicus mostraven positivitat per P2X₄ associada a terminals pre-sinàptics, cosa que s'evidenciava després del marcatge per AChRs i β-tubulina en microscòpia confocal (Fig. 35 D-M). A P150 no es van observar estructures pre-sinàptiques; la majoria

de les plaques estaven denervades o presentaven canvis que alteraven la morfologia post-sinàptica, com fibres re-inervades per múltiples terminals. Això suggeria que hi havia fenòmens de sinapsis re-inervades (Fig. 35 O-S). Aquests nous terminals nerviosos no mostraven positivitat per P2X₄. En alguns casos, s'observaven dipòsits de materials positius, possiblement degut a reminiscències de la sinapsi original (Fig. 35 N-U).

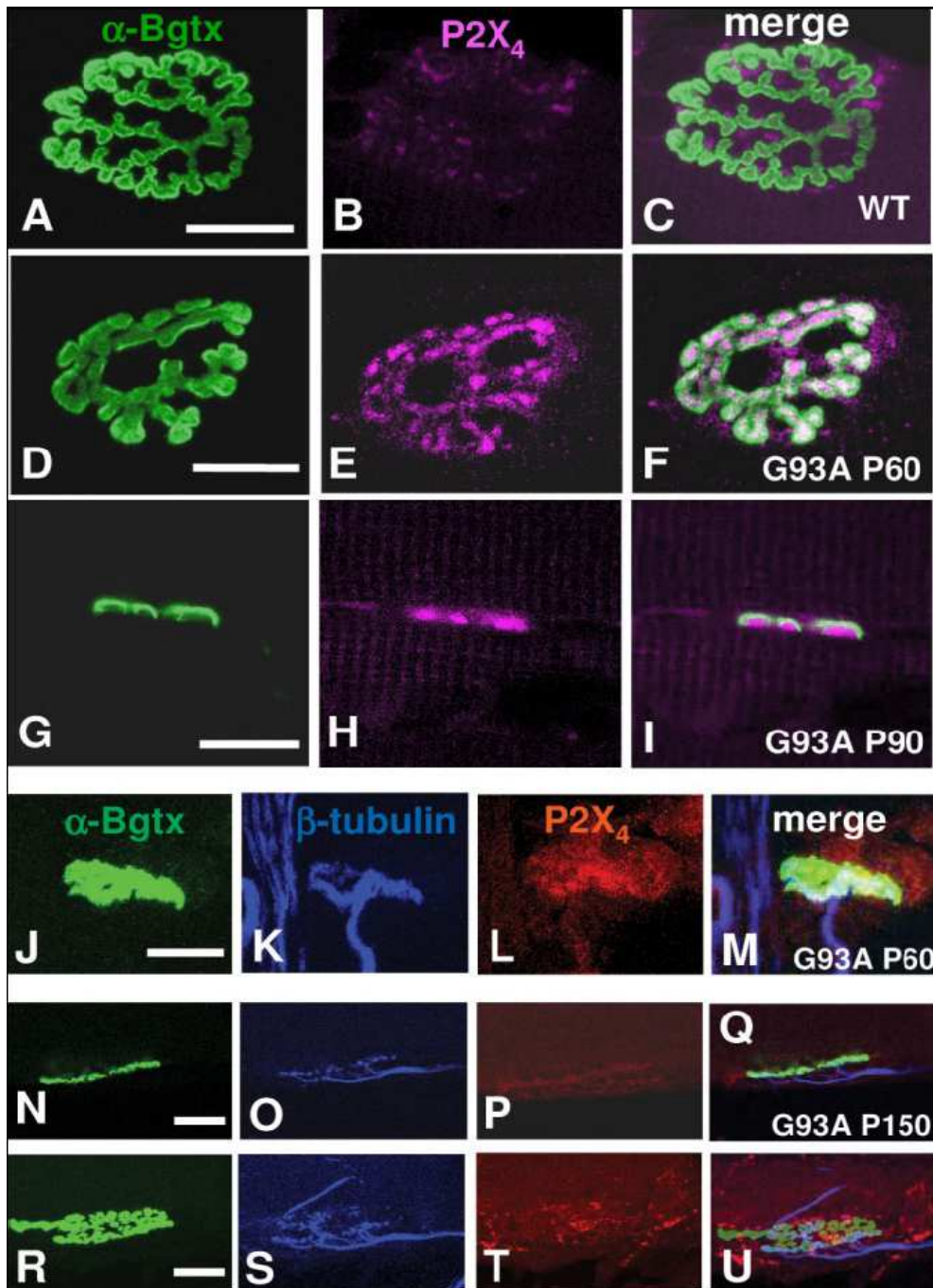


Figura 35: Positivitat per P2X₄ en la unió neuromuscular d'animal control (A-C) i transgènic (D-U). Les unions neuromusculars van ser estudiades per marcatge

múltiple: α -bungarotoxina (verd) per AChRs, (magenta en B, E, H, vermell en L, P, T) i β -tubulina (blau). El marcatge per P2X₄ és absent en animals control i transitòriament present en animals transgènics (D-U). El múscul soleus, a P60 (D-F) o el EDL a P90 (G-I) van ser observats a microscòpia confocal. Un senyal positiu per P2X₄ amb una distribució complementària a AChRs es pot observar, suggerint la localització pre-sinàptica. J-M: La localització pre-sinàptica del marcatge amb P2X₄ va ser confirmada utilitzant un marcador d'axons en un múscul soleus de P60. N-U: en estadis avançats de la malaltia, les presumptes re-innervacions estan desproveïdes de marcatge per P2X₄, com es pot veure en les seccions de EDL d'una rata transgènica. Residus de marcatge es van detectar en R-U, i podrien ser restes del terminal pre-sinàptic degenerat. Barra: 20 μ m.

3.3.5 Immunoreactivitat de l'anticòs anti-P2X₄ associada a MNs degenerades a còrtex cerebral i tronc de l'encèfal en el model de rata transgènica SOD1^{G93A}

Està plenament acceptat que el procés degeneratiu de la ELA afecta tant les upper-MN, neurones situades en àrees motores del cervell i tronc de l'encèfal com les lower-MN, MNs situades a la medul·la espinal. Per aquesta raó es va intentar explorar la positivitats per P2X₄ en cervells d'animals en estadis finals de la malaltia. En animals control, el marcatge per P2X₄ es va observar en cossos cel·lulars del nucli vestibular (nucli de Deiter o nucleus magnocellularis, Figura 36 C, D), així com també en petites cèl·lules mononuclears que envoltaven capil·lars sanguinis intracerebrals i que residien en el teixit connectiu. Cap de les fibres nervioses ni cossos cel·lulars van mostrar un especial marcatge per P2X₄ en cap altra regió del sistema nerviós central. Com s'esperava, MN degenerants i fibres nervioses de rates transgèniques SOD1^{G93A} van resultar altament immunopositives a P2X₄ en nuclis motors cerebrals excepte en l'oculomotor (III), troclear (IV) i nucli abducens (VI). Cal tenir en compte que el nucli oculomotor té una lenta afectació en malalts d'ELA (Martin i Swash, 1995). Per contra, MN degenerants P2X₄ positives i fibres s'identificaven clarament en el nucli trigèmin (V), facial (VII), ambigu (IX, X i XI) i hipoglós (XII, Figura 30 I, J). Les MN P2X₄ positives en nuclis motors superiors s'associaven comunament a micròglia activada (OX-42 positivitats), que solia envoltar els cossos cel·lulars i neurites d'acord amb el patró observat en MN de la banya ventral de la medul·la espinal. En el còrtex cerebral, es van identificar neurones piramidals en la cinquena capa P2X₄ positives (Figura 36 A, B). Aquests resultats concorden amb la distribució esperada de MN no degenerants en rosegadors models d'ELA.

No obstant, a més d'aquestes estructures, altres grups neuronals es van trobar marcats en animals transgènics però no en control. Són cossos cel·lulars i fibres del

nucli vestibular superior, neurones cerebel·lars i la formació reticular. El marcatge per P2X₄ es va detectar en neurones serotoninèrgiques (Figura 36K). Tot i això, la majoria de les fibres serotoninèrgiques del tronc de l'encèfal no colocalitzaven amb P2X₄.

El sistema noradrenèrgic també es troba afectat en estadis finals de la malaltia, és per això que també es veuen marcades per neurones i fibres del locus coeruleus, delimitat per marcatge amb Tirosina-hidroxilasa, TH (Figura 36 E, H). Algunes cèl·lules de Purkinje en el còrtex cerebel·lar es van veure afectades també. Aquestes dades es poden resumir en la Taula 1.

Patològicament, el marcatge per P2X₄ es pot distingir fàcilment de neurones que expressen P2X₄ naturalment. En rates control, les grans neurones del nucli vestibular, que són normalment P2X₄ immunoreactives, el marcatge es reservava únicament al soma cel·lular i seguia una distribució homogènia (Figura 36 D). El mateix patró se seguia en rates transgèniques, cosa que suggeria que aquest nucli en particular no era afectat per la malaltia (Figura 36 F).

D'altra banda, els cossos cel·lulars que mostraven una elevada immunoreactivitat, també presentaven les dendrites marcades seguint un patró fragmentat o granular, potser indicatiu de degeneració (Figura 36G). Queda bastant clar que la forta positivitat per P2X₄ està lligada a degeneració cel·lular, ja que en tots els casos examinats aquestes cèl·lules marcades estan associades a micròglia neuronofàgica.

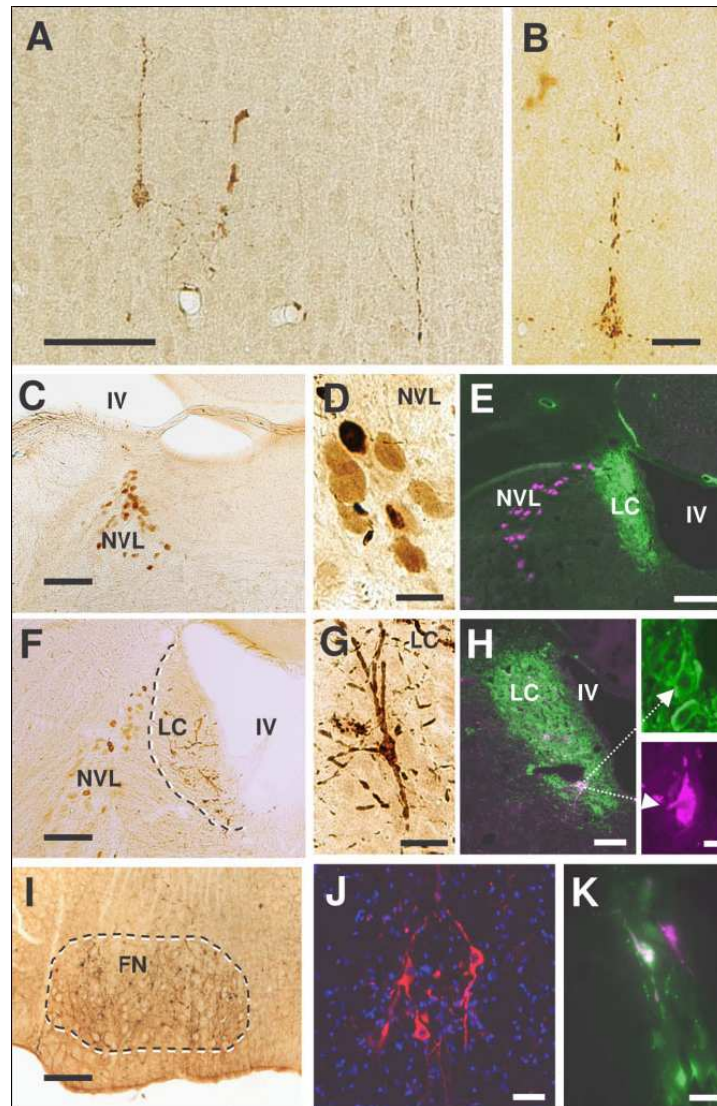


Figura 36: A, B: Immunopositivitat per P2X₄ en neurones piramidals de la cinquena capa del còrtex motor de rata transgènica de P150. C, D: Neurones P2X₄ positives normalment presents en el nucli vestibular lateral (NVL) de rates control mostren la distribució homogènia de la positivitat per P2X₄ en cossos cel·lulars (IV: cinquè ventricle). E: Doble marcatge fluorescent en cervell de rata P90 mostrant la distribució del marcatge per P2X₄ (magenta) i tirosina-hidroxilasa (verd) en un pla que conté el NVL i el locus coeruleus (LC). A aquesta edat la positivitat encara no s'ha desenvolupat. F-H: Secció equivalent de rata transgènica de P120-150, que demostra la presència de neurones P2X₄ positives en el LC. G: Ampliació d'una neurona degenerant de LC. La natura noradrenèrgica de les neurones degenerants de LC es demostra després del doble marcatge amb P2X₄ (magenta) i TH s'observa en H. I: Secció transversal de tronc de l'encèfal de rata transgènica a P150 mostrant el nucli facial (FN, encerclat) marcant MN degenerants. J: Les MNs degenerants P2X₄ positives (vermell) de rata transgènica P120 es concentren en el

nucli ambigu, marcat amb DAPI (blau). K: Doble marcatge fluorescent de cèl·lules neuronals en el nucli rafe, que demostra que neurones degenerants P2X₄ positives (magenta) colocalitzen (blanc) amb marcatge per serotonina (verd). Barra: 100µm en A, C, F, H, 50 µm en B, D, G, J, 200 µm en E, I, 25µm en K, 20 µm en H.

TABLE 1. Brain and Brainstem Distribution of P2X₄ in mSOD^{G93A} Rat as Revealed by Immunohistochemistry¹

Distribution of P2X ₄ -LIR	mSOD1 ^{G93A}	WT
Oculomotor nucleus	-	-
Trochlearis nucleus	-	-
Abducens nucleus	-	-
Motor trigeminal nucleus	+++	-
Facial nucleus	+++	-
Ambiguus nucleus	+++	-
Hypoglossal nucleus	+++	-
Motor cortex (pyramidal neurons, layer V)	++	-
Hypocampus	-	-
Cerebellar cortex (Purkinje neurons)	+	-
Cerebellar cortex (granular layer)	-	-
Locus coeruleus	++	-
Superior vestibular nucleus	++	-
Lateral vestibular nucleus	++	++
Reticular formation	+ / ++	-
Raphe nucleus	+ / ++	-
Inferior olivary complex	-	-

The proportion of P2X₄ immunopositive neurons at the distinct regions was scored according to: 1–10% (+), 10–50% (++), >50% (+++), absence of immunostaining (-). mSOD1^{G93A}, subtype G93A of mutated superoxide dismutase; P2X₄-LIR, P2X₄-like immunoreactivity; WT, wild type.

Taula 1: Distribució del marcatge per P2X₄ en cervell i tronc de l'encèfal en rates SOD1^{G93A} revelada per immunohistoquímica.

3.3.6 Immunoreactivitat de l'anticòs anti-P2X₄ associada a una afectació de les cèl·lules cerebelars de Purkinje.

L'ús de l'anticòs anti P2X₄ com a marcador de neurodegeneració en rates transgèniques SOD1^{G93A} demostrava que, a més de cèl·lules no-MNIs descrites prèviament, les cèl·lules de Purkinje cerebel·lars (PCs) també porten canvis degeneratius evidents. A P90, algunes PCs ja van ser detectades amb el marcatge. A P150 el nombre d'aquestes cèl·lules marcades va augmentar considerablement, intercalades amb neurones aparentment normals (Figura 37A, B).

Els contactes realitzats en tres animals terminals indicaven que 2.04 ± 0.34% de les PCs mostraven aquest canvi. El patró de marcatge de les PCs mostrava una certa variabilitat: en alguns casos el marcatge comprenia tota la PC (cos cel·lular i

dendrites) però no l'axó i en altres casos únicament l'arbre dendrític era fortament marcat (Figura 37C-E).

Després de combinar marcatge amb P2X₄ i amb OX-42 per marcar la microglia era evident que, en quasi tots els casos, les cèl·lules P2X₄ positives estaven associades a cèl·lules microglijals. L'observació en detall amb microscòpia confocal portava a la idea que era el P2X₄ qui atreïa la microglia, que migrava a través de fibres paral·leles per arribar a la PC. La microglia llavors provocaria l'activitat fagocítica i segments de PCs (per exemple, l'arbre dendrític) seria destruït, resultant una pèrdua de marcatge per P2X₄. Fragments de material P2X₄ positiu s'observaven sovint dins del citoplasma de cèl·lules microglijals, prop d'àrees amb destrucció de PCs (Figura 37G-I).

És interessant veure que el nucli de cèl·lules de Purkinje P2X₄ positives no mostraven cap alteració apreciable (per exemple, condensació de la cromatina) comparada amb PC normals després del marcatge del DNA amb DAPI (Figura 37J-M). Les PCs de rata P2X₄ immunopositives mostraven característiques comparables a les descrites en cerebel de ratolí transgènic SOD1^{G93A} en etapes finals de la malaltia (Figura 37F).

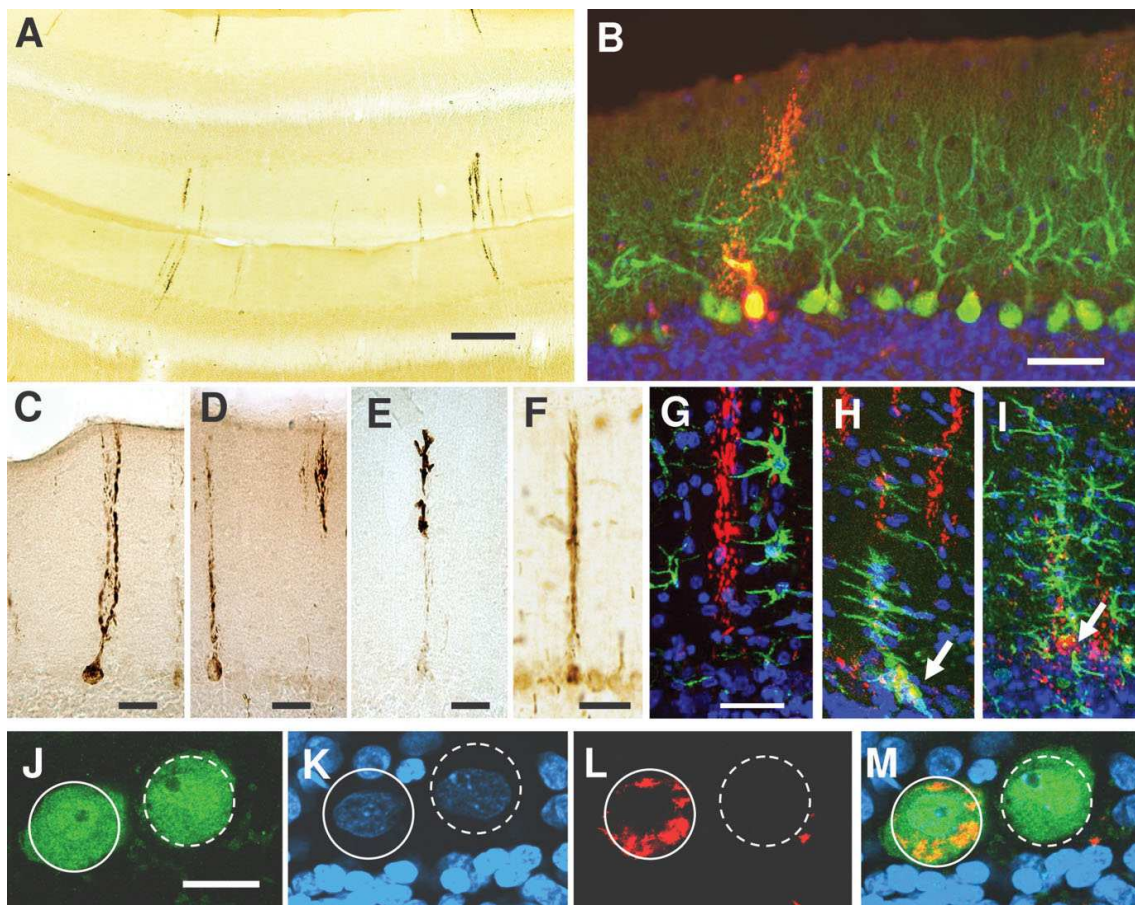


Figura 37: Immunoreactivitat per P2X₄ en cèl·lules de Purkinje en cerebel de rata transgènica SOD1^{G93A}. A: ampliació d'una secció transversal de cerebel processat per marcatge amb P2X₄- immunoperoxidasa on s'observen PCs positives. B: PCs P2X₄-positives (vermell) estan intercalades aparentment amb cèl·lules normals marcades amb calbindina (verd). La mostra també ha estat marcada amb DAPI, que permet veure la capa de cèl·lules granulars. C-E: detall de marcatge amb P2X₄- immunoperoxidasa de PCs en ratolí transgènic de P120. G-I: Triple marcatge fluorescent que mostra immunoreactivitat per P2X₄ en PC (vermell) en combinació amb el marcador microglial OX-42 i marcatge de nuclis amb DAPI (blau), per demostrar que les cèl·lules microgials activades migren cap a PCs positives per continuar el procés de destrucció cel·lular que segueix els següents passos: G: nombroses cèl·lules microgials entren en contacte amb dendrites de cèl·lules de Purkinje positives. H: la microglia arriba i cobreix la PC continuant el procés neuronofàgic i pèrdua de positivitat de P2X₄. I: Cèl·lula de Purkinje P2X₄ positiva amb acumulació de microglia. J-M: PC degenerants no postren canvis en l'organització de la cromatina, com es mostra en aquesta imatge amb triple marcatge fluorescent de PCs nucli aparentment normal, P2X₄-negativa, i la cèl·lula del costat, degenerant, P2X₄ positiva. Triple marcatge: J: calbindina en verd, K: DAPI en blau, L: en P2X₄ vermell, M: unió dels tres. Barra : 250 µm en A, 40 µm en B-I, 20 µm en J-M.

3.3.7 Especificitat de l'anticòs anti P2X₄ en el reconeixement de la proteïna P2X₄ en el model de rata transgènica SOD1^{G93A}

Una qüestió important en aquests resultats era si una sobre-regulació del receptor d'ATP era la que portava a observar aquests canvis en la immunohistoquímica. Després d'utilitzar l'anticòs anti-P2X₄ en Western Blot (WB) amb extractes de medul·les espinals, es van observar dues bandes principals tant en animals control (wild type, WT) com en animals transgènics (G93A), amb pes molecular (Mw) de 58 i 42 KDa. Una banda d'uns 25 KDa va ser observada només en extractes d'animals transgènics. L'estudi de les bandes es va portar a terme seguint un curs temporal de la malaltia després del fraccionament cel·lular dels extractes. Les bandes de 58 i 42 KDa es van concentrar en la fracció membranosa (membrane), i grans canvis no van ser detectats a P30-P90, comparant-se amb els controls. No obstant, en animals de P120-150, una forta up-regulació de la banda de 58 KDa va ser observada (Figura 38A). En la fracció soluble, la banda de 42 KDa no mostrava canvis entre animals control i transgènics. La banda de 25 KDa es va detectar clarament en aquesta fracció soluble només en les condicions d'animals

transgènics, observant-se un increment d'intensitat de P30 a estadis terminals de la malaltia (Figura 38B). El reconeixement de l'anticòs s'eliminava si l'anticòs era pre-incubat amb el seu pèptid d'inhibició.

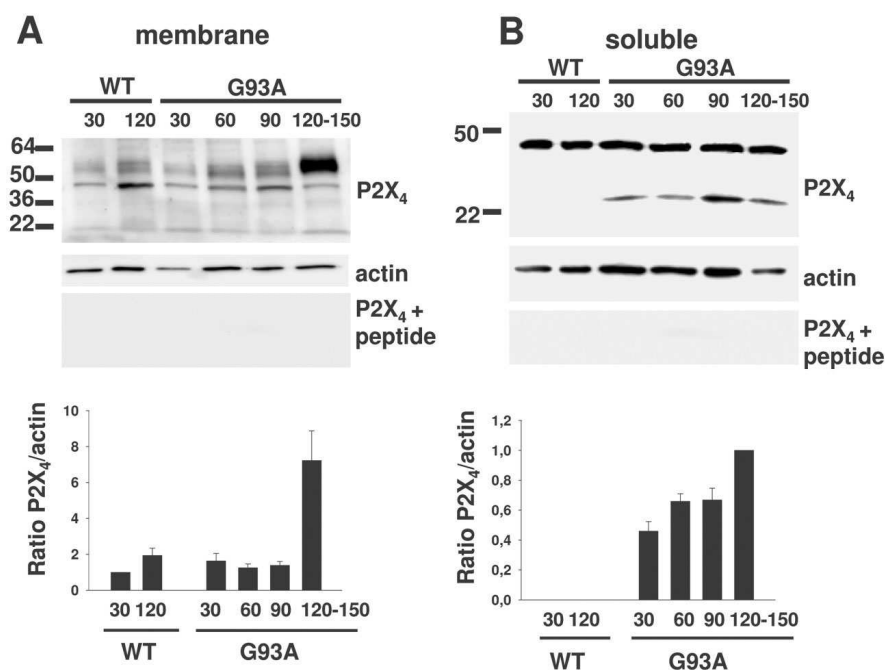


Figura 38: Identificació per WB de proteïnes reconegudes per l'anticòs anti-P2X₄ en medul·la espinal de rata fraccionada. A: fracció membranosa. B: fracció soluble. Les quantitats relatives de proteïna són representades per barres verticals. Les dades van ser obtingudes de 7 separacions per SDS-PAGE de 3 teixits i extraccions independents.

3.3.8 Identificació de les proteïnes reconegudes per l'anticòs anti P2X₄

Donat que la proteïna P2X₄ té un pes molecular (Mw) d'uns 43KDa i que s'havien trobat altres bandes que no es corresponien amb aquest pes, es va decidir utilitzar tècniques proteòmiques per tal d'identificar aquestes bandes. Es van realitzar tècniques d'Isoelectroenfoc, d'Electroforesis Bidimensional i MALDI-TOF per identificar la banda de baix pes molecular apareguda i sobre-expressada en la fracció soluble de medul·la lumbar d'animal transgènic terminal (Figura 39). Es va poder demostrar que la banda de baix pes molecular apareguda i sobre-expressada en la fracció soluble de medul·la d'animal transgènic SOD^{G93A} de P150 no era P2X₄, sinó que es tractava de la proteïna Cu-Zn Super Òxid Dismutasa (SOD1), corresponent al gen que s'havia insertat en el genoma de la rata com a model d'ELA utilitzat.

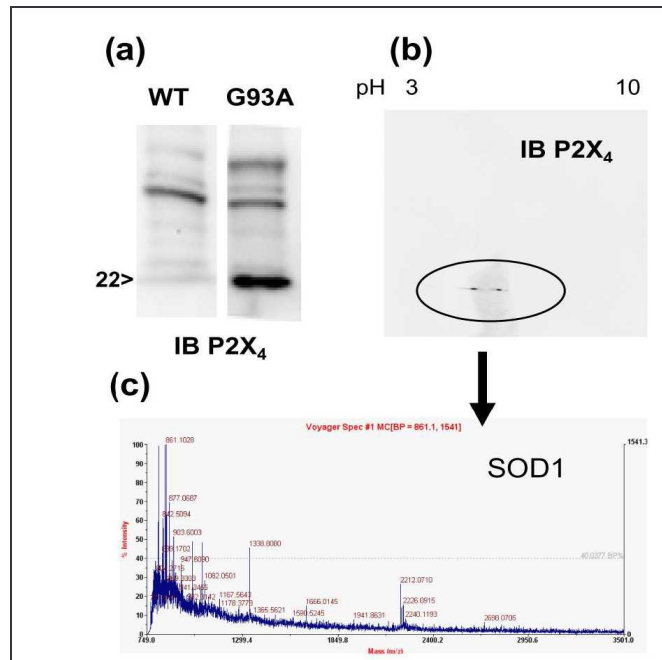


Figura 39: a. Western blot de medul·la lumbar d'animal WT i transgènic (G93A) de P150 on es veu la banda baixa de 22kDa diferencial b. WB provinent d'electroforesi 2D de medul·la espinal de rata transgènica SOD^{G93A} de P150 utilitzant per la immunodetecció l'anticòs anti P2X₄. Espectre peptídic resultant de la digestió de la proteïna reconeguda per P2X₄, identificada com a SOD1.

Per tal d'esbrinar el mecanisme responsable del reconeixement de SOD1 per part de P2X₄ es van comparar les seves seqüències i es va poder veure que els aminoàcids de l'epítoc responsable del reconeixement de P2X₄ eren de natura molt similar a una regió hidrofòbica que, en la SOD1 en condicions fisiològiques òptimes, es troba amagada (Figura 40). El fet que els nostres animals transgènics sobreexpressin aquesta proteïna i que s'acumuli, presumptament, mal plegada, seria una explicació per aquest reconeixement.

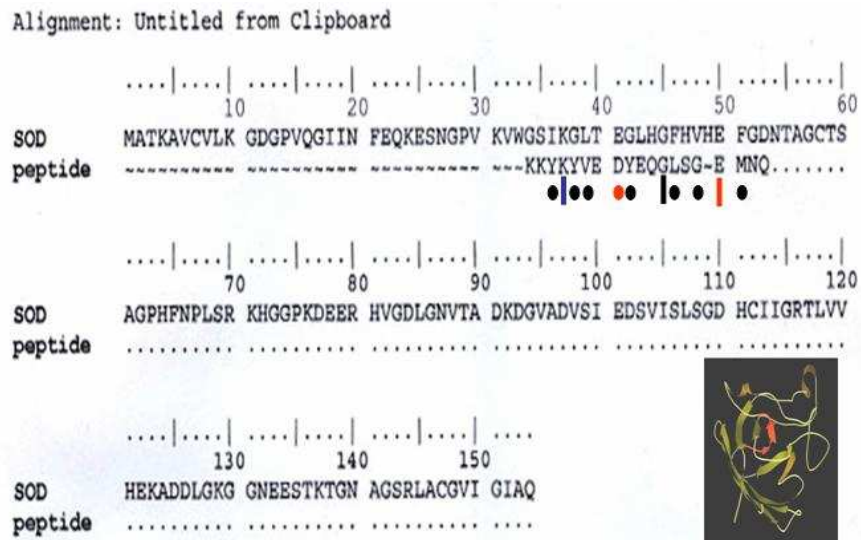


Figura 40: Comparació de les seqüències de l'epítot de P2X₄ amb la seqüència completa de SOD1, on s'observa la coincidència de la natura dels aminoàcids d'ambdós. Estructura quaternària de SOD1 i detall de la zona reconeguda per P2X₄, que es troba a la part interna de la proteïna.

Per tal de comprovar que realment la proteïna reconeguda per P2X₄ era SOD1 es van realitzar diferents experiments. Es va procedir a fer Electroforesi Bidimensional i Western blot utilitzant els anticossos anti-P2X₄ i anti-SOD1 amb el mateix tipus de mostres de medul·la lumbar de rata transgènica de P150. Com es pot veure en la Figura 41, els dos anticossos eren capaços de reconèixer el mateix patró de proteïnes després d'un isoelectroenfoc i posterior electroforesi bidimensional. Això afirmaria la hipòtesis que l'anticòs anti P2X₄ seria capaç de reconèixer formes específiques malplegades de la proteïna SOD1.

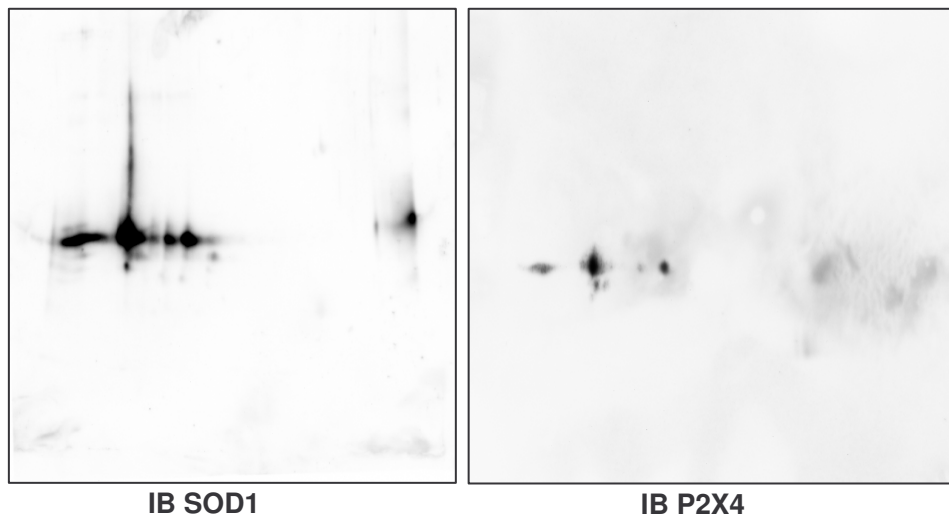


Figura 41: Electroforesis Bidimensionals de medul·la espinal lumbar de rata SOD^{G93A} de 150 dies i posterior Western Blot amb anti-SOD1 i anti-P2X₄ on es pot arribar la similitud del reconeixement del dos anticossos.

Posteriorment es van realitzar tècniques d'Immunoprecipitació (IP) mitjançant boles de Sefarosa unida a proteïna A de la fracció soluble (S2) i tècniques d'immunoaïllament de la fracció membranosa (P2') mitjançant l'ús de boles magnètiques Dynabeads[®] M-500 Subcellular (Dyna, ref 150.01) de medul·les espinals lumbars. Com es pot observar en la Figura 42, el resultat que es va obtenir és que els dos anticossos eren capaços d'immunoprecipitar proteïnes del mateix Mw, que es correspon al Mw de la SOD1, que compartien el mateix patró, i que alhora estaven molt més expressades en condicions d'estadi avançat de la malaltia en animals transgènics que no pas en estadis avançats o en animals control. Com s'observa en la Figura 42 a la sèrie superior, l'anticòs anti-P2X₄ és capaç de retenir una proteïna que després és reconeguda per l'anticòs anti-SOD1, i la banda de la qual es troba en el pes esperat per SOD1. Així mateix, l'anticòs anti-SOD1 (Figura 42, sèrie inferior) és capaç de retenir una proteïna que després és reconeguda per l'anticòs anti-P2X₄, i la banda de la qual es troba en el pes esperat per SOD1, fet que demostra que l'anticòs anti-P2X₄ reconeix específicament formes mal plegades de la SOD1.

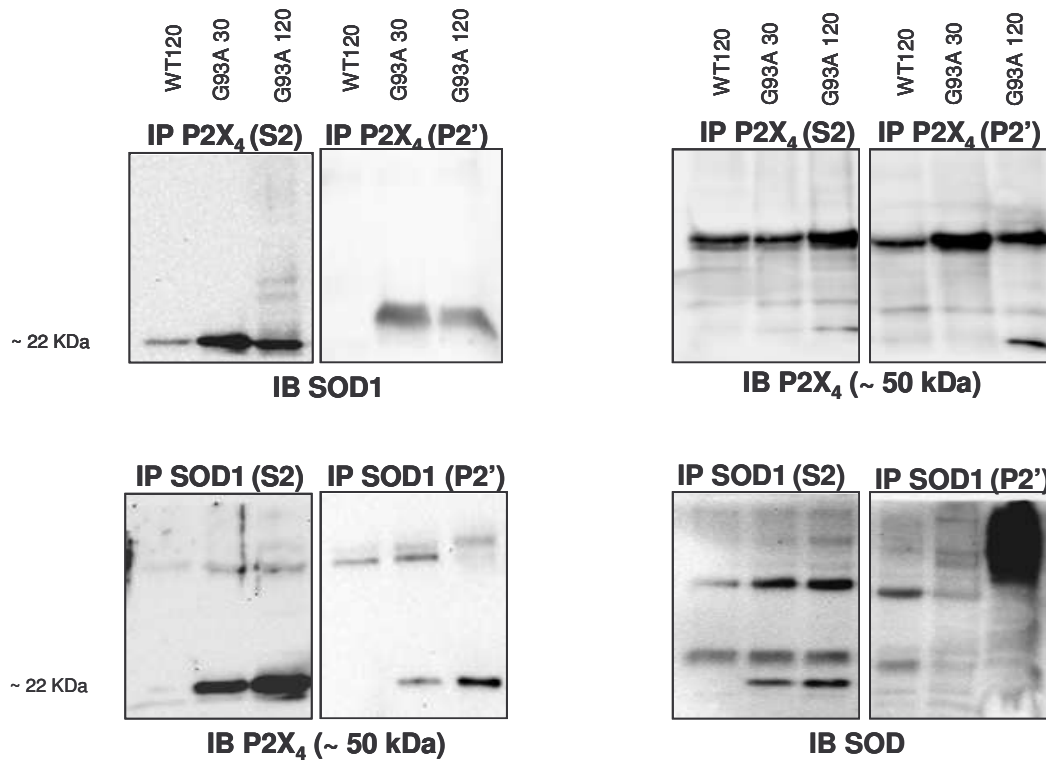


Figura 42: Els anticossos anti-P2X₄ i anti-SOD1 immunoprecipiten SOD1 d'extractes de medul·la de rata transgènica SOD1^{G93A}. Sèrie superior: Imatges de WB realitzats amb anti-SOD1 de mostres de medul·la espinal lumbar resultants del fraccionament cel·lular en fracció soluble (S2) i fracció membranosa (P2') d'animals controls de 120 (WT 120), d'animals transgènics de 30 dies (G93A 30) i animals transgènics de 120 dies (G93A 120), prèviament immunoprecipitades amb anti-P2X₄. Sèrie inferior: Imatges de WB realitzats amb anti-P2X₄ de mostres de medul·la espinal lumbar resultants del fraccionament cel·lular en fracció soluble (S2) i fracció membranosa (P2') d'animals controls de 120 (WT 120), d'animals transgènics de 30 dies (G93A 30) i animals transgènics de 120 dies (G93A 120), prèviament immunoprecipitades amb anti- SOD1.

A part, es va utilitzar la cromatografia d'afinitat per comprovar la IP (Figura 43). Per fer-ho es va utilitzar el Microlink Protein Coupling kit (Pierce) amb mostres de fracció soluble (S2) d'animals controls de 120 dies (WT 120), d'animals transgènics de 30 dies (G93A 30) i animals transgènics de 120 dies (G93A 120). La cromatografia es va realitzar utilitzant l'anticòs anti-P2X₄ i es va poder tornar a demostrar que la proteïna soluble reconeguda per aquest anticòs era després reconeguda per WB amb l'anticòs anti-SOD1(Unbound: fraccions no lligades a la matriu amb l'anticòs. Eluted: fraccions lligades a la matriu amb P2X₄ i

posteriorment eluïdes). És per això que es va poder acabar de demostrar que l'anticòs anti-P2X₄ era capaç de reconèixer espècies malplegades de SOD1.

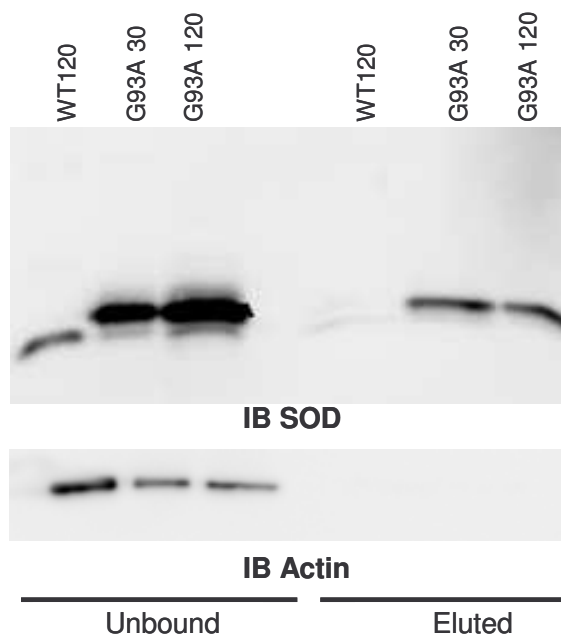


Figura 43: WB d'anti-SOD1 després de la Cromatografia d'Afinitat de P2X₄ de mostres de fracció membranosa de medul·la espinal lumbar d'animals controls de 120 (WT 120), animals transgènics de 30 dies (G93A 30) i animals transgènics de 120 dies (G93A 120). Control d'actina: l'actina només és detectada en les fraccions que no han reconegut P2X₄.

3.3.9 Especificitat del reconeixement de l'anticòs anti P2X₄ de formes malplegades de la proteïna SOD1

Per tal de demostrar que realment l'anticòs anti P2X₄ reconeixia formes malplegades de la proteïna SOD1, presents únicament en animals transgènics en estadis avançats de la malaltia, es van realitzar experiments on es va desnaturalitzar *in vitro* la proteïna SOD1 comercial (Unfolded SOD1), Figura 44. La proteïna es va mantenir també en condicions natives com a control (Folded SOD1). Posteriorment es va immunoprecipitar amb l'anticòs anti P2X₄ i es va realitzar el Western blot amb l'anticòs anti-SOD1. Com es pot observar en la Figura 44, la mostra de SOD1 desnaturalitzada és immunoprecipitada (Bounded) per l'anticòs anti P2X₄. Es pot observar, no obstant, que una petita fracció de SOD1 en estat natural és també immunoprecipitada per l'anticòs anti P2X₄, tot i que la proteïna

SOD1 amb conformació quaternària és principalment eluïda, és a dir, no retinguda per l'anticòs anti P2X₄ (Eluted).

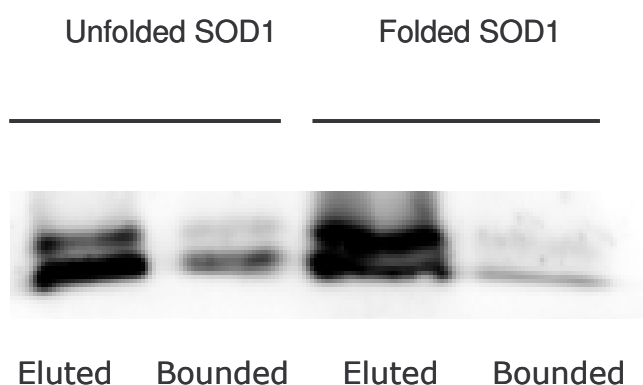


Figura 44: Western blot amb anticòs anti-SOD1 després de la desnaturalització de la proteïna comercial SOD1 i posterior immunoprecipitació amb l'anticòs anti P2X₄.

3.3.10 Associació de les formes malplegades de SOD1 amb xaperones.

Una vegada demostrada l'especificitat de l'anticòs anti-P2X₄ per les formes malplegades de SOD1, presents en estadis avançats de la malaltia en el model de rata transgènica SOD^{G93A}, es va voler estudiar si aquestes formes particulars de la proteïna estaven associades a algun tipus de xaperona. Es van testar, després de la immunoprecipitació amb l'anticòs anti-P2X₄ i amb anti-SOD1 de mostres de medul·la espinal lumbar de rates control i transgèniques terminals, diversos anticossos anti-xaperones, trobant-se un major reconeixement (fracció B, bounded) en mostres transgèniques per els anticossos anti-Hsc70, anti Grp-78 i anti-Grp94, com s'observa en la Figura 45.

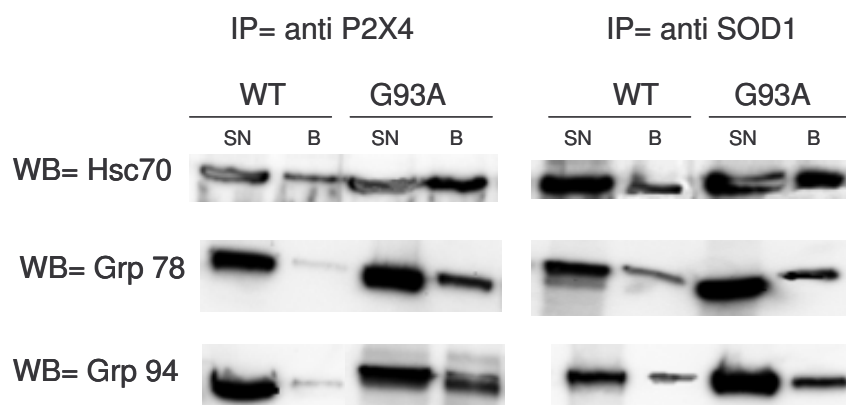


Figura 45: Reconeixement de formes específiques malplegades de la SOD1 per part de les xaperones Hcs70, Grp78 i Grp94, prèviament immunoprecipitades amb l'anticòs anti-P2X₄ i anti-SOD1 (SN: fraccions no reconegudes, sobrenedant. B fraccions reconegudes, bounded).

3.3.11 Absència de reconeixement de l'anticòs anti-P2X₄ de formes de SOD1 en ratolí transgènic per la SOD1^{WT}.

La relació entre el marcatge de SOD1 i P2X₄ va ser també examinada en seccions de medul·la espinal de ratolí transgènic sobreexpressor de la SOD1 humana wild type per tal d'avaluar si el marcatge per P2X₄ era propi només d'animals transgènics per la SOD1 mutada. Els resultats es mostren en la Figura 46. Com era d'esperar, el marcatge per SOD1 era evident en animals transgènics per la SOD1^{G93A}, i present en cèl·lules neuronals i glials. El fort marcatge per P2X₄ es presentava en MN amb colocalització amb SOD1. No obstant, un intens marcatge per SOD1 es detectava en cèl·lules i àrees sense marcatge per P2X₄ (Figura 46 a-c). En ratolins transgènics per la hSOD1^{WT}, el marcatge per SOD1 no està associat a P2X₄ (Figura 46, d-f), igual que en el cas de ratolins WT (Figura 46, g-i). Després del doble marcatge amb GFAP en rates transgèniques per la SOD1 mutada, SOD1^{G93A} es veu acumulada en un gran nombre d'astròcits, mentre que el marcatge per P2X₄ mai es troba associat a astròcits (Figura 46 j-l). Amb això es demostraria *in vivo* la capacitat que té l'anticòs anti-P2X₄ per reconèixer formes específiques malplegades de SOD1^{G93A}, no presents aquestes formes en individus WT.

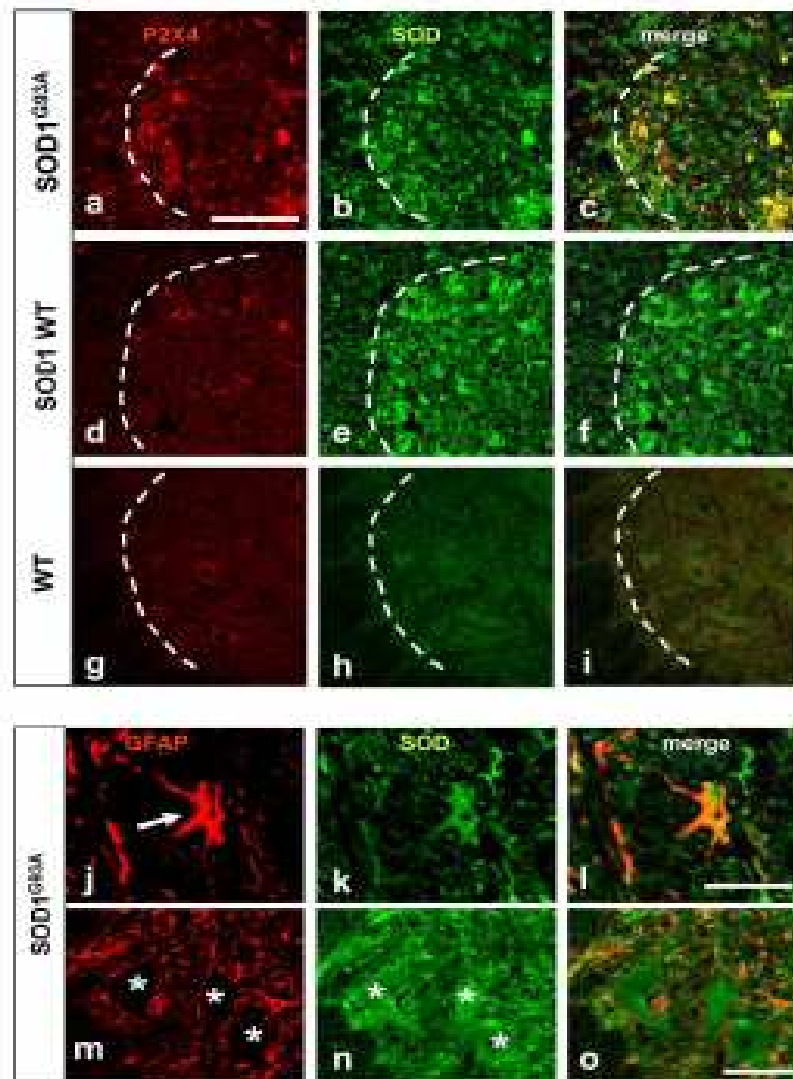


Figura 46: A-i: Localització immunohistoquímica del marcatge per P2X₄ (vermell) i SOD1 (verd) en la banya ventral de ratolins WT de P120-150, de ratolins transgènics sobreexpressors de la SOD1 WT i de ratolins control. El marcatge per P2X₄ en la banya ventral de la medul·la espinal (delimitada per la línia discontinua) només colocalitza parcialment amb la SOD1 mutada sobreexpressada (a-c). No obstant, la sobreexpressió de la SOD1WT en ratolins de P120-150 no comporta marcatge per P2X₄ (d-f). A més el marcatge per P2X₄ no s'evidencia en ratolins control P120-150, que alhora mostren un marcatge dèbil per SOD1 (g-i). Alts nivells d'immunoreactivitat de SOD1 van ser trobats en cèl·lules astrògials (fletxes) i MN (*) en animals SOD1^{G93A}, com es mostra en el doble marcatge per GFAP (vermell) i hSOD1 (verd) en una secció de banya ventral de medul·la espinal de rata terminal transgènica per la SOD1 mutada. Barra: 100 μm en a-i, 25μm en j-l, 50 μm en m-o.

3.3.11 Estereotàxia.

El fet que les neurones degenerants mostressin marcatge positiu per P2X₄ en animals transgènics per SOD1^{G93A} i que aquest marcatge estigués íntimament lligat a l'activació de cèl·lules microgials va fer plantejar si aquests conformers de la SOD1^{G93A} immunoreactiva serien capaços d'activar microglia *in vivo*.

Per fer-ho es van aïllar les espècies reactives a P2X₄ de SOD^{G93A} mitjançant cromatografia d'afinitat de medul·la de rata transgènica de SOD1 utilitzant una matriu amb anticòs anti-P2X₄ unit. La proteïna recuperada després de l'elució va ser dialitzada contra PBS i injectada a la zona de l'hipocamp de ratolins control mitjançant estereotaxis. Alhora, es va injectar SOD1 comercial en PBS provinent d'eritròcits humans com a control. La microglia va ser avaluada a través de tècniques immunohistoquímiques utilitzant l'anticòs anti Iba-1 en seccions seriades del cervell de ratolins injectats a les 24 hores i als 5 dies després de la injecció. Com s'observa a la Figura 47a, els valors densitomètrics del senyal de Iba-1 sempre són superiors després de l'administració de les espècies reactives de SOD1^{G93A} en comparació a la SOD1^{WT}. En la Figura 47b es pot veure que la reacció microglial es va estendre a través del cervell des del lloc de la injecció fins al costat contralateral, essent la microglia activada hipertròfica i amb una morfologia ramificada.

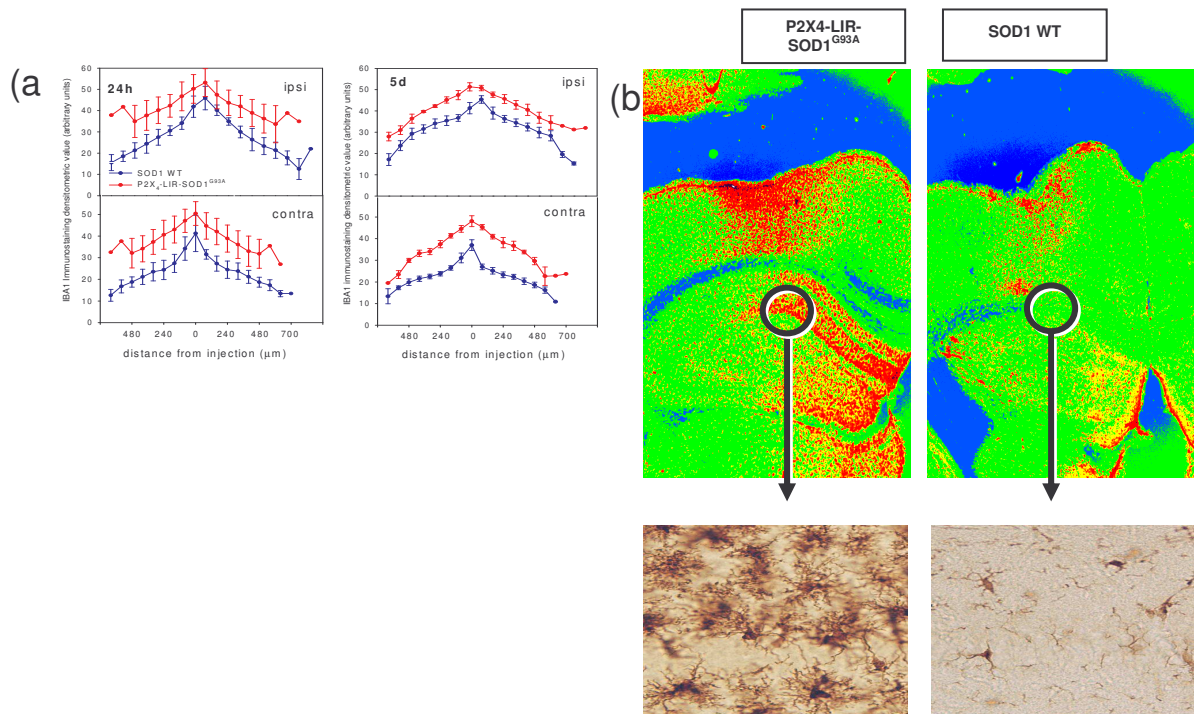


Figura 47: Espècies de SOD1^{G93A} reactives a anti P2X₄ indueixen activació microglial quan són injectades en cervells de ratolins WT. A. Després de la injecció de SOD1

WT comercial com a control o SOD1^{G93A} reactiva a anti P2X₄, els ratolins van ser sacrificats a 24 hores o a 5 dies i seccions de cervell van ser procesades pel seu marcatge contra Iba-1. La densitat òptica del senyal va ser mesurada per cada secció i representada gràficament en funció de la distància del lloc d'injecció. Cada punt representa la mitjana +/- SEM de les dades obtingudes de 3 animals diferents que van rebre SOD1 WT (blau) o SOD1^{G93A} reactiva a anti P2X₄ (vermell). B. Micrografia pseudocolorejada representativa mostrant la alta reacció neuroinflamatòria (vermell) produïda per la injecció de SOD1^{G93A} reactiva a anti P2X₄ evidenciada després del marcatge amb Iba-1, on es revela l'activació microglial.

3.4 Caracterització de la línia cel·lular NSC-34 i la seva transfecció amb hSOD1 mutada.

3.4.1 Expressió de P2X₄ en el model de línia cel·lular NSC-34

Es va voler explorar si el fenomen de malplegament i marcatge per part de P2X₄ de la SOD1 mutada es repetia en altres models experimentals. Per fer-ho, es va posar a punt el cultiu de la línia cel·lular NSC-34 i es va transfectar amb el plàsmid EGFP amb diferents tipus de SOD1 clonada (WT, G93A i A4V). Agregats de SOD1 s'identificaven fàcilment només en cèl·lules transfectades amb EFGP-SOD1^{G93A} i EFGP-SOD1^{A4V} (Figura 48). Amb tècniques immunocitoquímiques es va poder observar que en aquest model els agregats de SOD1 no mostraven marcatge per P2X₄. Ja que els nivells de la banda corresponent al receptor d'ATP P2X₄ es trobaven incrementats en medul·la espinal de rata transgènica, la possibilitat que la transfecció amb SOD1 pogués influenciar l'expressió endògena dels receptors d'ATP calci-depenents va ser avaluada. Així, canvis en nivells de calci intracel·lular van ser analitzats amb experiments amb Fura2 després d'estimulació amb ATP (Figura 49). Entrades de calci eren induïdes en cèl·lules control no transfectades, però aquestes entrades disminuïen quan la SOD1 era expressada en les cèl·lules NSC-34. El decreixement era més accentuat en cèl·lules sobreexpresores de SOD1 mutada, indicant que el guany de funció P2X₄ no està present en aquest model cel·lular d'ELA.

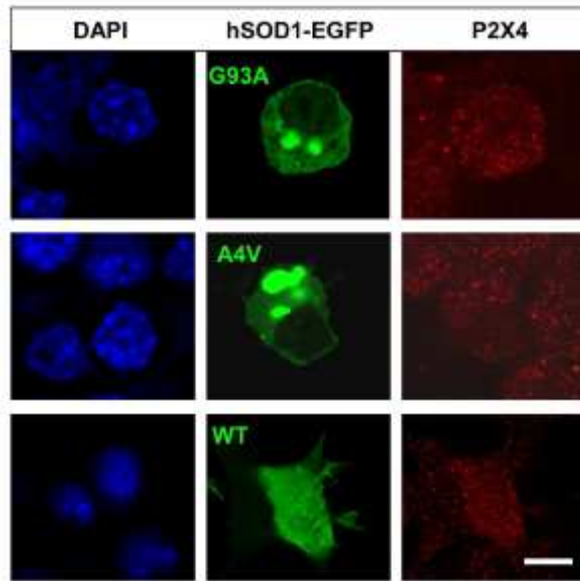


Figura 48: La sobreexpressió de EGFP-hSOD1 (G93A o A4V) en cèl·lules transfectades NSC-34 indueix la formació d'importants agregats citoplasmàtics proteics, que d'altra banda no s'observen amb la sobreexpressió de hSOD1 WT. Aquests agregats de hSOD1 no presenten immunoreactivitat creuada a l'anticòs anti P2X₄. Barra: 10µm.

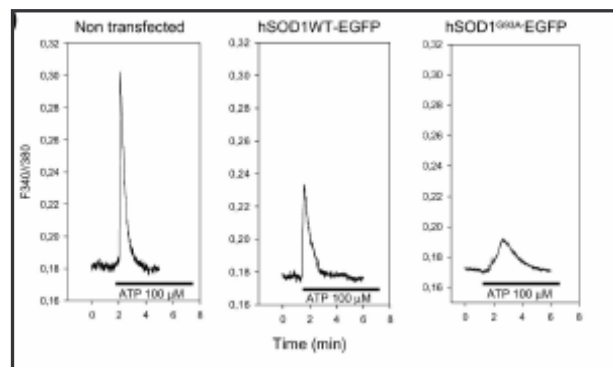


Figura 49: La sobreexpressió de hSOD1, tant WT com G93A, no implica una sobrerregulació dels receptors d'ATP calci-permeables sino al contrari, com es pot observar en les representacions gràfiques de les entrades de calci induïdes per ATP en cèl·lules NSC-34 amb Fura-2.

3.4.2 Efecte de liti en la presència d'agregats de SOD1 en cèl·lules transfectades NSC-34.

Un cop es va detectar la presència d'agregats de SOD1 en cèl·lules NSC-34 transfectades, es va voler fer un recompte de la presència d'aquests agregats en aquestes cèl·lules. En estudis previs s'havia constatat efectes del clorur de liti, LiCl, en la patogènia de la ELA (Fornai *et al.*, 2008), així que en paral·lel es va procedir a tractar les cèl·lules transfectades amb els diferents plàsmids EGFP-SOD1 amb 10 mM LiCl i fer el recompte del nombre de cèl·lules amb agregats a les 24, 48 i 72 hores després de la transfecció (Figura 50). Cèl·lules transfectades amb només EGFP o EGFP-SOD1^{WT} no produïen cap tipus d'agregat. A les 24 hores, la presència d'agregats era encara massa petita per observar diferències. En presència de liti, el nombre d'agregats disminuïa significativament a partir de les 48 hores de la transfecció. La diferència màxima s'observa a les 72 hores amb cèl·lules transfectades amb el plàsmid EGFP-SOD1^{G93A}, que de base és el plàsmid que produeix un nombre més elevat de cèl·lules amb agregats. Així, es pot constatar que la presència de 10 mM LiCl produeix una disminució significativa en el nombre de cèl·lules NSC-34 amb agregats transfectades amb diferents tipus de EGFP-SOD1.

En aquest experiment, no obstant, només es va utilitzar la dosi de 10 mM LiCl per tractar aquestes cèl·lules. Aquesta dosi és significativament molt superior a la dosi administrada en humans, ja que dosis superiors a 1 mM resulten tòxiques. Així, es va fer una corba dosis-resposta per veure quina era la concentració a partir de la qual el liti tenia efecte a l'hora de reduir els agregats proteics de SOD1. Com es pot observar a la Figura 51, és a partir d'una dosi de 2 mM de LiCl on es veuren diferències significatives en la reducció del nombre d'agregats, essent la reducció més accentuada quan s'utilitza la dosi de 5 mM.

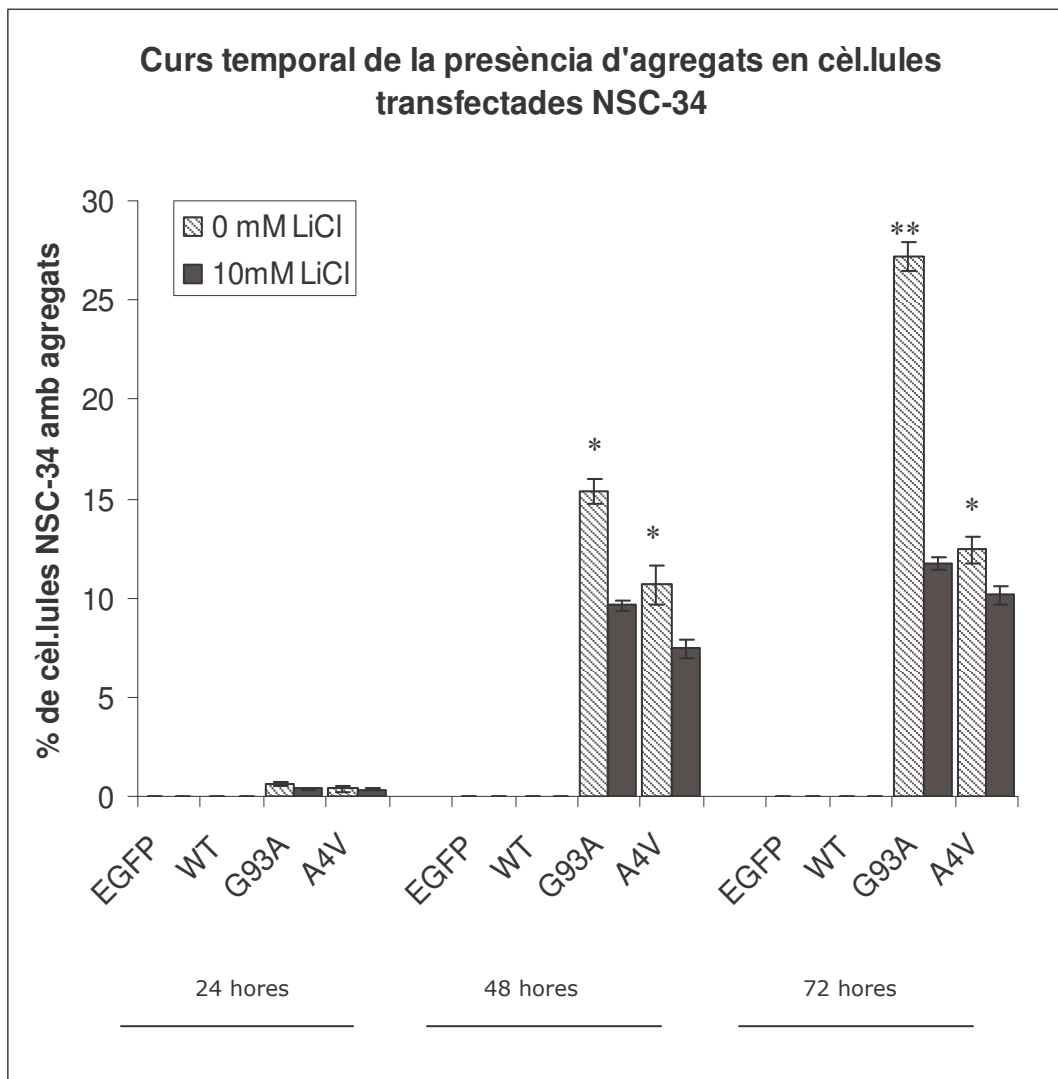


Figura 50: Curs temporal de la presència d'agregats de SOD1 després de la transfecció de cèl.lules NSC-34 amb diferents plàsmids de EGFP-SOD1 i amb tractament de 10mM de LiCl o sense ell. El tractament amb liti provoca la reducció del nombre d'agregats de SOD1 en les cèl.lules que en produeixen, les transfectades amb EGFP-SOD^{G93A} i EGFP-SOD^{A4V}. La reducció és màxima en NSC-34 transfectades 72 hores abans amb EGFP-SOD^{G93A}.

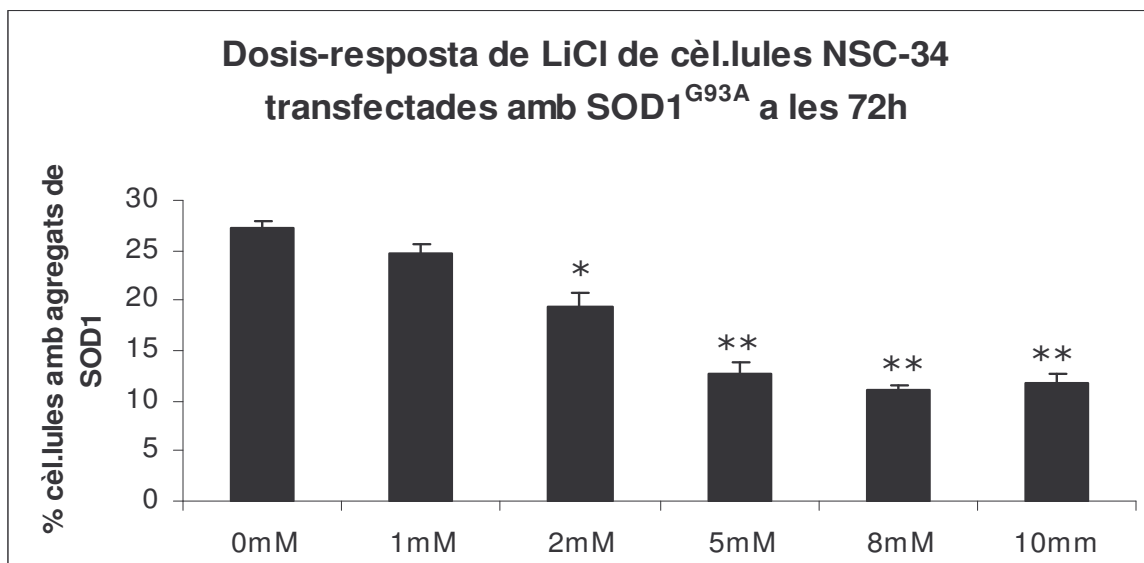


Figura 51: Percentatge de cèl.lules NSC-34 amb agregats a les 72 hores de la transfecció i amb tractament amb diferents dosis de LiCl. Les diferències són significatives a partir de 2 mM, trobant-se la màxima reducció utilitzant una dosis de 5 mM LiCl.

Un cop es va comprovar que el liti provocava la disminució en el percentatge de cèl.lules amb agregats de SOD1 a partir de les 48 hores de la transfecció amb el plàsmid EGFP-SOD1, es va voler comprovar si realment aquesta SOD1, que formaria part dels agregats, podria ser secretada de la cèl.lula gràcies al tractament amb liti. Així, es va agafar el medi de cultiu a les 48 hores de la transfecció, es va concentrar i es va analitzar mitjançant Western Blot utilitzant com anticòs primari anti-SOD1. D'aquesta forma es va poder comprovar que amb la transfecció amb EGFP-SOD1 mutada, el tractament amb liti induïa la secreció de la proteïna SOD1, que era trobada posteriorment en el medi de cultiu. En canvi, la transfecció amb EGFP-SOD1^{WT} no provocava un augment de la concentració de SOD1 a l'exterior de la cèl.lula, tot i que aquesta SOD1 igualment era secretada a l'exterior (Figura 52). En la quantificació de les bandes de Western Blot s'observa amb més claretat aquest fet. Agafant com a valor de referència "100%" la intensitat de banda de la transfecció que no ha estat tractada amb liti, es pot observar l'increment de SOD1 en el medi de cultiu per les transfeccions amb EGFP-SOD^{G93A} i EGFP-SOD^{A4V}. En canvi, la transfecció amb EGFP-SOD^{WT}, que en principi tampoc provocava la presència d'agregats de SOD1, no produïa un augment de la SOD1 extracel·lular degut al tractament amb liti, tot i que aquesta SOD1^{WT} sí que era expulsada al medi. Amb la transfecció amb EGFP únicament no s'observava banda corresponent a SOD1 en el medi de cultiu (no es mostra la imatge), per tant es pot concloure que la transfecció amb EGFP-SOD1 provoca la secreció de SOD1 a l'exterior de la

cèl·lula, però que aquesta secreció augmenta significativament en transfeccions amb EGFP-SOD1 mutada i tractament amb liti.

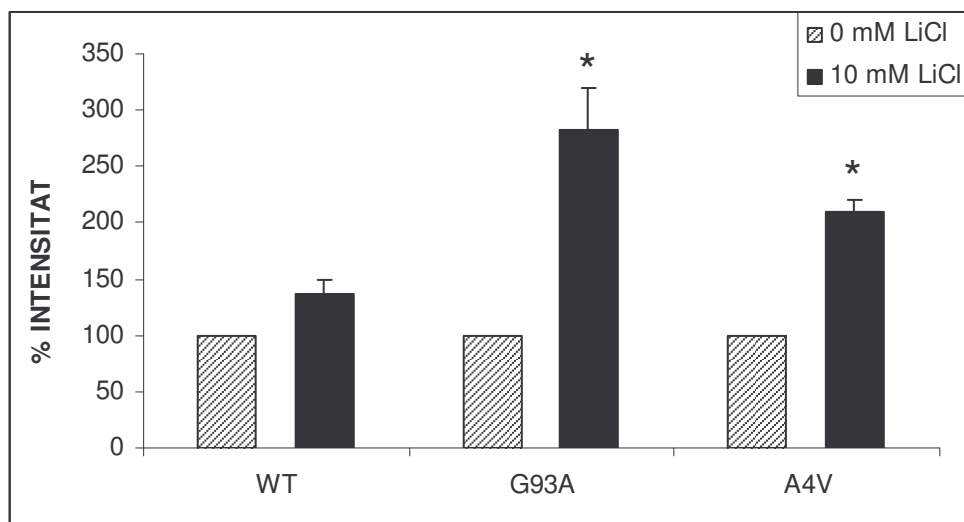


Figura 52: Western blot de medis de cultiu concentrats amb anti-SOD1 a les 48 hores de la transfecció amb EGFP-SOD^{WT}, EGFP-SOD^{G93A} i EGFP-SOD^{A4V} i de tractament amb 0 o 10 mM LiCl i representació gràfica del percentatge d'intensitat de les bandes, on s'observa que el tractament amb liti augmenta la secreció de la SOD1, que formaria part dels agregats en les cèl·lules transfectades amb SOD1 mutada.

Existeixen estudis previs sobre l'efecte del liti en la inducció de l'autofàgia i dissolució d'agregats proteics (Sarkar *et al.*, 2005). El pròxim pas va ser, doncs, explorar si hi havia una inducció de l'autofàgia en el nostre model que expliqués la dissolució dels agregats de SOD1 mutada i la seva secreció al medi de cultiu. Es va pendre la proteïna LC3 com a marcador de la formació de vesícules autofàgiques. LC3 té dues formes, I que es troba de forma constitutiva al citoplasma cel·lular i II, associada a vesícules autofàgiques.

Es va procedir a fer experiments immunocitoquímics amb anti LC-3 i anti-SOD1 de cèl·lules transfectades amb EGFP-SOD^{WT} i EGFP-SOD^{G93A} i tractades amb 10 mM LiCl per tal d'observar la inducció de l'autofàgia. Com es pot veure en la Figura 53, les cèl·lules transfectades amb EGFP-SOD^{G93A} mostren un augment del marcatge per LC3, cosa que no succeeix en cèl·lules transfectades amb EGFP-SOD^{WT}. Aquest marcatge no colocalitza amb SOD1, que marca específicament els agregats proteics.

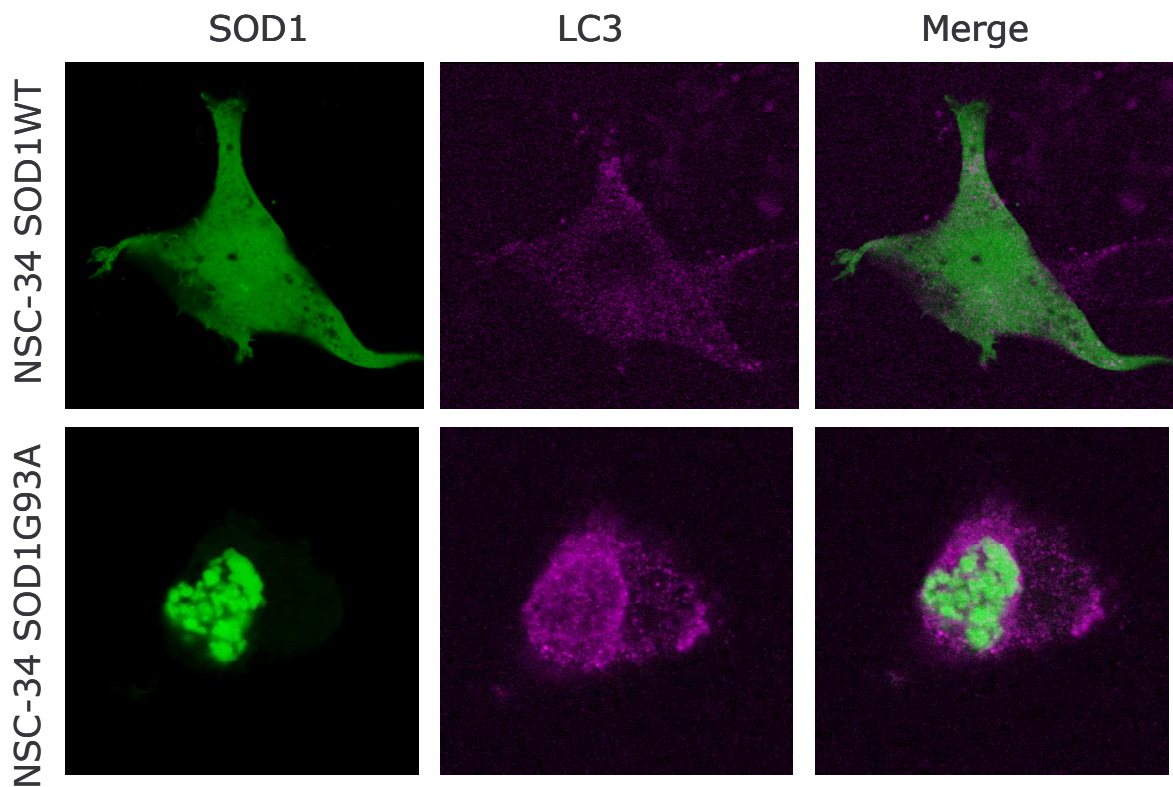
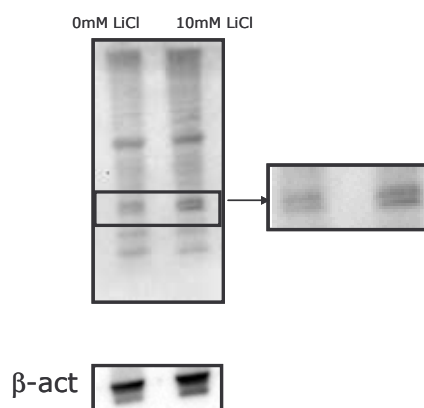


Figura 53: Immunocitoquímica amb els anticossos anti-SOD1 i anti-LC3 de cèl·lules NSC-34 transfectades amb EGFP-SOD^{WT} i EGFP-SOD^{G93A} i tractades amb 10mM LiCl, on s'observa l'augment de marcatge per LC3 de cèl·lules amb SOD1 mutada, cosa que assenyalava una inducció de fenòmens autofàgics.

Ja que l'autofàgia estava induïda en cèl·lules transfectades amb SOD1 mutada i tractades amb 10mM LiCl, es va voler comprovar amb Western Blot aquesta inducció observada amb tècniques immunocitoquímiques. Així, es van fer extractes cel·lulars a les 72 hores de cèl·lules NSC-34 transfectades amb EGFP-SOD^{G93A} i es van analitzar utilitzant com a anticòs primari anti-LC3. Com es pot veure en la Figura 54, LC3-I, que es correspon a la banda alta, de 25 KDa, està de forma constitutiva per totes les condicions. En canvi, LC3-II, la banda lleugerament inferior a LC3-I, es troba sobreexpressada en EGFP-SOD^{G93A} tractades amb 10mM de LiCl, cosa que indica una inducció de l'autofàgia.



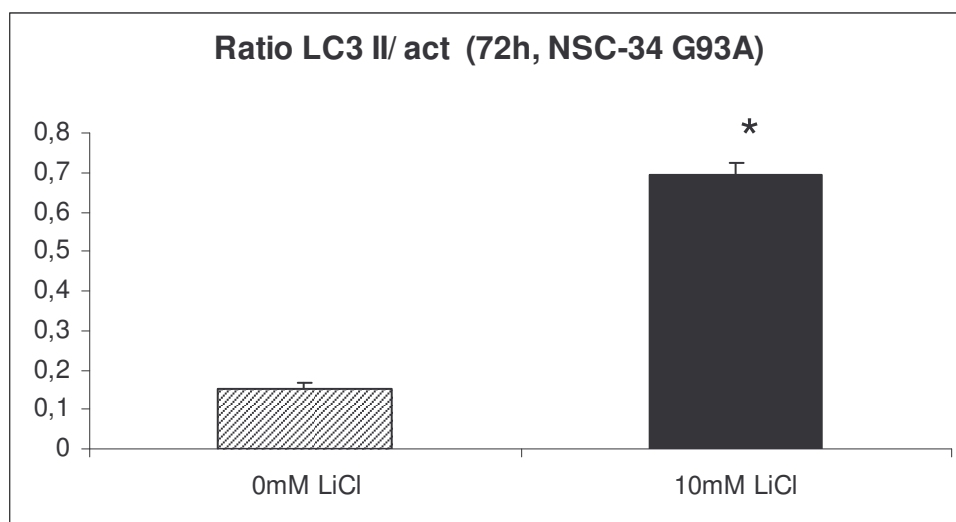


Figura 54. Western Blot i representació gràfica a les 72 hores de la transfecció del ratio LC3-II/actina de cèl·lules NSC-34 trasfectades amb EGFP-SOD^{G93A}, on es veu un augment d'aquesta ratio, és a dir, una activació de l'autofàgia, deguda al tractament amb 10 mM LiCl.

Un cop confirmada l'activació de l'autofàgia deguda al tractament amb Liti, es va voler comprovar ultraestructuralment com variava el nombre d'autofagosomes. En la sèrie superior de la Figura 55 es veu una representació de les imatges obtingudes per les cèl·lules NSC-34 trasfectades amb els plàsmids de hSOD1^{WT} i hSOD1^{G93A} i amb tractament amb 10mM LiCl o amb la seva absència. Els asteriscs vermells mostren exemples d'autofagosomes dins les cèl·lules. La gràfica de la Figura 55 mostra la representació del nombre d'autofagosomes trobats per secció cel·lular. Com es pot observar, la transfecció amb hSOD1^{WT} implica un nombre relativament baix d'autofagosomes, nombre que es veu significativament incrementat quan la transfecció es fa amb hSOD1^{G93A}, fet ja comprovat amb els experiments anteriors. Els autofagosomes augmenten encara més en número quan, a la transfecció amb hSOD1^{G93A}, se li afegeixen tractament amb 10mM LiCl, cosa que acaba de confirmar mitjançant tècniques de microscòpia electrònica els experiments realitzats anteriorment.

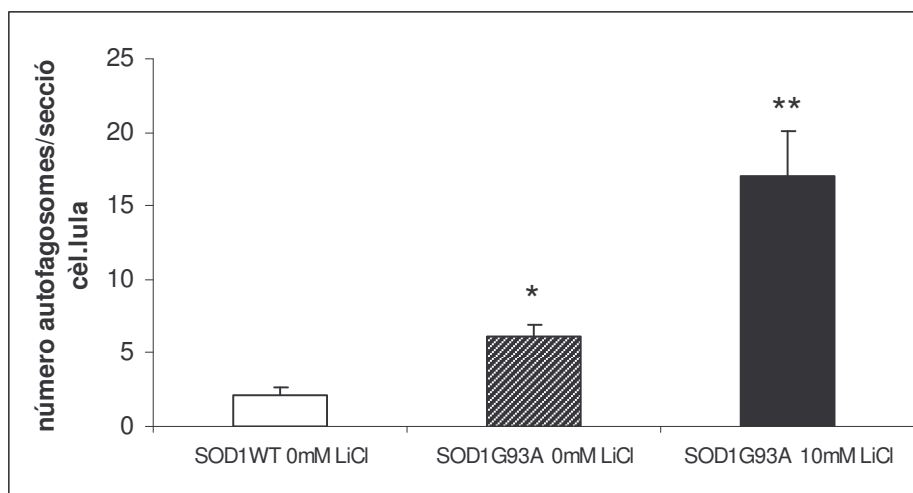
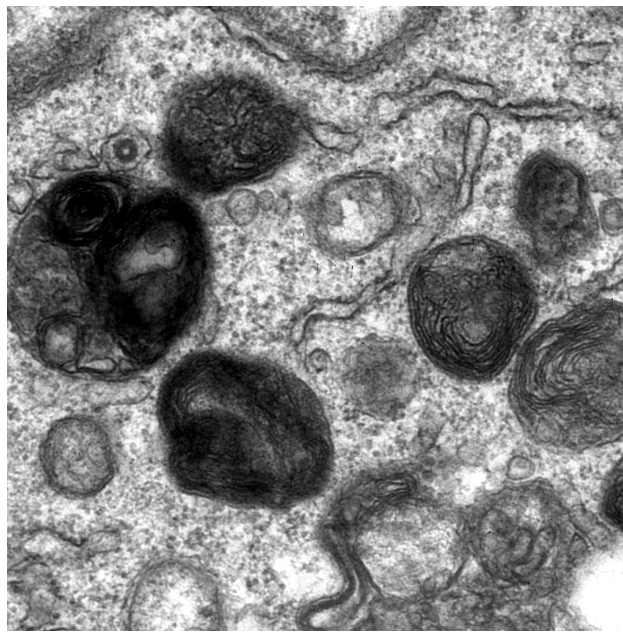
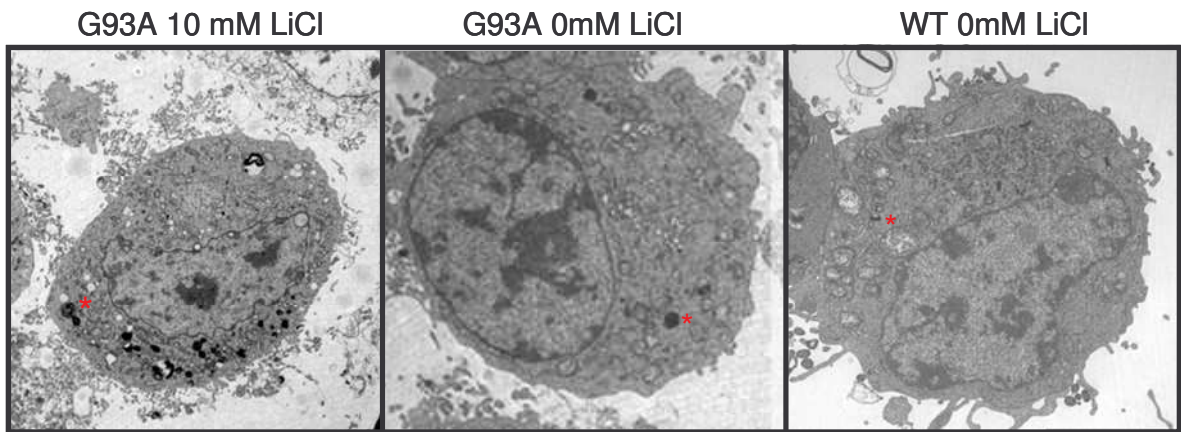


Figura 55: Sèrie superior. Imatges representatives de seccions de cèl·lules NSC-34 tractades o no amb 10mM LiCl i transfectades amb hSOD1^{WT} i hSOD1^{G93A}, on es

mostren exemples d'autofagosomes marcats amb asteriscs veremells. Detall a microscòpia electrònica dels autofagosomes (x20000)

Gràfica inferior. Representació del nombre d'autofagosomes per secció cel·lular on s'observa que la transfecció amb hSOD1^{G93A} comporta un increment significatiu del nombre d'autofagosomes. Aquest nombre encara és més significativament superior quan el cultiu és tractat amb 10 mM LiCl.

4. DISCUSSIÓ

4. DISCUSSIÓ

La autoimmunitat és un aspecte que ha estat relacionat amb la patogènia de la ELA, però fins ara no s'han trobat evidències concloents. Moltes de les característiques de les malalties autoimmunes no han estat trobades en la ELA (Kelemen *et al.*, 1983, Brown *et al.*, 1986, Drachman *et al.*, 1994). L'existència de fenòmens autoimmunitaris en la ELA ha estat àmpliament discutida (Drachman and Kuncl, 1989, Drachman *et al.*, 1995, Smith *et al.*, 1996). S'ha descrit l'existència d'anticossos circulants contra canals de calci (Voltage-gated Calcium Chanel, VGCCs) en malalts d'ELA esporàdica (Engelhardt *et al.*, 1995, Engelhardt *et al.*, 1997, Offen *et al.*, 1998). Es creu que aquests anticossos podrien activar aquests canals facilitant l'entrada de calci a la neurona i promovent els mecanismes excitotòxics i dany neuronal en la ELA. S'ha comprovat també que aquests anticossos anti VGCC són citotòxics per la línia híbrida de MN VSC4.1 de forma calci extracel·lular depenent. També s'ha descrit la presència d'anticossos anti-neurals en el líquid cefalo-raquidi i sèrums de malalts d'ELA, trobant-se evidència d'anticossos anti gangliòsids (Pestronk *et al.*, 1988, Niebroj-Dobosz *et al.*, 1999, Mizutani *et al.*, 2003). Es desconeix encara el significat de la seva presència, ja que no en tots els sèrums de pacients d'ELA s'ha determinat la seva presència i a més s'ha trobat evidència en sèrums de pacients d'altres malalties neurològiques (Lamb and Patten, 1991, Gallardo *et al.*, 2001). S'ha detectat la presència d'anticossos circulants anti sulfoglucuronil paraglobòsid, SGPG (Ben Younes-Chennoufi *et al.*, 1995), així com la presència d'anticossos anti acetilcolinestera (Haggstrom *et al.*, 1997) i més concretament presència d'anticossos que modifiquen l'activitat acetilcolinestera d'eritròcits (Sindhuphak *et al.*, 1988), la presència d'anticossos anti el receptor d'acetilcolina (Okuyama *et al.*, 1997), la presència d'anticossos anti Neurofilament (Couratier *et al.*, 1998) i la presència d'anticossos anti Fas en pacients d'ELA tant esporàdica com familiar (Sengun and Appel, 2003). Aquestes troballes, però, no han estat complementades amb correlacions de la malaltia amb el seu estadi, sexe o edat dels pacients.

S'ha demostrat que immunoglobulines de pacients d'ELA indueixen un augment del potencials miniatura en el ratolí. Aquesta inducció queda aturada afegint magnesi. Això suggereix que els terminals pre-sinàptics poden tenir un paper clau en la patogènia de la ELA en relació amb factors immunològics (Uchitel *et al.*, 1988). També s'ha demostrat que les IgG purificades de pacients amb ELA interaccionen amb les membranes pre-sinàptiques de les MNs a través de la interacció antígen-anticòs i modulen la transmissió sinàptica. La immunoreactivitat contra terminals nerviosos mostra una gran correlació amb la capacitat moduladora sinàptica. Les

IgG augmentarien l'alliberació de transmissor. L'activació d'aquest alliberament requereix l'entrada de Ca^{2+} a través de canals de calci tipus N, activació de l'activitat fosfolipasa C i activació de IP3 i receptors de rianodina (Pagani *et al.*, 2006).

La detecció d'aquests autoanticossos s'ha realitzat mitjançant diferents tècniques. A part de les tècniques bioquímiques clàssiques per determinar la presència d'anticossos (ELISA), s'han utilitzat diferents sistemes d'assaig. L'activitat dels anticossos pot ser avaluada amb cultius de línees cel·lulars, com els experiments de Offen *et al.*, 1998, on es va examinar la presència i funcionalitat d'anticossos anti canals de calci en sèrums de pacients d'ELA en la línia cel·lular PC12. Aquestes cèl·lules poden secretar dopamina tritiada exclusivament a través de VGCCs. El fet que l'alliberació d'aquesta substància pugui ser mesurada és una eina per determinar la presència i funcionalitat d'aquests anticossos anti VGCCs presents en sèrums de malalts d'ELA.

Els cultius organotípics de medul·la espinal també han estat utilitzats per analitzar els sèrums (Li *et al.*, 2008). En aquest cas, les IgG van ser aïllades i administrades al cultiu per avaluar-ne la seva toxicitat. Els resultats obtinguts no van mostrar cap tipus d'efecte neurotòxic en aquest sistema.

S'ha comprovat també la presència de Ig citotòxiques en la saliva de pacients amb ELA. En aquest assaig el sistema que es van utilitzar va ser la mesura de l'hemòlisi en posar en contacte eritròcits amb la saliva a analitzar (Conradi *et al.*, 1990).

El models *in vivo* també són un bon sistema per investigar la autoimmunitat en la ELA. Injectant IgG de malalts d'ELA en ratolins i processant-los 24 hores després per la seva detecció en el seu Sistema Nerviós, s'han vist aquests anticossos en els axons terminals de MN espinals, associats a microtúbuls i a Reticle Endoplasmàtic rugós.

Un bon model utilitzat des de fa temps per investigar la biologia de les MN i el sistema neuromuscular ha estat l'embrió de pollastre (Hamburger, 1951). Tanmateix s'ha emprat per estudiar el desenvolupament del sistema nerviós, el fenomen de mort cel·lular programada i fenòmens d'excitotoxicitat, donada la seva facilitat de manipulació. El tractament *in vivo* d'embrions de pollastre amb extracte muscular (Oppenheim *et al.*, 1988) o BDNF (Oppenheim *et al.*, 1992) rescata les MN de la mort natural que es produeix durant la PCD. També, el tractament amb BDNF i NGF inhibeixen la mort de les cèl·lules després de l'eliminació de les seves aferències, indicant el paper de les neurotrofines en la promoció de la supervivència en MNs en desenvolupament.

En experiments on s'ha eliminat de l'embrió de pollastre a E 2.5 l'esbós que originarà l'extremitat inferior s'ha comprovat que el nombre de MN no queda afectat. És en el període de PCD quan tant les neurones sensibles com motores experimenten uns nivells més elevats de mort. El tractament amb factors neurotròfics o amb extracte muscular rescata d'aquesta mort les neurones sense afectar la proliferació anterior dels precursors. El tractament amb curare en aquest cas no produeix rescat de la mort després de l'ablació. Els mateixos resultats s'obtenen amb tractament amb inhibidors de la interleukina beta1. Així doncs, la pèrdua de MN després de l'ablació no es pot atribuir a una alteració en la proliferació, migració o diferenciació, sinó a l'absència de senyals tròfics derivats de la musculatura diana (Calderó *et al.*, 1998).

En aquest model, l'aplicació de l'antagonista dels receptors de glutamat MMDA des de E5 fins a E9 comporta un dany selectiu en MN que desemboca en un procés degeneratiu sense una mort cel·lular immediata. La sola aplicació de MMDA en E8 induïx una necrosis massiva en tota la medul·la espinal. La degeneració crònica després del tractament amb MMDA implica una incompetència a desenvolupar la mort cel·lular programada o l'autofàgia. En determinats grups de MN, el neuropèptid CGRP s'acumula en somes, axons perifèrics i plaques motores després del tractament crònic amb MMDA, però no en embrions paralizzats amb una administració crònica de curare. La ramificació nerviosa intramuscular també queda alterada després del tractament amb MMDA. El tractament amb MMDA fa augmentar el nombre de llocs post sinàptics, però aquest nombre és molt més elevat després del tractament amb curare (Calderó *et al.*, 2007).

En aquest mateix model també s'ha utilitzat la toxina α A-OIVA, que és quasi igual d'efectiva que el curare augmentant la supervivència de les MN i la ramificació nerviosa intramuscular. S'ha pogut determinar que la diferència entre la forma embrionària o fetal d'un múscul i la seva forma adulta implica la pèrdua de la subunitat gamma del receptor nicotínic d'acetilcolina. La inhibició de la forma embrionària dels receptors d'acetilcolina en l'embrió de pollastre és suficient per rescatar MN de la PCD sense la participació d'aquests receptors nicotínics d'acetilcolina neuronals (Oppenheim *et al.*, 2008).

La neurotoxicitat també ha estat testada en models d'embrió de pollastre. En aquest model, l'administració de sèrums de malalts d'ELA durant el període de mort cel·lular programada produïa, paradoxalment, un rescat significatiu de MN d'aquesta mort fisiològica (Oppenheim, 1987).

En aquest treball hem demostrat que alguns pacients amb Esclerosi Lateral Amiotròfica i amb Lower Motoneuron Disease presenten autoanticossos anti-proteïnes de la família de les Semaforines. El significat fisiopatològic de la presència d'aquests anticossos és encara desconegut. Les Semaforines són una família de proteïnes transmembrana o secretades que actuen com a guia axonal (Kolodkin *et al.*, 1993) a més de tenir altres papers, com per exemple, en càncer, actuant sobre la migració cel·lular, metastasis i creixement cel·lular (Flannery *et al.*, 2009). Se sap que l'administració de sèrums de pacients d'ELA durant el període de PCD en embrions de pollastre fa augmentar el nombre de MN, però també s'ha comprovat l'efecte citotòxic dels sèrums (Conradi and Ronnevi, 1985) o l'efecte neurotòxic de IgG patològiques sobre MN en altres models (Pullen *et al.*, 2004) o sobre plaques motores (Uchitel *et al.*, 1992). En el nostre cas, es va observar que, amb l'aplicació dels sèrums, no només les MN no degeneraven o morien durant la PCD, sinó que un nombre moderat però significativament més alt d'aquestes MN sobreviuen al Període de Mort Cel·lular Programada.

Posteriorment s'ha comprovat que aquesta supervivència era responsable d'algun tipus de IgG que es trobava en els sèrums dels malalts. Es va voler comprovar si l'efecte dels sèrums es produïa només a nivell de les MN o si actuava a nivell de la unió neuromuscular. Al fer els experiments de marcatge del patró de ramificació nerviosa intramuscular després de l'administració dels sèrums es va poder veure que aquesta ramificació augmentava amb el tractament amb sèrums patològics. Aquesta troballa recorda fenòmens d'*sprouting* que es troben en malalts d'ELA (Stålberg *et al.*, 1975), malgrat aquests fenòmens són conseqüència de la mort de les MN i de la denervació.

Amb tècniques proteòmiques s'ha pogut constatar que algunes de les immunoglobulines de pacients amb malalties de la MN són capaces d'unir-se a proteïnes dels sistema nerviós de l'embrió de pollastre. Aquestes proteïnes han estat identificades com a proteïnes de la família de les Semaforines. La identificació ha estat comprovada després mitjançant altres tècniques. S'ha utilitzat l'anticòs comercial anti-Sema 3A per rescatar MN d'embrió de pollastre durant la PCD. També s'ha comprovat la presència d'aquests autoanticossos anti Semaforina quan, fent experiments de col·lapse de conus de creixement de DRG (Luo *et al.*, 1993), els sèrums eren capaços d'inhibir el col·lapse produït per la Semaforina.

El fet és que s'han trobat anticossos anti Semaforina en alguns dels sèrums patològics que eren capaços d'inhibir les proteïnes Semaforina que actuaven a nivell del Sistema Nerviós del pollastre en desenvolupament. Al inhibir les proteïnes implicades en la guia axonal augmenta el nombre de cèl·lules que podien 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, augmentant també la ramificació nerviosa muscular.

Fins ara no s'ha establert cap relació entre la patogènia de la ELA i les proteïnes Semaforina, a excepció de l'estudi de De Winter *et al.*, 2006, on proposen una expressió diferencial de la Sema 3A en cèl·lules de Schwann terminals de diferents poblacions de fibres musculars. En el ratolí transgènic SOD1^{G93A}, en comparació amb el ratolí control, hi ha un augment de l'expressió de mRNA per Sema 3A en les cèl·lules de Schwann. Aquesta expressió diferencial de Sema 3A es trobaria limitada en cèl·lules de Schwann terminals associades a subpoblacions específiques de fibres musculars. Aquests subtipus de fibres es caracteritzarien per la seva poca capacitat d'estímulació d'*sprouting* nerviós després d'un dany i serien les primeres a perdre's en la ELA (Frey *et al.*, 2000). El paper específic de Sema 3A en la patogènia de la ELA no estaria clar, però l'augment de l'expressió de Sema 3A en aquestes cèl·lules de Schwann terminals del ratolí transgènic podria causar repulsió dels axons de la unió neuromuscular, resultant en una denervació axonal i degeneració de MN.

Un altre fet que recolzaria la hipòtesis que la patogènia de la ELA podria residir en la pèrdua de unions neuromusculars (*dying back*) i no en problemes a nivell de MN seria que, en el ratolí transgènic SOD1^{G93A}, l'inici dels símptomes es dona cap a P90, però a P47 ja es pot observar una denervació de plaques motores i entre P47-80 es constata una pèrdua d'axons motors (Fischer *et al.*, 2004). En els experiments de Gould *et al.*, 2006, on es van creuar ratolins transgènics SOD1^{G93A} amb ratolins deficientes per Bax, donen suport a aquesta hipòtesis.

A part d'aquest estudi, no hi ha cap relació més entre ELA i Semaforines. En el nostre treball s'han trobat indicis d'autoanticossos en malalts d'ELA, encara que està plenament demostrat que la ELA no és una malaltia autoimmunitària. Són ben coneguts els treballs de Kelemen *et al.*, 1983 o Brown *et al.*, 1986 on s'utilitzen teràpies immunosupressores sense cap tipus de resultat.

Malgrat això, s'han descrit prèviament les troballes de diferents tipus d'autoanticossos en malalts d'ELA (Engelhardt *et al.*, 1995, Engelhardt *et al.*, 1997, Offen *et al.*, 1998, Pestronk *et al.*, 1988, Niebroj-Dobosz *et al.*, 1999, Mizutani *et al.*, 2003, Ben Younes-Chennoufi *et al.*, 1995, Haggstrom *et al.*, 1997).

La significació de la presència d'anticossos antisemaforina en els sèrums de pacients amb ELA no està gens clara. Cap dels altres autoanticossos trobats s'ha pogut correlacionar amb cap aspecte de la malaltia, tot i que la seva presència ha d'estar lligada a algun aspecte de la malaltia, encara que sigui un aspecte secundari o una conseqüència d'algun fenomen important. Els fenòmens autoimmunitaris en la ELA han de ser tinguts en compte.

En aquest treball també s'ha demostrat que l'anticòs comercial contra el proteïna receptora d'ATP, P2X₄ s'uneix selectivament a MNs degenerants en models d'ELA de ratolins i rates transgèniques. A més, la capacitat d'aquest anticòs per detectar neurones danyades ens ha permès desemmascarar la patologia neuronal en àrees de Sistema Nerviós Central no considerades habitualment afectades en el curs de la malaltia de la ELA.

D'aquesta manera, malgrat els interrogants sobre la significació fisiopatològica de la immunoreactivitat de P2X₄ descrita en models animals amb ALS, la utilització d'aquest anticòs com a marcador genera una única i valuosa eina per revelar neurones malaltes en aquests models.

És interessant puntualitzar que les neurones afectades no mostren altres canvis comunament associats amb altres tipus de degeneració neuronal, com ara mort cel·lular, activació de Caspasa 3 o marcatge per TUNEL.

Els nostres resultats referents a la falta de morfologia apoptòtica en MN degenerants en rates transgèniques concorden amb altres estudis amb ratolins transgènics com a models de ALS (Migheli *et al.*, 1999; Guégan and Przedborski, 2003; Martin *et al.*, 2007), així com amb la falta de sobrerregulació de gens relacionats amb la mort cel·lular (Perrin *et al.*, 2005, 2006).

L'adquisició del marcatge per P2X₄ podria ésser considerat en el context d'altres alteracions que han estat descrites en MN abans de la mort cel·lular en models de ALS. Això inclouria alteracions mitocondrials, fragmentació de l'Aparell de Golgi (Mourelatos *et al.*, 1996), discapacitat en el transport axonal (Zhang *et al.*, 1997; Williamson and Cleveland, 1999; Dupuis *et al.*, 2000), retracció de les sinapsis neuromusculars (Fischer *et al.*, 2004; Pun *et al.*, 2006), dipòsits de material ubicuitinitzat, canvis astròglials i pèrdua de EAAT2 (Howland *et al.*, 2002), downregulació de chaperones (Maatkamp *et al.*, 2004), upregulació del factor de transcripció ATF3 (Vlug *et al.*, 2005) o canvis en altres gens que involucrats en creixement cel·lular i manteniment (Perrin *et al.*, 2005).

No obstant, la immunoreactivitat per P2X₄ comença a aparèixer amb la primera simptomatologia clínica, indicant la seva associació amb la disfunció MNI. La relació inversa entre el marcatge amb NeuN i podria ser un signe d'aquesta anormalitat. NeuN és una proteïna nuclear específica de MN (Mullen *et al.*, 1992) que ha estat utilitzat per tal de seguir la pèrdua neuronal en ratolí transgènic (Hafezparast *et al.*, 2003). Malgrat el nombre de cèl·lules NeuN positives decreix amb algunes condicions patològiques, això no implica necessàriament la mort neuronal, sinó més aviat la depleció de la proteïna NeuN o pèrdua d'antigenicitat associada a dany neuronal (Unal-Cevik *et al.*, 2004). En el nostre cas, les MN que han perdut el marcatge per NeuN mostren fenotips que van des de la normalitat fins a una òbvia

destrucció cel·lular amb una forta immunoreactivitat per P2X₄. No hi ha dubte que les cèl·lules NeuN negatives/ P2X₄ positives estan danyades des de que la immunoreactivitat per P2X₄ és adquirida; les MN atrauen la microglia que inicia un procés de neuronofagia que culmina amb la pèrdua cel·lular. Si la immunoreactivitat per P2X₄ està involucrada en l'activació de la microglia està encara per determinar. També és important el fet que el dany MNI en la ELA està altament accentuat per cèl·lules microgials (Beers *et al.*, 2006; Moisse and Strong, 2006), que són considerades com una diana molt significativa en la teràpia per la ELA.

L'adquisició de la positivitat per P2X₄ no només roman en el cos cel·lular, sinó que també s'estén en dendrites i axons. En els terminals motors, el marcatge per P2X₄ s'observava moderat però clarament visible en estadis inicials i mitjans de la malaltia. Si això és l'expressió d'un procés neurodegeneratiu per "dying-back" observat en ratolins SOD1^{G93A} (Fisher *et al.*, 2004; Gould *et al.*, 2006), caldria ser investigat més profundament.

Una altra qüestió rellevant derivada dels resultats està relacionada amb el substrat molecular i la forta immunoreactivitat per P2X₄. S'ha de tenir en compte que l'anticòs anti P2X₄ utilitzat havia estat extensivament aplicat per detectar els receptors P2X₄ en diferents cèl·lules i teixits amb resultats satisfactoris respecte la seva especificitat (Rubio and Soto., 2001; Atkinson *et al.*, 2003; Qiao *et al.*, 2003; Doctor *et al.*, 2004; Nasu-Tada *et al.*, 2006; Yeung *et al.*, 2006). A més, en cervell i altres teixits del ratolí knockout per P2X₄, el mateix anticòs és incapaç de detectar cap senyal per western blot o immunocitoquímica (Sim *et al.*, 2006). Utilitzant Western Blot, nosaltres detectàvem dues bandes de proteïna en el rang esperat de pes esperat en extractes de fracció membranosa de medul·la espinal. Aquestes bandes van ser eliminades quan l'anticòs era prèviament incubat amb el pèptid d'immunització. En un principi es va pensar que la glicosilació del receptor podria explicar la variabilitat de pes molecular, ja que la proteïna té 6 (North, 2002) o 7 (Rettinger *et al.*, 2000) llocs de N-glicosilació. Tot i això, no hi ha una acurada relació entre el nombre d'aquestes bandes de proteïna i els resultats observats en immunocitoquímica a través del curs de la malaltia, ja que la significativa upregulació només és observada en estadis terminals en animals mSOD^{G93A}.

La banda d'uns 25 KDa present en extractes de la fracció soluble mostra un perfil que se superposa amb la immunocitoquímica de P2X₄. Aquesta banda és clarament observat en animals mSOD^{G93A} a P30 però absolutament absent en animals Wild type.

Hem pogut demostrar que aquesta banda de baix pes molecular es correspon a l'acúmulo de proteïna SOD1 amb una conformació específica que implica malplegament, i que està implicada en un important paper patogènic.

Això es pot deduir pel fet que les neurones que mostren marcatge per P2X₄ mobilitzen micròglia neuronofàgica i perquè aquests conformers de SOD1^{G93A} malplegats injectats en cervells sans indueixen nivells significativament alt de micròglia activada. El subtipus P2X₄ de receptors d'ATP va ser trobat upregulat en molts models amb dany neuronal, però generalment està associat amb macròfags o poblacions de cèl·lules microglijals activats i amb la generació de dany neuronal (Cavaliere *et al.*, 2003; Guo and Schluesener, 2005; Guo *et al.*, 2005; Franke and Illes, 2006; Trang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

Aquesta reactivitat creuada pot ser explicada per la similitud en la seqüència d'aminoàcids en el pèptid d'immunització utilitzat en la producció de l'anticòs i la seqüència de SOD1 en la regió hidrofòbica interior. Aquest epítop ha de tenir una alta afinitat per unir-se a l'anticòs anti P2X₄, exposat en neurones degenerants per raons encara no aclarides.

L'anticòs anti P2X₄ és capaç de reconèixer SOD1 no plegada en Westerns Blots desnaturalitzants. En experiments d'immunoprecipitació queda demostrada l'afinitat d'aquest anticòs per formes específiques de la SOD1. SOD1 malplegada és propensa a la formació d'agregats que han estat considerats neurotòxics (Brujin *et al.*, 1998, Johnston *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2002, Basso *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2008).

Monòmers de SOD1 malplegats solubles amb regions hidrofòbiques exterioritzades han estat trobats en models de ratolí mutant per la SOD1 i poden estar implicats en la neurotoxicitat de la ELA (Zetterstörn *et al.*, 2007). Agregats proteics també han estat trobats en neurones i en cèl·lules glijals (Stieber *et al.*, 2000, Jonsson *et al.*, 2004). Nosaltres hem trobat que els agregats de SOD1 en cèl·lules NSC-34 no mostren marcatge per P2X₄, cosa que indicaria processos i agregats finals diferents en els dos models.

El fet que proteïnes malplegades puguin exterioritzar parts del seu interior hidrofòbic fa possible que els epítops reconeguts per P2X₄ puguin ser exposats fent una forma soluble neurotòxica de SOD1 o en forma d'oligòmer de proteïna SOD1 mutada. Si fos això el que succeís, aquest fet concordaria amb la localització citosòlica ultraestructural de marcatge per P2X₄ en neurones degenerants (Casanovas *et al.*, 2008)

Malgrat SOD1 és una proteïna citosòlica que no té senyals de translocació que li permetin entrar en rutes secretores, s'ha demostrat que pot ser secretada a l'espai extracel·lular (Turner *et al.*, 2005) després d'arribar a l'Aparell de Golgi (Urushitani

et al., 2006, 2008). A diferència de SOD1^{WT}, la forma mutant extracel·lular de SOD1 és capaç d'activar cèl·lules microgials que són neurotòxiques en cultius primaris de medul·la espinal (Urushitani *et al.*, 2007). Nosaltres hem demostrat que conformers de SOD1^{G93A} reconeguts per P2X₄ són inductors de l'activació microglial en cervells sans "in vivo". Això suggereix que la seva presència en neurones degenerants durant la progressió de la ELA podria tenir un important paper pel que fa la microglia i la neuronofagia. Malgrat la controvèrsia està present (Gowing *et al.*, 2008), sembla que la microglia és un factor patogènic rellevant en la progressió de la ELA (Beers *et al.*, 2006, Xiao *et al.*, 2007) i altres cèl·lules del sistema immune, com els limfòcits T, podrien modular l'activitat microglial (Beers *et al.*, 2008, Chiu *et al.*, 2008). Utilitzar com a diana terapèutica la microglia podria ser una estratègia important en la ELA. S'ha demostrat que reduint la SOD1 neurotòxica extracel·lular per immunoteràpia té un efecte beneficiós pel que fa els símptomes de la malaltia i millora l'esperança de vida de ratolins transgènics per la SOD1 (Urushitani *et al.*, 2007).

Un anticòs anomenat SEDI, que ha estat recentment desenvolupat, és capaç de reconèixer SOD1 quan té una conformació malplegada però no en la conformació nativa de la proteïna (Rakhit *et al.*, 2007). El patró de marcatge és molt similar al marcatge de P2X₄. Tot i això, en contrast al marcatge amb P2X₄, SEDI pot detectar cossos d'inclusió en els cossos cel·lulars de MN i astròcits. Això podria implicar que diferents formes de SOD1 coexisteixen amb una distribució diferencial en models animals d'ELA, i aquestes formes diferents poden ser reconegudes per anticossos específics. Més recentment s'han desenvolupat anticossos monoclonals que corroborarien aquesta hipòtesis i proporcionarien nous agents per desenvolupar noves estratègies terapèutiques (Julien *et al.*, 2008).

L'activació de la senyalització purinèrgica a través dels receptors ionotròpics P2X per ATP alliberat a les sinapsis, axons i cèl·lules gials forma part d'una sèrie de complexes esdeveniments involucrats en la comunicació neuronal i neuro-glial en estats fisiològics i patològics (Fields and Burnstock, 2006; Burnstock, 2007). Canvis en l'expressió dels subtipus P2X₁ i P2X₂ van ser observats en MN després d'axotomia facial (Kassa *et al.*, 2007). P2X₄ no va ser estudiat en aquest treball, però va ser trobat en concentracions incrementades en MN després d'axotomia vagal en un altre estudi (Atkinson *et al.*, 2003). Tal i com coneixem, només hi ha constància de la descripció de immunoreactivitat per P2X₄ en cossos neuronals i neurites degenerants després de dany físic (Schwab *et al.*, 2005). Això suggereix que aquesta propietat no és exclusiva de MN degenerants en models d'ELA. La participació del receptor P2X₄ en la modulació de la degeneració de MN ha estat relacionada recentment amb efectes protectors de baixes concentracions de ATP i

excitotoxicitat induïda per ivermectina i kainat (Andries *et al.*, 2007). En el mateix estudi es va trobar que la ivermectina era capaç de prevenir la degeneració de MN i allargar la supervivència de ratolins mSOD^{G93A}. En el context de les nostres troballes aquests resultats són intrigants, ja que ells defineixen el P2X₄ com una diana terapèutica per la ELA. Així, aquest tema hauria de ser investigat més profundament per tal d'entendre el seu paper en la degeneració neuronal de la ELA i d'altres patologies.

Malgrat la degeneració de MN és considerada la marca de la patologia de la ELA, nosaltres hem observat, coincidint amb altres autors (Martin and Swash, 1995), que altres poblacions neuronals poden ser afectades. La gran capacitat d'aquest anticòs per detectar neurones degenerants ens permet demostrar que altres poblacions neuronals a més de les MN són afectades en models animals transgènics per la ELA. Aquestes poblacions inclouen neurones serotoninèrgiques del rafe, neurones noradrenèrgiques del locus coeruleus i cèl·lules de Purkinje del cerebel. En tots aquests casos, un marcatge intens per P2X₄ indicava degeneració neuronal, ja que es podia observar microglia activada al voltant d'aquestes neurones com a signe de neuronofagia, tal i com succeïa en les MN espinals.

La participació del sistema serotoninèrgic en la ELA humana i experimental ha estat àmpliament observada en estudis on la serotonina i els seus receptors han estat trobats reduïts en etapes inicials de la malaltia (Turner *et al.*, 2005; Sandyk, 2006). A més, la potenciació farmacològica de la neurotransmissió serotoninèrgica retrassa la debilitat i la mortalitat en ratolins mSOD^{G93A} (Turner *et al.*, 2003). Encara que la participació de neurones noradrenèrgiques en models animals d'ELA encara no ha estat descrita, el fet que hi hagi degeneració neuronal en el locus coeruleus, que sovint inclou cossos de Bunina, ha estat descrita en casos humans aïllats (Iwanaga *et al.*, 1997; Machida *et al.*, 1999). És interessant assenyalar que la norepinefrina continguda en neurones del locus coeruleus es projecta cap a la banya ventral de la medul·la espinal (Aston-Jones *et al.*, 1995), i que aquest sistema descendent té efectes moduladors en l'activitat de les MN de la medul·la espinal (Liu *et al.*, 1995). Encara que hagin estat trobats autoanticossos contra canals de Calci tipus P en pacients d'ELA (Llinás *et al.*, 1993), i la participació espinocerebelar ha estat detectada en malalts d'ELA (Hudson, 1981), no hi ha evidències consistents de patologia cerebelar en humans ni en models transgènics. No obstant, s'ha d'afegir que la pèrdua de cèl·lules de Purkinje ha estat descrita en un cas d'ELA familiar (Hirano *et al.*, 1967).

Aquí, nosaltres mostrem que les cèl·lules de Purkinje estan afectades en rates i ratolins mSOD^{G93A}. Això s'ha de tenir en compte ja que el cerebel dels animals transgènics ha estat utilitzat com a teixit control en molts estudis. Aquestes

cèl·lules no mostren canvis indicatius d'apoptosi, però, com s'observa en altres tipus de neurones aquí descrites, constitueixen un focus atractiu per la microglia, que migra cap al seu cos cel·lular i dendrites a través dels intersticis entre fibres paral·leles, en la capa molecular.

Mecanismes molt complexos que engloben l'apoptosi, mecanismes no apoptòtics i autofàgia han estat observats en la participació de la mort de les cèl·lules de Purkinje i en altres models de degeneració cerebelar (Bäurle *et al.*, 2006; Dusart *et al.*, 2006), on l'activació de la microglia sembla jugar un paper primordial (Marín-Teva *et al.*, 2004). L'estudi de l'expressió de P2X₄ en aquests models podria ajudar a entendre el seu paper en diferents rutes de mort neuronal.

Per últim, en aquest treball també s'ha estudiat la proteïna SOD1 en el model de línia cel·lular de MN NSC-34. Transfectant la línia cel·lular NSC-34 amb diferents formes mutades de SOD1 es formaven agregats de SOD1 dins la cèl·lula (Turner *et al.*, 2005), agregats que no apareixien quan es transfectava amb SOD1^{WT}. Aquests agregats de SOD1 mutada presents en cèl·lules transfectades eren disminuïts en nombre quan es tractava el cultiu cel·lular amb liti. El liti ha estat utilitzat des de fa temps per tractar diferents malalties. S'ha de tenir en compte, però, que les dosis utilitzades per fer els experiments són molt superiors a les dosis que es poden utilitzar *in vivo*, ja que el liti, a altes concentracions, resulta tòxic.

Els nostres resultats concorden amb els resultats obtinguts per Fornai *et al.*, 2008b, on el tractament amb baixes dosis de liti fa disminuir els agregats intracel·lulars que contenen α -sinucleïna, ubiquitina i SOD1 mutada en MN de la medul·la espinal. El liti podria estar afectant a múltiples dianes que serien candidates a ser teràpia en la ELA. En aquest treball s'ha trobat que la SOD1 transfectada prèviament a cèl·lules NSC-34 és secretada i es troba en el medi de cultiu, amb concordança també amb el que van trobar Turner *et al.*, 2005 o Mondola *et al.*, 1998 per diferents línees cel·lulars. Hetz *et al.*, 2009, han trobat que, en ratolins mutants per la SOD1 deficients per XBP-1 (factor de transcripció que regula gens relacionats amb el plegament proteic) els animals es tornen més resistents a la malaltia i els agregats de SOD1 disminueixen, cosa que correlaciona amb uns nivells augmentats d'autofàgia. Els nivells de SOD1 al medi de cultiu eren majors en cultius tractats amb liti que en cultius sense el tractament. Malgrat això, hi ha una certa controvèrsia pel que fa als estudis amb liti com a tractament per la ELA. Mentre alguns assajos en models de ratolí mutat per la SOD1 no aporten resultats positius en el tractament de la ELA amb liti (Gill *et al.*, 2009, Pizzasegola *et al.*, 2009), n'hi ha d'altres que sí aporten bons resultats, tant en el model animal com en humans, com ara els estudis de Fornai *et al.*, 2008c.

Cada vegada es veu més l'autofàgia com un fenomen important a tenir en compte en la ELA. S'ha comprovat que la pèrdua de la capacitat per produir fenomens autofàgics en el sistema nerviós central causa neurodegeneració en el ratolí (Komatsu *et al.*, 2006). A part dels estudis fets amb el ratolí SOD1^{G93A}, un altre model animal d'ELA familiar caracteritzat per mutacions en la dineïna (Hafezparast *et al.*, 2003) té també deficiències en processos autofàgics. Se sap que la dineïna juga un paper clau en el pas dels autofagosomes al lisosoma per tal de poder així eliminar els agregats proteics (Rubinsztein *et al.*, 2005). D'aquesta manera, mutacions en el gen de la dineïna reduirien els fenomens autofàgics i també l'eliminació d'agregats.

Activant farmacològicament l'autofàgia es redueix els nivells de formes solubles i agregats de la huntingtina mutada, proteïnes mutades en l'atàxia espinocerebel·lar, formes mutades de α -sinucleïna i de tau mutada (Rubinsztein *et al.*, 2007).

El mecanisme molecular pel qual el liti activa l'autofàgia de moment no es coneix. S'ha demostrat que l'autofàgia induïda per liti depèn estrictament de la inhibició de la inositol monofosfatasa, que finalment resulta en una reducció dels nivells cel·lulars de l'inositol-1, 4, 5-trifosfat (IP3) (Sarkar *et al.*, 2005). IP3 i l'estimulació del seu receptor, IP3R, s'ha vist que redueixen l'autofàgia (Criollo *et al.*, 2007). Així, l'eliminació de IP3 elimina la inhibició i permet la resposta autofàgica davant d'estrès cel·lular com el que provoquen els agregats intracel·lulars proteics.

La proteïna LC3 (Microtubule Associated Light Chain 1) és utilitzada normalment com a marcador d'autofàgia en mamífers. La forma LC3-I d'aquesta proteïna és constitutiva en les cèl·lules, però la forma LC3-II, que prové de la lipidació de LC3-I, s'utilitza com a marcador, ja que aquesta modificació és necessària per la formació de l'autofagosoma (Tanida *et al.*, 2004).

Els nostres resultats suggereixen que el tractament amb liti de les cèl·lules NSC-34 transfectades amb SOD1 mutada fa augmentar els fenomens autofàgics en aquestes cèl·lules per tal d'eliminar la presència d'agregats proteics, cosa que es dedueix, amb mètodes proteòmics, de l'augment de banda corresponent a LC3-II. Amb tècniques microscòpia electrònica, que permeten veure la ultraestructura de les cèl·lules NSC-34 transfectades, també s'ha pogut constatar un augment del nombre d'autofagosomes després del tractament amb liti.

Els agregats intracitoplasmàtics immunoreactius a SOD1 són característics en MN, astròcits i oligodendròcits del ratolí transgènic per la ELA (Brujin *et al.*, 1998, Stieber *et al.*, 2000). Precedint aquestes inclusions possiblement es troben oligòmers de SOD1 concentrats en medul·la espinal en animals pre-simptomàtics (Johnston *et al.*, 2000). Si ens basem en l'evidència del model de línia cel·lular

NSC-34 i l'efecte del liti, aquest punt hauria de tenir-se en compte per futures investigacions en la teràpia de la ELA.

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

Primera. Les IgGs de sèrums patològics no tenen cap efecte neurotòxic detectable per les MN espinals d'embrió de pollastre. Contràriament, produeixen una inhibició de la PCD d'aquesta població neuronal.

Segona. Les IgGs de sèrums patològics indueixen creixement i ramificació axonal en els nervis intramusculars en desenvolupament.

Tercera. Les IgGs de sèrums patològics reconeixen selectivament proteïnes del sistema nerviós i muscular de l'embrió de pollastre.

Quarta. Els sèrums de persones malaltes amb ELA i LMD contenen IgGs que reconeixen específicament proteïnes de la família de les semaforines.

Cinquena. Les neurones degenerants o bé les mortes en la rata mSOD^{G93A} són específicament reconegudes per un anticòs contra el receptor purinèrgic P2X₄.

Sisena. Les neurones degenerants amb alta immunoreactivitat per P2X₄ no mostren característiques apoptòtiques. Aquestes cèl·lules moren quan són envoltades i englobades per cèl·lules microgials.

Setena. L'ús de l'anticòs anti P2X₄ fa possible demostrar addicionalment la degeneració neuronal en les cèl·lules piramidals del còrtex motor en animals mSOD^{G93A}. També identifica poblacions neuronals, no prèviament reconegudes com a afectades en el model, com cèl·lules de Purkinje cerebel·lars, neurones serotoninèrgiques en els nuclis del rafe i neurones noradrenèrgiques en el locus coeruleus.

Vuitena. L'anticòs anti P2X₄ és capaç de reconèixer epítops que són exposats en espècies particulars, malplegades, de la proteïna SOD1, presents en MN degenerants però no en l'astròglia.

Novena. La injecció de confòrmers de SOD^{G93A} reconeguts per l'anticòs anti P2X₄ indueix activació microglial i astròglial en ratolins WT.

Desena. Els agregats de SOD1 mutada formats per la transfecció in vitro en cèl·lules NSC-34 no presenten immunoreactivitat a P2X₄.

Onzena. El liti és capaç de disminuir el nombre d'agregats de SOD1 presents en cèl·lules transfectades NSC-34. Aquesta SOD1 és secretada al medi.

Dotzena. El liti és capaç de promoure l'autofàgia en cèl·lules transfectades NSC-34.

6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Abbracchio, M. P. and Burnstock, G. (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64, 445 – 475.

Abbracchio, M. P. and Burnstock, G. (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn. J. Pharmacol.* 78, 113 – 145.

Adams RH, Lohrum M, Klostermann A, Betz H, Püschel AW. (1997) The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J.* 15; 16(20):6077-86.

Akbar, M. T. *et al.* (1997) Expression of glial glutamate transporters GLT1 and GLAST is unchanged in the hippocampus in fullykindled rats. *Neuroscience* 78:351–359.

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.* 36:846-58.

ALS CNTF Treatment Study Group. (1996) A double-blind placebo controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 46, 1244–1249.

Andersen, P. M, Forsgren L, Binzer M, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keränen ML, Bergmark L, Saarinen A, Haltia T, Tarvainen I, Kinnunen E, Udd B, Marklund SL. (1996) Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain* 119, 1153–1172.

Andersen, P. M. Nilsson P, Ala-Hurula V, Keränen ML, Tarvainen I, Haltia T, Nilsson L, Binzer M, Forsgren L, Marklund SL. (1995) Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide

dismutase. *Nature Genet.* 10, 61–66.

Andries M, Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L. (2007) Ivermectin inhibits AMPA receptor-mediated excitotoxicity in cultured motor neurons and extends the life span of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 25:8–16.

Andrus, PK, T.J. Fleck, M.E. Gurney, E.D. Hall, (1998) Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurochem.* 71:2041–2048.

Angelov DN, Waibel S, Guntinas-Lichius O, Lenzen M, Neiss WF, Tomov TL, Yoles E, Kipnis J, Schori H, Reuter A, Ludolph A, Schwartz M. (2003) Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;100(8):4790-5.

Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y, Nagahiro Y, Shimizu K, Umegae N, Hayase N, Shiono H, Kobayashi S. (2000) Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Ann. Neurol.* 47 524–527.

Aston-Jones G, Shipley MT, Grzanna R. (1995) The locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system.* New York: Academic Press. p 197–201.

Atkinson L, Shigetomi E, Kato F, Deuchars J. (2003) Differential increases in P2X receptor levels in rat vagal efferent neurones following a vagal nerve section. *Brain Res* 977:112–118.

Avidan H, Kipnis J, Butovsky O, Caspi RR, Schwartz M. (2004) Vaccination with autoantigen protects against aggregated beta-amyloid and glutamate toxicity by controlling microglia: effect of CD4+CD25+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 34(12):3434-45.

Azzouz M, Leclerc N, Gurney M, Warter JM, Poindron P, Borg J. (1997) Progressive motor neuron impairment in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 20(1):45-51.

Azzouz M, Ralph G.S, Storkebaum E, Walmsley L.E, Mitrophanous K.A, Kingsman S.M, Carmeliet P, Mazarakis N.D. (2004) VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429:413–417.

Bajaj NP. (2000) Cyclin-dependent kinase-5 (CDK5) and amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 1(5):319-27.

Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg G.W. (1993) Cytotoxicity of microglia, *Glia* 7:111.

Basso M., Massignan T., Samengo G., Cheroni C., De Biasi S., Salmona M., Bendotti C., Bonetto V. (2006) Insoluble mutant SOD1 is partly oligoubiquitinated in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J. Biol. Chem.* 281, 33325-33335.

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 (2):213-25.

Batulan, Z, G.A. Shinder, S. Minotti, B.P. He, M.M. Doroudchi, J. Nalbantoglu, M.J. Strong, H.D. Durham. (2003) High threshold for induction of the stress response in motor neurons is associated with failure to activate HSF1, *J. Neurosci.* 23:5789–5798.

Baurle J, Kranda K, Frischmuth S. (2006) On the variety of cell death pathways in the Lurcher mutant mouse. *Acta Neuropathol Berlin* 112:691–702.

BDNF Study Group (1999). A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* 52, 1427–1433.

Beal, MF Ferrante R.J, Browne S.E, Matthews R.T, Kowall N.W, Brown R.H. Jr, (1997) Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis, *Ann. Neurol.* 42:644–654.

Beal, MF. (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease, *Free Radical*

Biol. Med. 32:797–803.

Beaulieu J.M, Julien J.P, (2003) Peripherin-mediated death of motor neurons rescued by overexpression of neurofilament NF-H proteins, *J. Neurochem.* 85:248–256.

Beaulieu JM, Nguyen M.D, Julien J.P, (1999) Late onset death of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin, *J. Cell Biol.* 147:531–544.

Beckman J.S., Carson M, Smith C.D, Koppenol W.H. (1993) ALS, SOD and peroxyxynitrite, *Nature* 364 -584.

Beers D.R., Henkel J.S., Zhao W., Wang J., Appel S.H.(2008) CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 15558-15563.

Beers, D.R, Henkel, J.S, 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. USA*, 103, 16021–16026.

Belli S, Vanacore N. (2005) Proportionate mortality of Italian soccer players: is amyotrophic lateral sclerosis an occupational disease? *Eur. J. Epidemiol.* 20(3):237-42.

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(1-2):111-5.

Bensimon, G, Lacomblez, L, Meininger, V. (1994) A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med.* 3; 330(9):585-91.

Boillée S, Vande Velde C, Cleveland DW. (2006a) 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. (2006b) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, 312, 1389–1392.

Borasio, G.D, Robberecht, W, Leigh, P.N, Emile, J, Guilloff, R.J, Jerusalem, F, Silani, V, Vos, P.E, Wokke, J.H, and Dobbins, T. (1998) A Placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I study group. *Neurology* 51:583–586.

Bowling, A.C, Schulz, J.B, Brown, R.H. and Beal, M.F. (1993) Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.*, 61: 2322-2325.

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(4):383-4.

Bruening W, Roy J, Giasson B, Figlewicz D.A, Mushynski W.E, Durham H.D (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.

Bruijn L, Becher M, Lee M, Anderson K, Jenkins N, Copeland N, Sisodia S, Rothstein J, Borchelt D, Price D, Cleveland D (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusion. *Neuron* 18:327-338.

Bruijn L.I., Houseweart M.K, Kato S, Anderson K.L, Anderson S.D, Ohama E, Reaume A.G, Scott R.W, Cleveland D.W (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1, *Science* 281:1851–1854.

Burnstock G. (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659–797.

Burnstock, G. (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509 – 581.

- Burnstock, G. (1976) Purinergic receptors. *J. Theor. Biol.* 62, 491 – 503.
- Burnstock, G. and Kennedy, C. (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 16, 433 – 440.
- Burnstock, G. and Knight, G. E. (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240, 31 – 304.
- Cai H, Lin X, Xie C, Laird F.M, Lai C, Wen H, Chiang H.C, Shim H, Farah M.H, Hoke A, Price D.L, Wong PC. (2005) Loss of ALS2 function is insufficient to trigger motor neuron degeneration in knockout mice but predisposes neurons to oxidative stress. *J Neurosci* 25: 7567–7574.
- Calderó J, Brunet N, Ciutat D, Hereu M, Esquerda JE (2009) Development of microglia in the chick embryo spinal cord: implications in the regulation of MNI survival and death. *J Neurosci Res.* 15; 87(11):2447-66.
- Calderó J, Prevette D, Mei X, Oakley RA, Li L, Milligan C, Houenou L, Burek M, Oppenheim RW. (1998) Peripheral target regulation of the development and survival of spinal sensory and motoneurons in the chick embryo. *J Neurosci.* 1; 18(1):356-70.
- Calderó J, Tarabal O, Casanovas A, Ciutat D, Casas C, Lladó J, Esquerda JE. (2007) Excitotoxic motoneuron disease in chick embryo evolves with autophagic neurodegeneration and deregulation of neuromuscular innervation. *J Neurosci Res.* 85 (12):2726-40.
- Carriedo SG, Sensi S.L, Yin H.Z, Weiss J.H. (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 (8):848-53.
- Casanovas A, Hernández S, Tarabal O, Rosselló J, Esquerda JE. (2008). Strong P2X4 purinergic receptor-like immunoreactivity is selectively associated with degenerating neurons in transgenic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis.

J Comp Neurol. 1;506(1):75-92.

Catalano SM, Messersmith EK, Goodman CS, Shatz CJ, Chedotal A. (1998) Many major CNS axon projections develop normally in the absence of semaphorin III. *Mol Cell Neurosci* 11:173–182.

Cavaliere F, Florenzano F, Amadio S, Fusco FR, Viscomi MT, D'Ambrosi N, Vacca F, Sancesario G, Bernardi G, Molinari M, Volonte C. (2003) Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience* 120:85–98.

Charcot JM, Joffroy A. (1869) Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance gris et des fascieaux antero-lateraux de la moelle epineire. *Arch Phisiol Neurol Pathol* 2:744.

Chedotal A, Del RJ, Ruiz M, He Z, Borrell V, deCastro F, Ezan F, Goodman CS, Tessier LM, Sotelo C, Soriano E. (1998) Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* 125:4313– 4323.

Chen D, Shen L, Wang L, Lu A, Zhang H, Zhang X, Zhang Y, Shui W, Li L, Fan D, Zhang J. (2007) Association of polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene with the age of onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 8(3):144-9.

Chen H, He Z, Bagri A, Tessier LM. (1998) Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* 21:1283–1290.

Cheng HJ, Bagri A, Yaron A, Stein E, Pleasure SJ, Tessier-Lavigne M. (2001) Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron.* 25; 32(2):249-63.

Chi, L., Ke, Y., Luo, C., Li, B., Gozal, D., Kalyanaraman, B., and Liu, R. (2006) Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration, and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells* 24, 34–43.

Chiu AY, Zhai P, Dal Canto MC, Peters TM, Kwon YW, Prattis SM, Gurney ME (1995)

Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci.* 6(4):349-62.

Chiu I.M., Chen A., Zheng Y., Kosaras B., Tsiftoglou S.A., Vartanian T.K., Brown R.H Jr., Carroll M.C. (2008) T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 17913-17918.

Cibelli J. (2007) Development. Is therapeutic cloning dead? *Science.* 21; 318(5858):1879-80.

Clarke PG, Oppenheim RW. (1995) Neuron death in vertebrate development: in vitro methods. *Methods Cell Biol.* 46:277-321.

Clement AM, Nguyen M.D, Roberts E.A, Garcia M.L, Boillee S, Rule M, McMahon A.P, Doucette W, Siwek D, Ferrante R.J, Brown R.H. Jr., Julien J.P, Goldstein L.S, Cleveland D.W, (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(11):806-19

Cohen S, Levi-Montalcini R. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. (1956). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 42(9):571-4.

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(2):103-7.

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 (2-3):135-45.

Corti S, Locatelli F, Donadoni C, Guglieri M, Papadimitriou D, Strazzer S, Del B R, & Comi GP. (2004) Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain,* 127:2518–2532.

Cote F, Collard JF, Julien JP (1993) Progressive neuronopathy in transgenic mice

expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, *Cell* 73: 35–46.

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.* 5;154(2):137-45.

Coyle, JP, Puttfarcken P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders, *Science* 262:689–695.

Criollo A, Vicencio JM, Tasdemir E, Maiuri MC, Lavandero S, Kroemer G. (2007) The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy* 3:350-3.

Cudkowicz ME, Shefner JM, Schoenfeld DA, Zhang H, Andreasson KI, Rothstein JD, and Drachman DB. (2006) Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 60, 22–31.

De Winter F, Vo T, Stam FJ, Wisman LA, Bär 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.* May-Jun; 32(1-2):102-17.

Deng H X, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP. (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047–1051.

Deshpande DM, Kim YS, Martinez T, Carmen J, Dike S, Shats I, Rubin LL, Drummond J, Krishnan C, Hoke A, Maragakis N, Shefner J, Rothstein JD. & Kerr DA. (2006) Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann. Neurol.* 60, 32–44.

Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science.* 29; 321(5893):1218-21.

Doctor RB, Matzakos T, McWilliams R, Johnson S, Feranchak AP, Fitz JG. (2005) Purinergic regulation of cholangiocyte secretion: identification of a novel role for P2X receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:779–786.

Drachman DB, Chaudhry V, Cornblath D, Kuncl RW, Pestronk A, Clawson L, Mellits ED, Quaskey S, Quinn T, Calkins A. (1994) Trial of immunosuppression in amyotrophic lateral sclerosis using total lymphoid irradiation. *Ann Neurol*. 35(2):142-50.

Drachman DB, Fishman PS, Rothstein JD, Motomura M, Lang B, Vincent A, Mellits ED. (1995) Amyotrophic lateral sclerosis. An autoimmune disease? *Adv Neurol*. 68:59-65.

Drachman DB, Frank K, Dykes-Hoberg M, Teismann P, Almer G, Przedborski S, Rothstein J.D. (2002) Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS, *Ann. Neurol*. 52:771–778.

Drachman DB, Kuncl RW. (1989) Amyotrophic lateral sclerosis: an unconventional autoimmune disease? *Ann Neurol*;26(2):269-74.

Dupuis L, de Tapia M, Rene F, Lutz-Bucher B, Gordon JW, Mercken L, Pradier L, Loeffler JP. (2000) Differential screening of mutated SOD1 transgenic mice reveals early up-regulation of a fast axonal transport component in spinal cord motor neurons. *Neurobiol Dis* 7:274–285.

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*. 56:52–56.

Dusart I, Guenet JL, Sotelo C. (2006) Purkinje cell death: differences between developmental cell death and neurodegenerative death in mutant mice. *Cerebellum* 5:163–173.

Eckhardt F, Behar O, Calautti E, Yonezawa K, Nishimoto I, Fishman MC. (1997) A novel transmembrane semaphorin can bind c-src. *Mol Cell Neurosci*. 9(5-6):409-19.

Elder GA, Friedrich V.L, Kang C. Jr., Bosco P, Gourov A, Tu P.H, Zhang B, Lee V.M, Lazzarini R.A. (1998) Requirement of heavy neurofilament subunit in the

development of axons with large calibers, *J. Cell Biol.* 143: 195–205.

Elder GA, Friedrich V.L, Margita A Jr., Lazzarini R.A. (1999) Age-related atrophy of motor axons in mice deficient in the mid-sized neurofilament subunit, *J. Cell Biol.* 146:181–192.

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(3):185-99.

Engelhardt JI, Siklos L, Komuves L, Smith RG, Appel SH. (1997).Altered calcium homeostasis and ultrastructure in motoneurons of mice caused by passively transferred anti-MNI IgG. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56(1):21-39.

Engelhardt JI, Soós J, Obál I, Vigh L, Siklós L. (2005) Subcellular localization of IgG from the sera of ALS patients in the nervous system. *Acta Neurol Scand.* 112(2):126-33.

Engelhardt, J.I., and Appel, S.H. (1990). IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 47, 1210–1216.

Ezzi SA, Urushitani M, Julien JP. 2007. Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J Neurochem.* 102(1):170-8.

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(5):2064-74.

Fields RD, Burnstock G. (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7:423–436.

Fischer L.R, Culver D.G, Tennant P, Davis A.A, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak M.A, Glass J.D. (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man, *Exp. Neurol.* 185:232–240.

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.

Flannery E, Duman-Scheel M. (2009) Semaphorins at the interface of development and cancer. *Curr Drug Targets*. Jul; 10(7):611-9.

Fornai F, Longone P, Cafaro L, Katsiuchenka 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. (2008c) Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12; 105(6):2052-7.

Fornai F, Longone P, Ferrucci M, Lenzi P, Isidoro C, Ruggieri S, Paparelli A. (2008b). Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: The multiple roles of lithium. *Autophagy*. 4(4):527-30.

Fornai F, Siciliano G, Manca ML, Murri L, Paparelli A, Ruggieri S. (2008a) Lithium in ALS: from the bench to the bedside. *Amyotroph Lateral Scler*. 9(2):123-4.

Franke H, Illes P. (2006) Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther* 109:297–324.

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(4):388-94.

Gallardo E, Rojas-García R, Belvís R, Serrano-Munuera C, Ortiz E, Ortiz N, Grau J, Illa I. (2001) Antiganglioside antibodies: when, which and for what. *Neurologia*. 16(7):293-7.

Gao J, Coggeshall RE, Tarasenko YI & Wu P. (2005) Human neural stem cell-derived cholinergic neurons innervates muscle in motoneuron deficient adult rats. *Neuroscience*, 131, 257–262.

Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, Hudson JE, Chen N, Davis CD, and Sanberg PR. (2003) Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 12, 255–270.

Gever J, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock, G. and Ford AP. (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 452, 513 – 537.

Gifondorwa DJ, Robinson MB, Hayes CD, Taylor AR, Prevetie 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.* 28; 27(48):13173-80.

Gilad GM, Gilad VH. (2007) Astroglia growth retardation and increased microglia proliferation by lithium and ornithine decarboxylase inhibitor in rat cerebellar cultures: Cytotoxicity by combined lithium and polyamine inhibition. *J Neurosci Res* 85:594-601.

Gill A, Kidd J, Vieira F, Thompson K, Perrin S. (2009) No benefit from chronic lithium dosing in a sibling-matched, gender balanced, investigator-blinded trial using a standard mouse model of familial ALS. *PLoS One.* Aug 3;4(8):e6489.

Goldknopf IL, Sheta EA, Bryson J, Folsom B, Wilson C, Duty J, Yen AA, and 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.

Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW. (2006) Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci.* 23; 26(34):8774-86.

Gowing G., Philips T., Van Wijmeersch B., Audet J.N., Dewil M., Van Den Bosch L., Billiau A.D., Robberecht W., Julien J.P. (2008) Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *J. Neurosci.* 28, 10234-10244.

Greenway, M.J., Andersen, P.M., Russ, C., Ennis, S., Cashman, S., Donaghy, C., Patterson, V., Swingler, R., Kieran, D., Prehn, J., et al. (2006). ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* 38, 411-413.

Groeneveld GJ, Veldink JH, van der Tweel I, Kalmijn S, Beijer C, de Visser M, Wokke JH, Franssen H, van den Berg LH. (2003). A randomized sequential trial of creatine in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 53(4):437-45.

Gros-Louis F, Kriz J, Kabashi E, McDearmid J, Millecamps S, Urushitani M, Lin L, Dion P, Zhu Q, Drapeau P, Julien JP, Rouleau GA. (2008) Als2 mRNA splicing variants detected in KO mice rescue severe motor dysfunction phenotype in Als2 knock down zebrafish. *Hum Mol Genet.* 17(17):2691-702.

Gros-Louis F, Laurent S, Lopes AA, Khoris J, Meininger V, Camu W, and Rouleau GA. (2003) Absence of mutations in the hypoxia response element of VEGF in ALS. *Muscle Nerve* 28, 774-775.

Gros-Louis F, R. Lariviere, G. Gowing, S. Laurent, W. Camu, J.-P. Bouchard, V. Meininger, G.A. Rouleau, J.-P. Julien, (2004) A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis, *J. Biol. Chem.* 279:45951-45956.

Guegan C, Przedborski S.(2003). Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest* 111:153-161.

Guillot S, Azzouz M, Deglon N, Zurn A, Aebischer P. (2004) Local GDNF expression mediated by lentiviral vector protects facial nerve motoneurons but not spinal

motoneurons in SOD1G93A transgenic mice. *Neurobiol Dis* 16:139–49.

Guo LH, Schluesener HJ. (2005) Lesional accumulation of P2X(4) receptor(+) macrophages in rat CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* 134:199–205.

Guo LH, Trautmann K, Schluesener HJ. (2005) Expression of P2X4 receptor by lesional activated microglia during formalin-induced inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 163:120–127.

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, Caliando 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.* 17; 264(5166):1772-5.

Gurney ME. 1997. The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *J Neurol Sci.*152 Suppl 1:S67-73.

Gurney, ME, Fleck TJ, Himes CS, Hall ED. (1998) Riluzole preserves motor function in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis, *Neurology* 50:62–66.

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; 15(2):233-50.

Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH Jr, Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR, Ikeda JE. (2001) A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet.* 29(2):166-73.

Haenggeli C, Julien JP, Mosley RL, Perez N, Dhar A, Gendelman HE, Rothstein JD. (2007) Therapeutic immunization with a glatiramer acetate derivative does not alter survival in G93A and G37R SOD1 mouse models of familial ALS. *Neurobiol Dis.* 26(1):146-52.

Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annur A, S. Bowen, G. Lalli, A.S. Witherden, H. Hummerich, S. Nicholson, P.J. Morgan, R. Oozageer, J.V. Priestley, S. Averill, V.R. King, S. Ball, J. Peters, T. Toda, A. Yamamoto, Y. Hiraoka, M. Augustin, D. Korthaus, S. Wattler, P. Wabnitz, C. Dickneite, S. Lampel, F. Boehme, G. Peraus, A. Popp, M. Rudelius, J. Schlegel, H. Fuchs, M. Hrabe de Angelis, G. Schiavo, D.T. Shima, A.P. Russ, G. Stumm, J.E. Martin, E.M. Fisher, (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300:808–812.

Haggstrom B, Andersen PM, Hjalmarsson K, Binzer M, Forsgren L (1997) Autoimmunity and ALS: studies on antibodies to acetylcholinesterase in sera. *Acta Neurol Scand.* 95(2):111-4.

Haley. 2003. Excess incidence of ALS in young Gulf War veterans *Neurology.* 61: 750-756.

Hall ED, Oostveen JA, and Gurney ME. (1998). Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23, 249–256.

Hamburger V, Hamilton HL. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49–92.

He Z, Tessier-Lavigne M. (1997) Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90:739– 751.

Henkel JS, Beers DR, Siklos L, and Appel SH. (2006) The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Mol. Cell Neurosci.* 31,427–437.

Henkel JS, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, and Appel SH. (2004) Presence of dendritic cells, MCP-1, and

activated microglia/ microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann. Neurol.* 55, 221–235.

Hetz C, Thielen P, Matus S, Nassif M, Court F, Kiffin R, Martinez G, Cuervo AM, Brown RH, Glimcher LH. (2009) XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* 2009 Oct 1;23(19):2294-306. Epub 2009 Sep 17.

Hirano A, Kurland LT, Sayre G.P. 1967. Familial amyotrophic lateral sclerosis. A subgroup characterized by posterior and spinocerebellar tract involvement and hyaline inclusions in the anterior horn cells. *Arch Neurol* 16:232–243.

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.* 5; 99(3):1604-9.

Huang H, Zhang C, Zhao CP, Yao XL, Xi J. (2006) Effect of transplantation of wild-type bone marrow stem cells in mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 28(4):562-6.

Hudson AJ. (1981) Amyotrophic lateral sclerosis and its association with dementia, parkinsonism and other neurological disorders: a review. *Brain* 104:217–247.

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, Jové M, Dalfo E, Cacabelos D, Povedano M, Bellmunt MJ, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otín M (2007). Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 130(Pt 12):3111-23.

Ishihara T, Higuchi M, Zhang B, Yoshiyama Y, Hong M, Trojanowski JQ, Lee VM, (2001). Attenuated neurodegenerative disease phenotype in tau transgenic mouse lacking neurofilaments, *J. Neurosci.* 21: 6026–6035.

Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee M.K, Trojanowski JQ, Lee VM. (1999) Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform, *Neuron* 24:751–762.

Iwanaga K, Wakabayashi K, Homma Y, Takahashi H. (1997) Amyotrophic lateral sclerosis: occurrence of Bunina bodies in the locus ceruleus pigmented neurons. *Clin Neuropathol* 16:23–26.

Jackson M, Lladó J, Rothstein JD (2002) Therapeutic developments in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002 Oct; 11(10):1343-64.

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. USA,* 97, 12571–12576.

Jonsson P.A., Ernhill K., Andersen P.M., Bergemalm D., Brännström T., Gredal O., Nilsson P., Marklund SL. (2004) Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 127(Pt 1), 73-88.

Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Lindberg M, Oliveberg M, Marklund S. (2005) Disulphide-reduced superoxide dismutase-1 in CNS of transgenic amyotrophic lateral sclerosis models, *Brain* (on line).

Julien J.P., Gros-Louis F., Bosco D., Brwn R. (2008) Immunization approaches to therapy for ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 9 (Suppl. 1), 56.

Julien JP, Kriz J (2006) Transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1762(11-12):1013-24.

Julien JP. (1995) A role for neurofilaments in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Cell Biol.* 73 (9-10):593-7.

Julien JP. (1997) Neurofilaments and motor neuron disease. *Trends Cell Biol.* 1997 Jun;7(6):243-9.

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.* 30;279(18):19247-56.

Kasarkis, E. J. *et al.* (1999) A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* 52:1427–1433.

Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH. (2003) Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science.* 8; 301(5634):839-42.

Kassa RM, Bentivoglio M, Mariotti R. (2007) Changes in the expression of P2X1 and P2X2 purinergic receptors in facial motoneurons after nerve lesions in rodents and correlation with motoneuron degeneration. *Neurobiol Dis* 25:121–133.

Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, Tsuji S, and 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, and McGeer PL. (1992) Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am. J. Pathol.* 140, 691–707.

Kelemen J, Hedlund W, Orlin JB, Berkman EM, Munsat TL. (1983) Plasmapheresis with immunosuppression in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 40(12):752-3.

Khakh B. and North A. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature.* 3;442(7102):527-32. Review

Kieran D, Kalmar B, Dick JR, Riddoch-Contreras J, Burnstock G, Greensmith L (2004) Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat Med.* 10(4):402-5.

Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen IR. & Schwartz M. (2000) T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7446–7451.

Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT, Bogdanov MB, Klein AM, Andreassen OA, Meuller G, Wermer M, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. (1999) Neuroprotective effects of creatin in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis, *Nat. Med.* 5:347–350.

Koerner DR. (1952). Amyotrophic Lateral Sclerosis on Guam. A clinical Study and review of the literature. *Ann Intern Med* 37:1204-20.

Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. (1993) The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell.* 31; 75(7):1389-99.

Kolodkin AL. (1996) Semaphorins: mediators of repulsive growth cone guidance. *Trends Cell Biol.* 6(1):15-22.

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 15; 441(7095):880-4.

Kong J, Xu Z. (1999). Peripheral axotomy slows motoneuron degeneration in a transgenic mouse line expressing mutant SOD1 G93A. *J Comp Neurol.* 20; 412(2):373-80.

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.

Koppel AM, Raper JA. (1998) Collapsin-1 covalently dimerizes, and dimerization is necessary for collapsing activity. *J Biol Chem* 273:15708 –15713.

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

Kriz J, Gowing G, Julien JP. (2003) Efficient three-drug cocktail for disease induced by mutant superoxide dismutase, *Ann.Neurol.* 53:429–436.

Kriz J, Meier J, Julien JP, Padjé AL. (2000) Altered ionic conductances in axons of transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene, *Exp. Neurol.* 163:414–421.

Kriz J, Nguyen MD. & Julien JP. (2002) Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 10(3):268-78.

Kriz J, Zhu Q, Julien JP, Padjen AL. (2000) Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H, *Brain Res.* 885:32–44.

Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki K, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Hadano S, and 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 pp. 38626–38635.

Kurtzke JF. (1991) Risk factors in amyotrophic lateral sclerosis. *Adv. Neurol.* 56:245–270.

Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P. & Meininger, V. (1996) Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 347, 1425–1431.

Lamb NL, Patten BM. (1991) Clinical correlations of anti-GM1 antibodies in amyotrophic lateral sclerosis and neuropathies. *Muscle Nerve.* 14(10):1021-7.

Lambrechts D, Carmeliet P. (2006) VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease. *Biochim Biophys Acta.* 1762(11-12):1109-21.

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 K.E, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen P.M, 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.

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, et al. (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 EK. (2002) Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration, *Neuron* 34:715–727.

Larivière R, Beaulieu JM, Nguyen MD, Julien JP. (2003) Peripherin is not a contributing factor to motor neuron disease in a mouse model of ALS caused by mutant superoxide dismutase, *Neurobiol. Dis.* 13: 158–166.

Larivière R, Nguyen MD, Ribeiro-da-Silva A, Julien JP. (2003). Reduced number of unmyelinated sensory axons in peripherin null mice, *J. Neurochem.* 81:525–532.

Lee, MK, Marszalek, D.W. Cleveland, (1994) A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: implications for the pathogenesis of human motor neuron disease, *Neuron* 13: 975–988.

Lemmon MA, Schlessinger J. (1994) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci* 19:459–463.

Lenaz, G. (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and ageing, *Biochim. Biophys. Acta* 1366:53–67.

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

Levine, B, Kroemer, G. (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 11; 132 (1):27-42.

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(2):220-5.

Li M, Ona VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM. (2000) Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model, *Science* 288:335–339.

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*. 8; 43(1):5-17.

Liu RH, Fung SJ, Reddy VK, Barnes CD. (1995) Localization of glutamatergic neurons in the dorsolateral pontine tegmentum projecting to the spinal cord of the cat with a proposed role of glutamate on lumbar motoneuron activity. *Neuroscience* 64:193–208.

Lladó J, Calderó J, Ribera J, Tarabal O, Oppenheim RW, Esquerda JE. (1999) Opposing effects of excitatory amino acids on chick embryo spinal cord motoneurons: excitotoxic degeneration or prevention of programmed cell death. *J Neurosci*. 15; 19(24):10803-12.

Llado J, Haenggeli C, Maragakis NJ, Snyder EY, Rothstein JD (2004). Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci*. 27(3):322-31.

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.

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.

Ma, W. et al. (2006). Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor channel in airway ciliated cells. *J. Physiol. (Lond.)* 571:503-517.

Maatkamp A, Vlug A, Haasdijk E, Troost D, French PJ, Jaarsma D. (2004) Decrease of Hsp25 protein expression precedes degeneration of motoneurons in ALS-SOD1 mice. *Eur J Neurosci* 20:14–28.

Machida Y, Tsuchiya K, Anno M, Haga C, Ito T, Shimo Y, Wakeshima T, Iritani S, Ikeda K. (1999) Sporadic amyotrophic lateral sclerosis with multiple system degeneration: a report of an autopsy case without respirator administration. *Acta Neuropathol Berlin* 98:512–515.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A and Kroemer G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 741–752.

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.* 30; 170(1-2):115-21.

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.

Martin, J.E., Swash, M., 1995. The pathology of motor neuron disease. In: Leigh, P.N., Swash, M. (Eds), *Motor Neuron Disease*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 92-118.

Martinez-Vicente M, and Cuervo AM. (2007) Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* 6, 352–361.

Martin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, and Mallat M. (2004) Microglia promotes the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41, 535–547.

Mathew R, Karantza-Wadsworth V, and White E. (2007) Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 961–967.

Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H. (2006) Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res.* 83(1):119-33.

McGeer PL, McGeer EG, Kawamata T, Yamada T and Akiyama H. (1991) Reactions of the immune system in chronic degenerative neurological diseases. *Can. J. Neurol. Sci.* 18, 376–379.

Meier J, Couillard-Després S, Julien JP. (1999) Extra neurofilament NF-L proteins rescue motor neuron disease caused by overexpression of human NF-H in mice, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58:1099–1110.

Migheli A, Atzori C, Piva R, Tortarolo M, Girelli M, Schiffer D, Bendotti C. (1999). Lack of apoptosis in mice with ALS. *Nat Med* 5:966–967.

Miller TM, Smith RA, Cleveland DW. (2006) Amyotrophic lateral sclerosis and gene therapy. *Nat Clin Pract Neurol.* 2(9):462-3.

Mir M, Asensio VJ, Tolosa L, Gou-Fabregas M, Soler RM, Lladó J, Olmos G. (2009) Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma cooperatively induce oxidative stress and motoneuron death in rat spinal cord embryonic explants. *Neuroscience.* 2009 Sep 15; 162(4):959-71.

Mizushima N, Klionsky DJ. (2007) Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr.* 27:19-40.

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(3):277-80.

Moalem, G. et al. (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* 5, 49–55.

Moisse K, Strong MJ. (2006) Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:1083–1093.

Mondola P, Annella T, Seru R, Santangelo F, Iossa S, Gioielli A, Santillo M. (1998) Secretion and increase of intracellular CuZn superoxide dismutase content in human neuroblastoma SK-N-BE cells subjected to oxidative stress. *Brain Res Bull* 45:517–520.

Moreau C, Devos D, Brunaud-Danel V, Defebvre L, Perez T. (2006) Paradoxical response of VEGF expression to hypoxia in CSF of patients with ALS, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77:255–257.

Mourelatos Z, Gonatas NK, Stieber A, Gurney ME, Dal Canto MC. (1996) The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu, Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5472–5477.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201–211.

Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH, Itoyama Y. (2001) Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci.* 1; 21(23):9246-54.

Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci*; 10:615-22.

Nagano I, Ilieva H, Shiote M, Murakami T, Yokoyama M, Shoji M, Abe K (2005) Therapeutic benefit of intrathecal injection of insulin-like growth factor-1 in a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci.* 15;235(1-2):61-8.

Nagata Y, Fujita K, Yamauchi M, Kato T, Ando M, Honda M. (1998) Neurochemical changes in the spinal cord in degenerative motor neuron diseases. *Mol Chem Neuropathol.* 33(3):237-47.

Nakamura F, Kalb RG, Strittmatter SM. (2000) Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol.* 44(2):219- 29.

Nasu-Tada K, Koizumi S, Tsuda M, Kunifusa E, Inoue K. (2006) Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X₄, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia* 53:769–775.

Nayak MS, Kim YS, Goldman M, Keirstead HS, Kerr DA (2006). Cellular therapies in motor neuron diseases. *Biochim Biophys. Acta.* 1762(11-12):1128-38.

Nguyen MD, Boudreau M, Kriz J, Couillard-Despres S, Kaplan DR, Julien, JP. (2003) Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1, *J. Neurosci.* 23: 2131–2140.

Nguyen MD, D'Aigle T, Gowing G, Julien JP. and Rivest, S. (2004). Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 24, 1340–1349.

Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. (2001) Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: no requirement for proapoptotic interleukin-1beta in neurodegeneration, *Ann. Neurol.* 50: 630–639.

Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E. and Schmalzing G. (1998) P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17, 3016 – 3028.

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(4):238-43.

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.(2004b) A mutation in the

vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* 75(5):822-31.

Nishimura AL., Mitne-Neto M, Silva HC, Oliveira JR, Vainzof M, and Zatz M. (2004a). A novel locus for late onset amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease variant at 20q13. *J. Med.Genet.* 41, 315–320.

North RA. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013 – 1067.

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(4):1100-3.

Okuyama Y, Mizuno T, Inoue H, Kimoto K. (1997) Amyotrophic lateral sclerosis with anti-acetylcholine receptor antibody. *Intern Med.* 36(4):312-5.

Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, S. Heymans, G. Theilmeier, M. Dewerchin, V. Laudénbach, P. Vermylen, H. Raat, T. Acker, V. Vleminckx, L. Van Den Bosch, N. Cashman, H. Fujisawa, M.R. Drost, R. Sciot, F. Bruyninckx, D.J. Hicklin, C. Ince, P. Gressens, F. Lupu, K.H. Plate, W. Robberecht, J.M. Herbert, D. Collen, P. Carmeliet, (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration, *Nat. Genet.* 28:131–138.

Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, et al. (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 28, 131–138.

Oppenheim R. (1987) Muscle activity and motor neuron death in the spinal cord of the chick embryo. *End Selective Neuron Death. Ciba Foundation Symposium* 126. (ed. Bock G, O'Connor M). John Wiley & Sons, Chichester, pp 96-112.

Oppenheim RW, Calderó J, Cuitat D, Esquerda J, McArdle JJ, Olivera BM, Prevette

D, Teichert RW. (2008) The rescue of developing avian motoneurons from programmed cell death by a selective inhibitor of the fetal muscle-specific nicotinic acetylcholine receptor. *Dev Neurobiol.* 68(7):972-80.

Oppenheim RW, Haverkamp LJ, Prevette D, McManaman JL, Appel SH (1998) Reduction of naturally occurring motoneuron death in vivo by a target-derived neurotrophic factor. *Science.* 13;240 (4854):919-22

Oppenheim RW, Yin QW, Prevette D, Yan Q. (1992) Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature.* 24-31;360(6406):755-7

Orrell R, De Bellerocche J, Marklund S, Bowe F. & Hallewell R. (1995) A novel SOD mutant and ALS. *Nature* 374, 504–505.

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.* 8; 26(10):2661-72.

Pardo AC, Wong V, Benson LM, Dykes M, Tanaka K, Rothstein JD, and Maragakis NJ. (2006). Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1 (G93A) mice. *Exp. Neurol.* 201, 120–130.

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.* 8; 43(1):19-30.

Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration, *Nature* 402:615–622.

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

Perrin FE, Boisset G, Docquier M, Schaad O, Descombes P, Kato AC. (2005) No widespread induction of cell death genes occurs in pure motoneurons in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Hum Mol Genet* 14:3309–3320.

Perrin FE, Boisset G, Lathuiliere A, Kato AC. (2006) Cell death pathways differ in several mouse models with motoneurone disease: analysis of pure motoneurone populations at a presymptomatic age. *J Neurochem* 98:1959–1972.

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

Pestronk A, Adams RN, Clawson L, Cornblath D, Kuncl RW, Griffin D, Drachman DB. (1988) Serum antibodies to GM1 ganglioside in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*.38(9):1457-61.

Pizzasegola C, Caron I, Daleno C, Ronchi A, Minoia C, Carrì MT, Bendotti C. (2009) Treatment with lithium carbonate does not improve disease progression in two different strains of SOD1 mutant mice. *Amyotroph Lateral Scler.* 10(4):221-8.

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, Laganier J, Roussel 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.* 15; 21(10):3369-74.

Pun S, Santos AF, 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.

Qiao R, Zhou B, Liebler JM, Li X, Crandall ED, Borok Z. (2003) Identification of three genes of known function expressed by alveolar epithelial type I cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:98–105.

Raivich, G. (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia, *Trends Neurosci.* 28:571.

Rakhit R, Robertson J, Vande Velde C, Horne P, Ruth DM, Griffin J, Cleveland DW, Cashman NR, Chakrabartty A. (2007) An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. *Nat Med.* 13(6):754-9.

Ralevic V. and Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413 – 492.

Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, Wong LF, Bilsland LG, Greensmith L, Kingsman SM, et al. (2005). Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat. Med.* 11, 429–433.

Rao MS, Devi MG, Nalini A, Shahani N, Raju, TR. (1995). Neurofilament phosphorylation is increased in ventral horn neurons of neonatal rat spinal cord exposed to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegeneration.* 4(4):397-401.

Rao MV, Houseweart MK, Williamson TL, Crawford TO, Folmer J, Cleveland DW. (1998) Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation, *J. Cell Biol.* 143: 171–181.

Rao SD, JH.Weiss. (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(6):487-95.

Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. (2002). Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron.* 12; 35(6):1067-83.

Raper JA, Kapfhammer JP. (1990) The enrichment of a neuronal growth cone

collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron*. 4(1):21-9.

Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH Jr, Scott RW, Snider WD. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet*. 1996 May; 13(1):43-7.

Rettinger J, Aschrafi A, Schmalzing G. (2000) Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *J Biol Chem* 275:33542–33547.

Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW. (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:689-693.

Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A. and Evans RJ. (2006) Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch*. 452, 486 – 500.

Robertson J, Beaulieu JM, Doroudchi MM, Durham HD, Julien JP, Mushynski WE. (2001) Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α , *J. Cell Biol*. 155:217–226.

Robertson J, Doroudchi MM, Nguyen MD, Durham HD, Strong MJ, Shaw G, Julien JP, Mushynski WE. (2003) A neurotoxic peripherin splice variant in a mouse model of ALS, *J. Cell Biol*. 160:939–949.

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*. 19; 25(42):9735-45.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Hertzfeldt B, Van den Bergh R, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown Jr RH. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59–62.

Ross CA, Poirier MA. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.*10:10-7.

Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 28; 326(22):1464-8.

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(1):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(1):73-84.

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.

Rowland LP, Shneider NA. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344:1688–700.

Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, and Klionsky DJ. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 304–312.

Rubinsztein DC, Ravikumar B, Acevedo-Arozena A, Imarisio S, O'Kane CJ, Brown SD. (2005) Dyneins, autophagy, aggregation and neurodegeneration. *Autophagy.* 1:177–178.

Rubio ME & Soto F. (2001) Distinct localisation of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J. Neurosci.* 21, 641–653.

Ryberg HA, Soderling S, Davidsson P, Blennow K, Caidahl K, Persson LI. (2004) Cerebrospinal fluid levels of free 3-nitrotyrosine are not elevated in the majority of

patients with amyotrophic lateral sclerosis or Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.* 45 57–62.

Sandyk R. (2006) Serotonergic mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Neurosci* 116:775–826.

Sapp PC, Hosler BA, McKenna-Yasek D, Chin W, Gann A, Genise H, Gorenstein J, Huang M, Sailer W, Scheffler M. (2003). Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 397–403.

Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC. (2005) Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol*, 170:1101-11.

Schiffer D, Cordera S, Cavalla P, and Migheli A. (1996). Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 139, 27–33.

Schori H, Kipnis J, Yoles E, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Schwartz M. (2001) Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: Implications for glaucoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3398–3403.

Schwab JM, Guo L, Schluesener HJ. (2005) Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X4 receptor expression. *J Neuroimmunol* 163:185–189.

Schwartz, M. et al. (1999) The remedy may lie in ourselves: prospects for immune cell therapy in central nervous system protection and repair. *J. Mol. Med.* 77, 713–717.

Sela M. (1999) Specific vaccines against autoimmune diseases. *C.R. Acad. Sci. III* 322, 933–938.

Semaphorin Nomenclature Committee. (1999) Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. *Cell* 97:551–552.

Sengun IS, Appel SH. (2003) Serum anti-Fas antibody levels in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol.* 142(1-2):137-40.

Shaw P, Ince G, 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 glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients, *Brain Res.* 917:97–104.

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.

Siklos L, Engelhardt JI, Alexianu ME, Gurney ME, Siddique T, Appel SH. (1998) Intracellular calcium parallels motoneuron degeneration in SOD-1 mutant mice, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57:571–587.

Sim JA, Chaumont S, Jo J, Ulmann L, Young MT, Cho K, Buell G, North RA, Rassendren F. (2006) Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. *J Neurosci* 26:9006–9009.

Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, and Appel, SH. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* 62, 1758–1765.

Sindhuphak R, Karlsson E, Conradi S, Ronnevi LO. (1988) Immunoglobulins from patients with amyotrophic lateral sclerosis affect human erythrocyte acetylcholinesterase. *J Neurol Sci.* 86(2-3):195-202.

Smith R, Henry K, Mattson MP, Appel SH. (1998) Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Ann. Neurol.* 44:696–699.

Smith RA, Miller TM, Yamanaka K, Monia BP, Condon TP, Hung G, Lobsiger CS, Ward CM, McAlonis-Downes M, Wei H, et al. (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.* 12; 91(8):3393-7.

Smith RG, Siklos L, Alexianu ME, Engelhardt JI, Mosier DR, Colom L, Habib Mohamed A, Appel SH. (1996) Autoimmunity and ALS. *Neurology.* 47(4 Suppl 2):S40-5.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745.

Solle, M. Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA. (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* 276: 125-132.

Stålberg E, Schwartz MS, Trontelj JV. (1975) Single fibre electromyography in various processes affecting the anterior horn cell. *J Neurol Sci.* 24(4):403-15.

Stieber A., Gonatas J.O.,Gonatas N.K. (2000) Aggregates of mutant protein appear progressively in dendrites, in periaxonal processes of oligodendrocytes, and in neuronal and astrocytic perikarya of mice expressing the SOD1(G93A) mutation of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 177, 114-123.

Stoeckel ME, Uhl-Bronner S, Hugel S, Veinante P, Klein M.J, Mutterer J, Freund-Mercier MJ, Schlichter R. (2003). Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 457:159-174.

Stojilkovic S, Tomic M, He ML, Yan Z, Koshimizu TA. and Zemkova H. (2005) Molecular dissection of purinergic P2X receptor channels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1048, 116 - 130.

Stoll G, Jander S. (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS, *Prog. Neurobiol.* 58.233.

Storkebaum E, Lambrechts ED, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelsman S.

(2004) Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS, *Nat. Neurosci.* 8:85–92.

Svennerholm, L. (1994) Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids, *Prog. Brain Res.* 101:11–14.

Takahashi S, Kulkarni AB. (2004) Mutant superoxide dismutase 1 causes motor neuron degeneration independent of cyclin-dependent kinase 5 activation by p35 or p25, *J. Neurochem.* 88:1295–1304.

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.* 13;949(1-2):11-22.

Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T, and Kanazawa I. (1999). Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 46, 806–815.

Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM. (1999) Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell.* 1; 99(1):71-80.

Tanida I, Ueno T, Kominami E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(12):2503-18.

Tarabal O, Calderó 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(2):283-98.

Tarabal O, Caldero J, Llado J, Oppenheim RW, Esquerda JE. (2001). Long-lasting aberrant tubulovesicular membrane inclusions accumulate in developing motoneurons after a sublethal excitotoxic insult: a possible model for neuronal pathology in neurodegenerative disease. *J Neurosci.* 15; 21(20):8072-81.

Thonhoff JR, Jordan PM, Karam JR, Bassett BL, Wu P. (2007) Identification of early disease progression in an ALS rat model. *Neurosci Lett.* 30; 415(3):264-8.

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

Tohgi T, Abe K, Yamazaka 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.

Townsend-Nicholson A, King BF, Wildman SS. and Burnstock, G. (1999) Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X4 and P2X4a receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 64, 246 – 254.

Trang T, Beggs S, Salter MW. (2006) Purinoceptors in microglia and neuropathic pain. *Pflugers Arch* 452:645–652.

Trojanowski, JQ, Ishihara T, Higuchi M, Yoshiyama Y, Hong M, Zhang B, Forman MS, Zhukareva V, Lee VM. (2002) Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex: transgenic mice provide insights into mechanisms underlying a common tauopathy in an ethnic minority on Guam, *Exp. Neurol.* 176:1–11.

Troost D, Claessen N, van den Oord JJ, Swaab DF, and de Jong JM. (1993). Neuronophagia in the motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 19, 390–397.

Trotti D, Danbolt NC, Volterra A. (1998) Glutamate transporters are oxidantvulnerable: 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: 427–433.

Tsuchiya T, Park KC, Toyonaga S, Yamada SM, Nakabayashi H, Nakai E, Ikawa N, Furuya M, Tominaga A. & Shimizu, K. (2005) Characterization of microglia induced from mouse embryonic stem cells and their migration into the brain parenchyma. *J.*

Neuroimmunol., 160, 210–218.

Tu PH, Gurney ME, Julien JP, Lee VM, Trojanowski JQ (1997) Oxidative stress, mutant SOD1, and neurofilament pathology in transgenic mouse models of human motor neuron disease. *Lab Invest.* 76(4):441-56.

Tu PH, Raju K A, Robinson F, Gurney M E, Trojonowski JQ, and Lee V. M.Y. (1996). Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3155–3160.

Turner B.J., Atkin J.D., Farg M.A., Zang D.W., Rembach A., Lopes E.C., Patch J.D., Hill A.F., Cheema S.S. (2005) Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 25, 108-117.

Turner BJ, Lopes EC, Cheema SS. (2003) The serotonin precursor 5-hydroxytryptophan delays neuromuscular disease in murine familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4:171–176.

Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller, CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, and 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.

Turner MR, Rabiner EA, Hammers A, Al-Chalabi A, Grasby PM, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN. (2005) [11C]-WAY100635 PET demonstrates marked 5-HT_{1A} receptor changes in sporadic ALS. *Brain* 128:896–905.

Uchitel O D, S H Appel, F Crawford, and L Sczcupak. (1988) Immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients enhance spontaneous transmitter release from motor-nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(19): 7371–7374.

Umrao R. Monani U. (2005) Spinal Muscular Atrophy: Review A Deficiency in a Ubiquitous Protein; a Motor Neuron-Specific Disease. *Neuron* 48: 885–896.

Unal-Cevik I, Kilinc M, Gursoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T. (2004) Loss of NeuN

immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res* 1015:169–174.

Urushitani M, Ezzi SA, Julien JP. (2007). Therapeutic effects of immunization with mutant superoxide dismutase in mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13; 104(7):2495-500.

Urushitani M, Kurisu J, Tsukita K, Takahashi R. (2002) Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurochem.* 83:1030–1042.

Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP. (2006) Chromogranin-mediated secretion of ALS-linked superoxide dismutase mutants as a novel pathogenic pathway for ALS. *Nat. Neurosci.* 9:108–118.

Urushitani M., Ezzi S.A., Matsuo A., Tooyama I., Julien J.P. (2008) The endoplasmic reticulum-Golgi pathway is a target for translocation and aggregation of mutant superoxide dismutase linked to ALS. *FASEB J.* 22, 2476-2487.

Van Calker D, Muller M. and Hamprecht B. (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* 33, 999 – 1005.

Van Damme P, Van Den Bosch L, Van Houtte E, Callewaert G, and Robberecht W. (2002) GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective vulnerability of motor neurons to excitotoxicity. *J. Neurophysiol.* 88, 1279–1287.

Van Den Bosch J, Tilkin P, Lemmens G, Robberecht W. (2002). Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS, *Neuroreport* 13:1067–1070.

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

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. 11; 105(10):4022-7.

Varela-Echavarría 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.

Vlug AS, Teuling E, Haasdijk ED, French P, Hoogenraad CC, Jaarsma D. (2005) ATF3 expression precedes death of spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis-SOD1 transgenic mice and correlates with c-Jun phosphorylation, CHOP expression, somato-dendritic ubiquitination and Golgi fragmentation. *Eur J Neurosci* 22:1881–1894.

Wang J, Xu G, Gonzales V, Coonfield M, Fromholt D, Copeland NG, Jenkins NA, Borchelt DR. (2002a) Fibrillar inclusions and motor neuron degeneration in transgenic mice expressing superoxide dismutase 1 with a disrupted copper-binding site. *Neurobiol Dis.* 10(2):128-38.

Wang J, Xu G, Li H, Gonzales V, Fromholt D, Karch C. (2005) Somatodendritic accumulation of misfolded SOD1-L126Z in motor neurons mediates degeneration: α B-crystallin modulates aggregation, *Hum. Mol. Genet.* 14:2335–2347.

Wang J, Xu G, Slunt HH, Gonzales V, Coonfield M, Fromholt D, Copeland NG, Jenkins NA, Borchelt DR. (2002b) Coincident thresholds of mutant protein for paralytic disease and protein aggregation caused by restrictively expressed superoxide dismutase cDNA, *Neurobiol. Dis.* 20: 943–952.

Wang J., Xu G., Gonzales V., Coonfield M., Fromholt D., Copeland N.G., Jenkins N.A., Borchelt D.R. (2002) Fibrillar inclusions and motor neuron degeneration in transgenic mice expressing superoxide dismutase 1 with a disrupted copper-binding site. *Neurobiol. Dis.* 10, 128-138.

Wang LJ, Lu YY, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, et al. (2002). Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2002; 22:6920– 8.

Wang Q., Johnson J.L., Agar N.Y., Agar J.N. (2008) Protein aggregation and protein instability govern familial amyotrophic lateral sclerosis patient survival. *PLoS Biol.*

6(7), e170.

Wang Y, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA, Jin K. (2007). Vascular endothelial growth factor overexpression delays neurodegeneration and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci.* 10; 27(2):304-7.

West M, Mhatre M, Ceballos A, Floyd RA, Grammas P, Gabbita SP, Hamdheydari L, Mai T, Mou S, Pye QN, et al. (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, and Moller T. (2004). Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice. *Glia* 48, 179-182.

Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Gralla ED, Roe JA, Valentine JS, Bredesen DE. (1996) Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis, *Science* 271,515-518.

Williams, A., Jahreiss, L., Sarkar, S., Saiki, S., Menzies, F.M., Ravikumar, B., and Rubinsztein, D.C. (2006). Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr. Top. Dev. Biol.* 76, 89-101.

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.

Winslow, AR, Rubinsztein DC, (2008) Autophagy in neurodegeneration and development. *Biochim Biophys Acta* 1782(12):723-9.

Wong JT, Wong ST, O'Connor TP. (1999) Ectopic semaphorin- 1a functions as an attractive guidance cue for developing peripheral neurons. *Nat Neurosci* 2:798-803.

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 P, Pardo C, Borchelt D, Lee M, Copeland N, Jenkins N, Sisodia S, Cleveland D, Price D. (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.

Xia X, Zhou H, Huang Y, and Xu Z. (2006) Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit in vivo. *Neurobiol. Dis.* 23, 578–586.

Xiang Z, Burnstock G. 2005. Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development. *Glia* 52:119–126.

Xu L, Yan J, Chen D, Welsh AM, Hazel T, Johe K, Hatfield G. & Koliastos VE. (2006) Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. *Transplantation.* 15; 82(7):865-75.

Yamamoto, K. et al. (2006) Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nature Med.* 12, 133-137.

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(5):1497-505.

Yan J, Xu L, Welsh AM, Chen D, Hazel T, Johe K, and Koliatsos VE. (2006). Combined immunosuppressive agents or CD4 antibodies prolong survival of human neural stem cell grafts and improve disease outcomes in ALS transgenic mice. *Stem Cells* 24:1976–1985.

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, and McGeer PL. (2001). Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: implications for therapy. *Neurology* 57, 952–956.

Yeung D, Zablocki K, Lien CF, Jiang T, Arkle S, Brutkowski W, Brown J, Lochmuller

H, Simon J, Barnard EA, Gorecki DC. (2006) Increased susceptibility to ATP via alteration of P2X receptor function in dystrophic mdx mouse muscle cells. *FASEB J* 20:610–620.

Yue Z, Horton A, Bravin M, DeJager PL, Selimi F, and Heintz N. (2002). A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron* 35, 921–933.

Zetterström P., Stewart H.G., Bergemalm D., Jonsson P.A., Graffmo K.S., Andersen P.M., Brännström T., Oliveberg M., Marklund S.L. (2007) Soluble misfolded subfractions of mutant superoxide dismutase-1s are enriched in spinal cords throughout life in murine ALS models. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 14157-14162.

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 Z, Artelt M, Burnet M, Trautmann K, Schluesener HJ. (2006) Lesional accumulation of P2X4 receptor monocytes following experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 197:252–257.

Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y, Hirokawa N. (2001) Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta, *Cell* 105:587–597.

Zhao Z, Alam S, Oppenheim RW, Prevette DM, Evenson A, Parsadanian A. (2004) Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the CNS rescues motoneurons from programmed cell death and promotes their long-term survival following axotomy. *Exp Neurol* 190:356– 72.

Zipp F, Aktas, O. Lüneman JD. (2006) The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in Neuroscience*. 29(9):518-27.

7. ANNEX

Strong P2X₄ Purinergic Receptor-Like Immunoreactivity Is Selectively Associated With Degenerating Neurons in Transgenic Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis

ANNA CASANOVAS, SARA HERNÁNDEZ, OLGA TARABAL, JAUME ROSSELLÓ,
AND JOSEP E. ESQUERDA*

Unitat de Neurobiologia Cel·lular, Departament de Medicina Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida and IRBLLEIDA, Montserrat Roig 2, 25008, Lleida, Catalonia, Spain

ABSTRACT

The distribution of the P2X family of ATP receptors was analyzed in a rat model for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) expressing mutated human superoxide dismutase (mSOD1^{G93A}). We showed that strong P2X₄ immunoreactivity was selectively associated with degenerating motoneurons (MNs) in spinal cord ventral horn. Degenerating P2X₄-positive MNs did not display apoptotic features such as chromatin condensation, positive TUNEL reaction, or active caspase 3 immunostaining. In contrast, these neurons showed other signs of abnormality, such as loss of the neuronal marker NeuN and recruitment of microglial cells with neuronophagic activity. Similar changes were observed in MNs from the cerebral cortex and brainstem in mSOD1^{G93A} in both rat and mice. In addition, P2X₄ immunostaining demonstrated the existence of neuronal degeneration in the locus coeruleus, reticular formation, and Purkinje cells of the cerebellar cortex. It is suggested that abnormal trafficking and proteolytic processing of the P2X₄ receptor protein may underlie these changes. *J. Comp. Neurol.* 506:75–92, 2008. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Indexing terms: motoneuron; superoxide dismutase 1 (SOD1); neuronal death; microglia; cerebellar Purkinje cell

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal late-onset neurodegenerative disease affecting motoneurons (MNs) in the cortex, brainstem, and spinal cord. It results in progressive muscle weakness evolving into paralysis and death, usually within 3–5 years.

About 10% of cases are familial, and mutations in the genes that encode superoxide dismutase 1 (mSOD1) are responsible for 20% of familial ALS cases (FALS; for review, see Pasinelli and Brown, 2006). In transgenic animals, both mice (Gurney et al., 1994) and rats (Nagai et al., 2001), overexpression of mutated human SOD1 results in the development of a fatal neuromuscular disease that has been the most widely used experimental model of ALS during the last two decades. Despite the considerable amount of research conducted into ALS during this period, the nature of the selective degeneration of MNs in ALS remains a mystery. In the case of FALS, it seems that the toxicity of mutant SOD1 for MNs is an acquired non-cell-

autonomous property involving multiple aspects that include mitochondrial alteration, oxidative damage, glutamate receptor-mediated excitotoxicity, and neuroinflammation (Bruijn et al., 2004).

Together with MN degeneration, activated astroglial and microglial cells are found in the spinal cord of mice overexpressing the G93A form of mSOD1 (mSOD1^{G93A};

Grant sponsor: the Ministerio de Educación y Ciencia; Grant number: SAF2005-01535; Grant sponsor: the Fundació "La Marató de TV3"; Grant number: 063030.

*Correspondence to: Josep E. Esquerda, Unitat de Neurobiologia Cel·lular, Departament de Medicina Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida and IRBLLEIDA, Montserrat Roig 2, 25008, Lleida, Catalonia, Spain. E-mail: josep.esquerda@cmb.udl.es

Received 14 May 2007; Revised 26 July 2007; 11 September 2007

DOI 10.1002/cne.21527

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Hall et al., 1998; Alexianu et al., 2001). Activated microglia exert a neurotoxic effect on neighboring MNs, especially in advanced stages of the disease: this has been elegantly demonstrated in recent studies (Beers et al., 2006; Boill e et al., 2006). It has yet to be determined whether glial activation mainly represents a primary or a secondary event in the complex neurotoxic cascade leading to loss of MN.

Our limited knowledge of the causative mechanisms responsible for the process by which MN degeneration first starts in ALS and then propagates, justifies making renewed efforts to unravel the mechanisms behind cell death signaling in the neurons affected. One significant question is whether MN death in ALS is produced by apoptosis or by an alternative cell death pathway. Although numerous key molecular components of the apoptotic machinery, including Bax, cytosolic cytochrome c, and activated caspases, are recruited in ALS spinal cord (Pasinelli et al., 2000; Vukosavic et al., 2000; Gu egan et al., 2001), this apoptotic phenotype is rarely seen in degenerating MNs (Migheli et al., 1999; Gu egan and Przedborski, 2003; Martin et al., 2007). They otherwise display the nonapoptotic morphology of cell degeneration with prominent organelle damage (Dal Canto and Gurney, 1995; own observations).

Although the inhibition of caspases (Friendlander et al., 1997; Li et al., 2000) and overexpression of Bcl-2 (Kostic et al., 1997) extend the survival of mutant SOD1 transgenic mice, a recent report (Gould et al., 2006) has minimized the importance of apoptotic pathways in FALS mutant mice because the disease still develops even when MN death has been impeded by Bax deletion. Moreover, after analysis of mSOD1^{G93A} lacking caspase-11, it was concluded that caspase activation was not critically involved in the mechanism of neurodegeneration in this model (Kang et al., 2003).

In mutant SOD1 mice, biochemical evidence of the activation of cell death pathways was detected months before neuronal loss (Pasinelli et al., 2000). This would seem to indicate that a long-standing, yet so far poorly understood, degenerative process involving MN dysfunction, but not immediate death, could be a major feature of the ALS pathology. For this reason, it would be useful to establish cellular markers capable of detecting diseased MNs long before the onset of cell death.

The P2X family of ligand-gated ion channel adenosine 5'-triphosphate (ATP) receptors includes seven members (P2X₁₋₇) that form multimeric channels through the association of several subunits (North, 2002). When antibodies against these proteins were used to detect these subunits in the nervous system by immunocytochemistry, they revealed a particular pattern of distribution for each subunit expressed in neuronal and glial cells (Rubio and Soto, 2001; Xiang and Burnstock, 2005). Extracellular ATP acting on P2 receptors serves as a signaling molecule that normally participates in synaptic neurotransmission and neuroglial communication but that can also act as a toxic agent mediating neuronal degeneration and cell death (Franke and Illes, 2006; Franke et al., 2006).

In this paper, we show that both degenerating and dying MNs in mSOD1^{G93A} rodent models of ALS can be specifically recognized by using antibodies against the purinergic receptor protein P2X₄. Although the specific role of this protein in the context of MN degeneration has yet to be defined, the lack of appropriate markers for

neurodegeneration in mutant SOD1 animals justifies interest in the observations reported here. We demonstrate that degenerating MNs with strongly positive P2X₄-like immunoreactivity (P2X₄-LIR) do not display apoptotic features but later die when surrounded and engulfed by activated microglial cells. Moreover, use of the P2X₄ antibody made it possible to demonstrate that neurons other than MNs followed a similar process of degeneration in mSOD1 animals. Such neuronal populations include at least Purkinje cells in the cerebellum, serotonin-containing neurons in the raphe nucleus, and noradrenergic neurons in the locus coeruleus.

MATERIALS AND METHODS

Animals and tissue preparation

All the transgenic animals used in this study were male and female Sprague-Dawley NTac: SD-TgN (SOD1^{G93A}) L26H rats obtained from Taconic Farms (Germantown, NY). Upon arrival, the animals were kept in a strictly controlled environment. Wild-type Sprague-Dawley rats were also purchased from Taconic. The time course of disease progression varied for individual animals, but in general, once symptoms had developed, disease progression was quite rapid, causing the death of most animals by age 5 months. Animals were deeply anaesthetized with pentobarbital and transcardially perfused with physiological saline solution followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.4 for light microscopy immunocytochemistry. Other fixatives were also used when required. The spinal cord, brain, and leg muscles were removed and immersed overnight in fresh fixative at 4°C. They were then transferred to 30% sucrose in 0.1 M PB and frozen. Appropriate rules and procedures were followed (Generalitat de Catalunya DOGC 2073, 1995) in all cases involving rats, and all efforts were made to prevent suffering. Sciatic nerve axotomy, tissue sampling, and processing were performed according to Casanovas et al. (2001).

Immunohistochemical procedures

The spinal cord was cut into 16 µm transverse sections, and the brain or brainstem was equally cut along the coronal plane. This was done on a cryostat, and the sections were mounted on gelatinized slides and stored at -80°C before use. Muscles were cut into longitudinal sections. The sections were pretreated with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Triton X-100 for 15 minutes, blocked in 3% normal goat serum (NGS) for 30 minutes, and then incubated overnight with primary antibody at 4°C. Primary antibodies against P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, and P2X₇, purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel), were diluted to 1:500. The P2X₁ antibody (cat. #APR-001, lot AN-04) was raised in rabbit by using the peptide (CS)DPV ATSSST LGLQE NMRTS, corresponding to residues 382-399 of rat P2X₁ protein as an immunogen. In Western blot, this antibody recognizes a double band at the expected size of ~50 kDa in human platelet lysates (manufacturer's technical information). Similar bands were detected in mouse-brain extracts, and the antibody detected injured rat MNs by immunocytochemistry (Kassa et al., 2007). The P2X₂ antibody (cat. #APR-003, lot AN-04) was produced in rabbits against the peptide (C)SQQD STSTD PKGLA QL, corresponding to

residues 457–472 of rat P2X₂. In Western blots of rat brain extracts, a single band of 64 kDa was detected by this antibody, which has also been used for immunostaining in rat brain (Rubio and Soto, 2001).

The P2X₃ antibody (cat. #APR-016, lot AN-03) was a rabbit polyclonal antibody against the peptide (C)VEKQSTDSGAYSIGH, corresponding to residues 383–397 of rat P2X₃. A single band of ~60 kDa was detected on Western blotting of rat dorsal root ganglia lysates (manufacturer's technical information). This antibody also stains rat young vagal MNs by immunocytochemistry (Brosenitsch et al., 2005). The P2X₄ antibody was raised against the peptide (C)KKYK YVEDY EQGLS GEMNQ, corresponding to residues 370–388 of rat P2X₄ (cat. #APR-002, lot AN-04 and AN-05). This antibody has been extensively used to study the distribution of P2X₄ receptor protein in a variety of preparations (see, for example, Rubio and Soto, 2001; Atkinson et al., 2003; Qiao et al., 2003; Doctor et al., 2004; Nasu-Tada et al., 2006; Yeung et al., 2006). On Western blots, of normal rat brain and spinal cord tissues, it recognizes two close bands, of the predicted molecular weight, that were abolished by antibody preincubation with an immunizing peptide (see Results and Discussion). Neither of these bands nor the immunostaining in tissue sections was observed in brain and other tissues of P2X₄ knockout mice (Sim et al., 2006). The P2X₇ antibody (cat. #APR-004, lot AN-04) was obtained in rabbit after immunization with the peptide (C)KIRK EFPKT QGQYS GFKYP Y, corresponding to residues 576–595 of rat P2X₇ protein. The specificity of this antibody has been tested by Western blots of rat brain homogenates and extracts of mouse microglial cells (Lundy et al., 2002; Witting et al., 2004). In our hands, microglial cell immunolabeling was observed in rat brain tissue sections stained with P2X₇ antibody, as expected according to Xiang and Burnstock (2005).

Other already well-characterized antibodies used were as follows:

1. Mouse monoclonal antibody anti-neuronal nuclei (NeuN, diluted 1:500; Chemicon International, Temecula, CA; cat. #MAB377, lot 23031163), which was obtained from mouse brain by using purified cell nuclei as an immunogen. Positive immunostaining with NeuN antibody was observed in most neuronal cell types, in the rodent nervous system, and characterization of the NeuN antigen in brain homogenates by Western blot showed three bands of approximately 46–48 kDa (Mullen et al., 1992).
2. Mouse monoclonal antibody anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; diluted 1:400; Chemicon; cat. #MAB360, lot 24091577), which was raised against purified GFAP from porcine spinal cord. This antibody clearly delineates typical astrocyte morphology in several species, including rodents, and stains a band of 51 kDa corresponding to GFAP on Western blot of extracts from a human glioma cell line (manufacturer's technical information).
3. Rat monoclonal antibody anti-serotonin (diluted 1:100, Chemicon; cat. #MAB352, lot 0604028130), which was obtained by using a formaldehyde conjugate of serotonin as an immunogen and recognizes serotonergic sites in fixed tissue sections. MAB352 does not show reactivity with catecholamine-containing neurons (manufacturer's technical information).
4. Mouse monoclonal antibody anti-CD11b (MRC OX-42, diluted 1:100; Serotec, Oxford, UK; cat. #MCA275G, lot 1105), which was obtained after immunization with rat peritoneal macrophages and extensively used for specific labeling of macrophages and microglial cells in flow cytometry or immunohistology (manufacturer's technical information). OX-42 has been used for mapping the distribution of microglia in rat brain (Milligan et al., 1991).
5. Mouse monoclonal antibody anti-tyrosine hydroxylase (TH; diluted 1:100; Sigma-Aldrich, Alcobendas, Spain, cat. #T2928, lot 016K4857). This antibody is derived from TH-16 hybridoma that were obtained by using purified rat TH as an immunogen; it recognizes epitopes present in the N-terminal region between amino acids 40–152 of rodent TH (~60 kDa; manufacturer's technical information).
6. Mouse monoclonal antibody anti-calbindin-D-28K (diluted 1:1,000; Sigma-Aldrich, cat. #C9848, lot 016K4786) and derived from the CB-955 hybridoma, which was produced after immunization with a purified bovine kidney calbindin-D-28K. It recognizes a protein band of the predicted size (28 kDa) and shows the expected cell-type-specific expression in rat brain (manufacturer's technical information).
7. Monoclonal antibody anti-TuJ-1 (diluted 1:500; R&D Systems, Minneapolis, MN; cat. #MAB1195, lot HGQ01), produced from the mouse hybridoma clone TuJ-1 from a mouse immunized with rat brain microtubules. On Western blot, TuJ-1 antibody recognizes the mammalian neuron-specific class III β -tubulin but not other β -tubulin isotypes in glial cells (manufacturer's technical information).
8. Rabbit polyclonal antibody anticlaved caspase-3 (Asp175; diluted 1:50; Cell Signaling, Beverly, MA; cat. #9661, lot 12), which was raised against a synthetic (KLH-coupled) peptide corresponding to amino-terminal residues (CRGTELDGCIETD) adjacent to Asp175 in human caspase-3. This antibody is used as a marker for apoptosis in rat brain and detects a single band corresponding to cleaved caspase-3 on Western blots of several cell lines undergoing apoptosis (manufacturer's technical information). All dilutions were made in PBS.

In some cases, serial coronal sections from the brain and brainstem were cut with a Vibratome, collected in 0.1 M PB, and processed for immunoperoxidase staining according to standard ABC procedures (Vectastain, Vector, Burlingame, CA). The sections were finally mounted on gelatin-coated slides, air-dried, and coverslipped with DPX. The specificity of the immunoreaction was tested by using anti-P2X₄ as a primary antibody following preincubation with the immunogen peptide (0.5–1 μ g/ml) for 2 hours.

Appropriate secondary antibodies labeled either with Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene OR), or Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, 1:500) were used for multiple fluorescent immunolabeling. Fluorochrome 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) were usually applied at 50 ng/ml.

Some sections of spinal cord were processed for correlative detection of P2X₄ and active caspase-3 immunoreactivity in combination with terminal deoxynucleotidyl transferase

dUTP nick-end labeling (TUNEL) and NeuN staining, respectively. As both anti-P2X₄ and anti-activated caspase-3 antibodies were raised in rabbits, consecutive cryostat sections were immunostained with one or other rabbit antibody, and the corresponding fields were digitally imaged and studied. TUNEL was performed with a fluorescence in situ detection kit for cell death from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

To reveal the acetylcholine receptors (AChRs) at the neuromuscular synaptic sites, sections were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated α -bungarotoxin (1 μ g/ml; Molecular Probes).

The sections were examined by using an Olympus BX51 (Hamburg, Germany) epifluorescence microscope equipped with a cooled CCD camera (DP30BW). Samples were also imaged and analyzed under a FluoView 500 Olympus confocal laser scanning microscope. A Visilog 6.3 (Noesis, Orsay, France) was also used for image analysis. Fluorescence intensity analysis was performed on images acquired under identical microscope and software settings and kept without further modifications. For the final published figures, images were assembled, labeled, and balanced for optimal brightness and contrast by using either Adobe Photoshop 7.0 or Microsoft Power Point 2002 software. Fluorescence micrographs that were only red-green were converted to magenta-green to make them accessible to red-green color blind readers.

Ultrastructural immunolabeling

Both pre-embedding and post-embedding procedures were applied for ultrastructural localization of P2X₄-LIR in the spinal cord of mSOD1^{G93A} rats. End-stage animals (P150) were perfused with 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M PB. Dissected spinal cords were submerged in the same fixative for 6 hours. For pre-embedding immunostaining, Vibratome sections (50 μ m) were treated with 50 mM glycine for 30 minutes and permeabilized with 10% NGS in 0.01% saponin in PBS for 1 hour. Sections were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody rabbit anti-P2X₄ (1:100). After washing, samples were incubated for 1 hour with secondary antibody anti-rabbit biotinylated antibody (1:100; Vector) and then with Nanogold streptavidin (1:100; Molecular Probes) for 1 hour. Finally, a silver enhancement procedure (Silver enhancement kit, Molecular Probes) was performed according to the manufacturer's instructions. Labeled sections were flat-embedded in Embed 812, sectioned, and counterstained with uranyl acetate and lead citrate and then observed under a Zeiss EM 910 (Oberkochen, Germany) electron microscope.

For the post-embedding method, a freeze substitution protocol was performed. Spinal cord tissue, which was fixed as above, was sectioned at 200 μ m by using a McIlwain Tissue Chopper (Mickle Laboratory Engineering, Gomshall, Surrey, UK). It was then processed according to the freeze-substitution procedure and subjected to low-temperature embedding with Lowicryl HM20 resin (Electron Microscopy Sciences), following a protocol similar to that described by Rubio and Wenthold, (1999). Ultrathin sections were collected on nickel grids and treated for 10 minutes at room temperature with 0.1% sodium borohydride in Tris-buffered-saline (pH 7.4) containing 0.1% Triton X-100 (TBST) and 50 mM glycine. After washing with TBST, sections were first incubated in 10% NGS diluted in

TBST for 10 minutes and then in primary antibody (rabbit anti-P2X₄, 1:100) for 2 hours at room temperature. After rinsing in TBST, they were incubated in 10 nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) diluted 1:20 in TBST containing 10% NGS and 5 mg/ml polyethylene glycol 20000, for 1 hour, at room temperature. After washing in TBST and distilled water, sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate before observation.

Western blotting

Animals were sacrificed by using a lethal dose of pentobarbital. Spinal cords were rapidly dissected, frozen in liquid N₂, and stored at -80°C until use. Samples were homogenized in 10 volumes of cold buffer (0.32 M sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EDTA, with added protease inhibitor cocktail [Sigma P8340]) by using 10–15 strokes of a motor-driven glass-Teflon homogenizer and spun at 1,000g for 15 minutes to remove pelleted nuclear fraction. Supernatants (S1) were collected and spun at 50,000 rpm on a 70.1 Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA) for 30 minutes to yield a crude membrane pellet and cytosolic soluble fraction. The pellets were then resuspended in homogenization buffer and spun again at 50,000 rpm to yield a washed crude membrane pellet. Pellets were resuspended in HEPES-lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EDTA with protease inhibitors). Protein concentrations were measured by the Bradford (1976) method.

Subcellular fractions were size-separated through denaturing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). An equal amount of protein from each sample was heated at 100°C for 5 minutes with an equivalent volume of the sample buffer (containing 8% SDS and 2% mercaptoethanol) and then loaded onto 7.5% polyacrylamide gels. The proteins were electrotransferred to a nitrocellulose membrane in Tris/glycine/methanol buffer (pH 9.0). The membrane was blocked for 1 hour at room temperature in a blocking solution mixture of 5% nonfat dry milk, 0.1% Tween 20, and Tris-buffered saline (TBS). The membrane was then incubated for 2 hours at room temperature with the P2X₄ rabbit primary antibody diluted to 1:250 in a blocking solution. The membrane was rinsed once, for 15 minutes, with TBS-0.1% Tween 20 (TBSTw) and then washed twice for 5 minutes with blocking solution, before incubation for 1 hour at room temperature in 1:3,000 diluted peroxidase-labeled anti-rabbit antibody (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). The blot was washed once with TBSTw for 15 minutes, once for 10 minutes, and three times for 5 minutes and then processed for analysis by using a Supersignal Chemiluminescence detection kit (Pierce, Rockford, IL), following the manufacturer's indications.

Behavioral analysis

Paw print analysis was adapted from Costa et al. (1999). Rat hind paws were covered with ink to record walking patterns during continuous locomotion, and stride length was also measured.

RESULTS

P2X-like immunoreactivity in spinal cord of mSOD1^{G93A} rat

To explore whether P2X receptors play a role in MN degeneration in ALS, we first studied the expression of

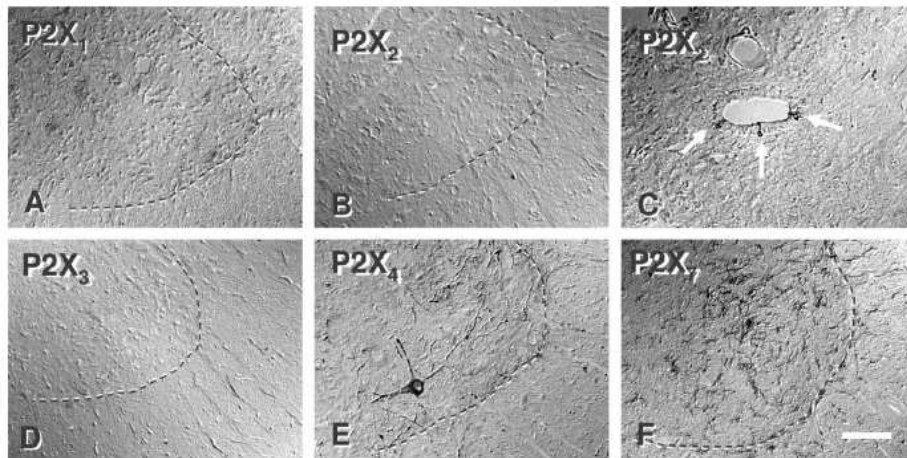


Fig. 1. P2X purinergic receptor immunoperoxidase labeling in transgenic mSOD1^{G93A} rat spinal cord observed under interference contrast microscopy. A,B,D: Note the absence of immunolabeled structures in the ventral horn (delimited by dashed line) for P2X₁,

P2X₂, and P2X₃. C: It is possible to observe positive P2X₂ neurons in contact with cerebrospinal fluid. E: Strong P2X₄ immunostaining is present in ventral horn MNs and nerve fibers. F: P2X₇ immunoreactivity is associated with small microglial cells. Scale bar = 100 μ m.

P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, and P2X₇ in the spinal cords of mSOD1^{G93A} transgenic rats. These rats developed an MN disease with clinical courses identical to those described in previous reports (Nagai et al., 2001; Matsumoto et al., 2006).

Immunolabeling of spinal cord sections in the final stages of the disease (120–150 days; Fig. 1) did not show any appreciable changes in P2X₁, P2X₂, or P2X₃ expression compared with age-matched sections of wild-type animals. Whereas no specific spinal cord structures were immunostained with P2X₁ or P2X₃ antibodies, cerebrospinal fluid-contacting neurons with positive P2X₂ immunoreactivity identical to those described by Stoeckel et al., 2003 were clearly identified in both normal and mSOD1^{G93A} lumbar spinal cord (not shown). P2X₇ immunolabeling clearly delineated microglial cells in both wild-type and mSOD1^{G93A} animals, with staining being more conspicuous in the latter in accordance with the abundance of activated microglia at advanced stages of the disease. However, when we used P2X₄ antibodies, a clearly distinctive pattern of immunostaining was observed in mSOD1^{G93A} spinal cord; this contrasted with the scarcity of strongly labeled structures in the control tissue. In normal brain, perivascular and meningeal mononucleated cells showed some degree of P2X₄-LIR and displayed a pattern identical to that previously described (Xiang and Burnstock, 2005). In addition, neuronal cell bodies in the brainstem adjacent to the IV ventricle, and belonging to lateral vestibular nucleus, also displayed positive P2X₄-LIR in control animals (see below).

In contrast, abundant strongly positive P2X₄ structures were seen in the gray matter of mSOD1^{G93A} rats and along Rexed laminae 5, 6, 7, 8, and 9. Very little labeling was found in laminae 4, whereas laminae 1, 2, and 3 were completely devoid of any overt signal. P2X₄-positive structures consist of abundant fibers and some large neuronal bodies. The latter are mainly localized in lamina 9, indicating that they are ventral horn MNs (Fig. 2A–C,G).

P2X₄-positive fibers must be of neuronal origin because they do not colocalize with GFAP (Fig. 2I). Similar results were observed in the spinal cord of mSOD1^{G93A} mice at the end stage of the disease (120 days; data not shown).

Strong P2X₄-like immunoreactivity was associated with degenerating MNs in mSOD1^{G93A} animals

When P2X₄ immunolabeling was combined with the neuronal marker NeuN (Mullen et al., 1992), it was observed that most of the P2X₄-positive cell bodies displayed little or no NeuN-immunoreactive signal, suggesting that strong P2X₄-LIR could be related to degenerating MNs that have lost NeuN. Counts of large NeuN-positive neuronal bodies located in lamina 9 indicated that MN loss began at P90 in mSOD1^{G93A} rats and drastically decreased until P120–150, the age by which virtually all the NeuN-positive MNs had been lost. In contrast, MNs with positive P2X₄-LIR were first detected at P90 and notably increased during P120–150. Before the overt detection of P2X₄-LIR MN cell bodies at P90, strongly positive nerve fibers were already visible at P60. The decline in the number of MNs correlated with the increase in P2X₄-immunoreactive structures and with the loss of motor performance as measured by paw print testing (Fig. 3).

When intensity values for NeuN and P2X₄ fluorescence were plotted for individual MNs, a clear dissociation between signals was observed at advanced stages (P130–150) of disease because of the inverse relationship between the two markers with respect to normal and young (P30) diseased rats (Fig. 4A,B,E–M). This was also observed when we compared the mean ratio values of P2X₄/NeuN fluorescent signal intensity, which was 4.34 times greater for P130–150 G93A animals than in the wild type (Fig. 4C,D).

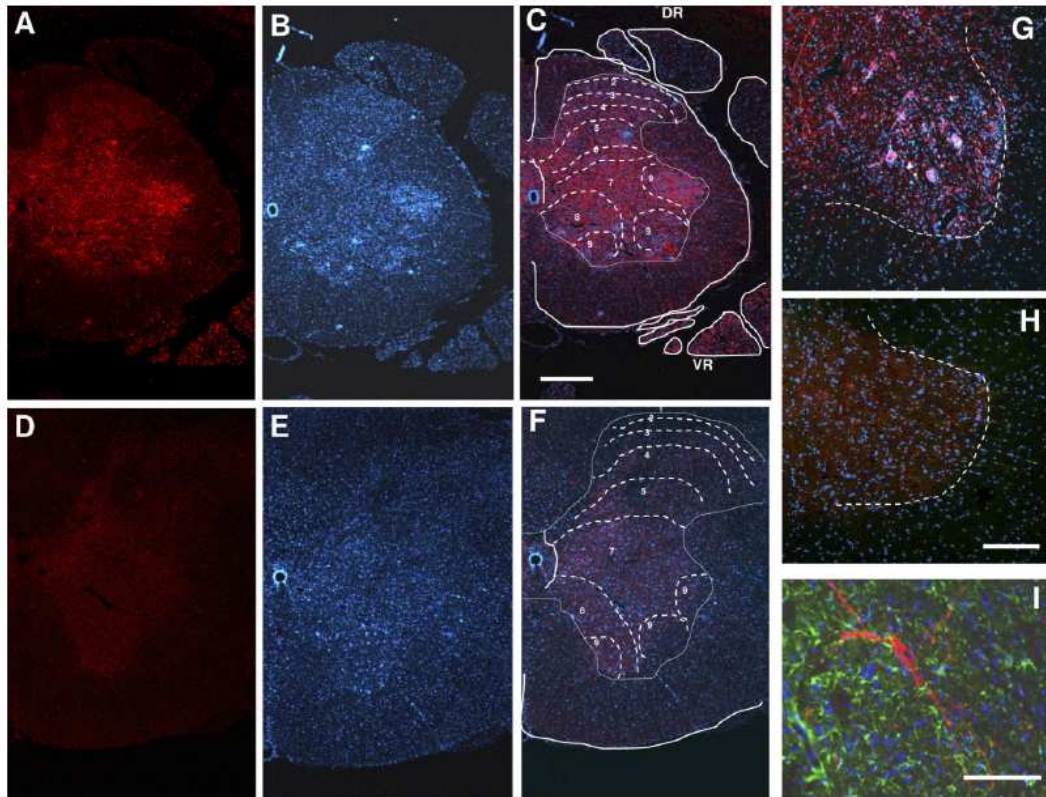


Fig. 2. P2X₄-LIR in rat spinal cord. Sections of lumbar spinal cord from mSOD^{G93A} rats at the end stage of the disease (P150) (A–C,G), or age-mated wild type (D–F,H), were double fluorescently labeled to reveal P2X₄-LIR (A,D) in red and nuclear profiles with DAPI (B,E) in blue. C,F: Respective merged images. P2X₄-immunoreactive structures are most prominent in mSOD^{G93A} rats, concentrated in the ventral horn MNs (Rexed lamina 9) but are also present in the rest of the gray matter except in the most dorsal laminae. In transgenic animals, P2X₄-LIR is also increased in ventral (VR) with respect to

dorsal roots (DR). G,H: A detail of the spinal cord ventral horn (delimited by dashed line) double labeled with DAPI (blue) and P2X₄ (red) of P150 transgenic (G) and wild-type (H) rats shows the accumulation of large MN cell bodies and fibers with strongly positive P2X₄-LIR in transgenic but not in wild-type samples. I: P2X₄-immunoreactive cells and fibers are of neuronal origin and do not colocalize with GFAP: the spinal cord ventral horn at 90 days in an mSOD^{G93A} rat triple fluorescently labeled for P2X₄ (red), GFAP (green), and DAPI (blue). Scale bar = 500 μm in A–F; 200 μm in G,H; 100 μm in I.

Although some P2X₄-positive fibers were detected in the spinal cord at P60, strongly P2X₄-immunoreactive MN somata and dendrites were initially observed at P90. At this age, immunostaining is homogeneous and sometimes extends to the nucleus. DAPI staining indicates that P2X₄-positive MNs do not show any appreciable chromatin condensation. At P120–150, P2X₄-positive MN somata are often encircled by a ring of non-neuronal cell nuclei, suggesting that microglial cell recruitment has occurred. P2X₄-positive MN soma also often display signs of neuronophagia in which groups of microglial cells are seen to be completely immersed in disintegrated neuronal cytoplasm. Cell-mediated destruction of MN cytoplasm involves the progressive loss of P2X₄-LIR. The microglial nature of this phenomenon was confirmed after labeling with OX-42. It seems that, in the early stages of the

acquisition of strong P2X₄-LIR (mostly found, for example, at P90) MNs do not show an intimate association with microglial cells. This finding indicates that the P2X₄ phenotype points to MN degeneration before microglial attraction. Once microglia were mobilized, P2X₄-positive MNs disintegrated progressively, and the P2X₄ signal was completely lost by the end of the process (Fig. 5).

In congruence with the absence of manifest chromatin condensation, degenerating P2X₄-positive MNs did not display any TUNEL staining (Fig. 6A–D). On the other hand, the limited number of TUNEL-positive cells observed in the spinal cord of mSOD1^{G93A} rats had highly condensed chromatin and did not share this positive P2X₄ immunolabeling (Fig. 6E–H). Although simultaneous double immunolabeling of P2X₄ with active caspase-3 was not feasible because both antibodies were made in rabbit,

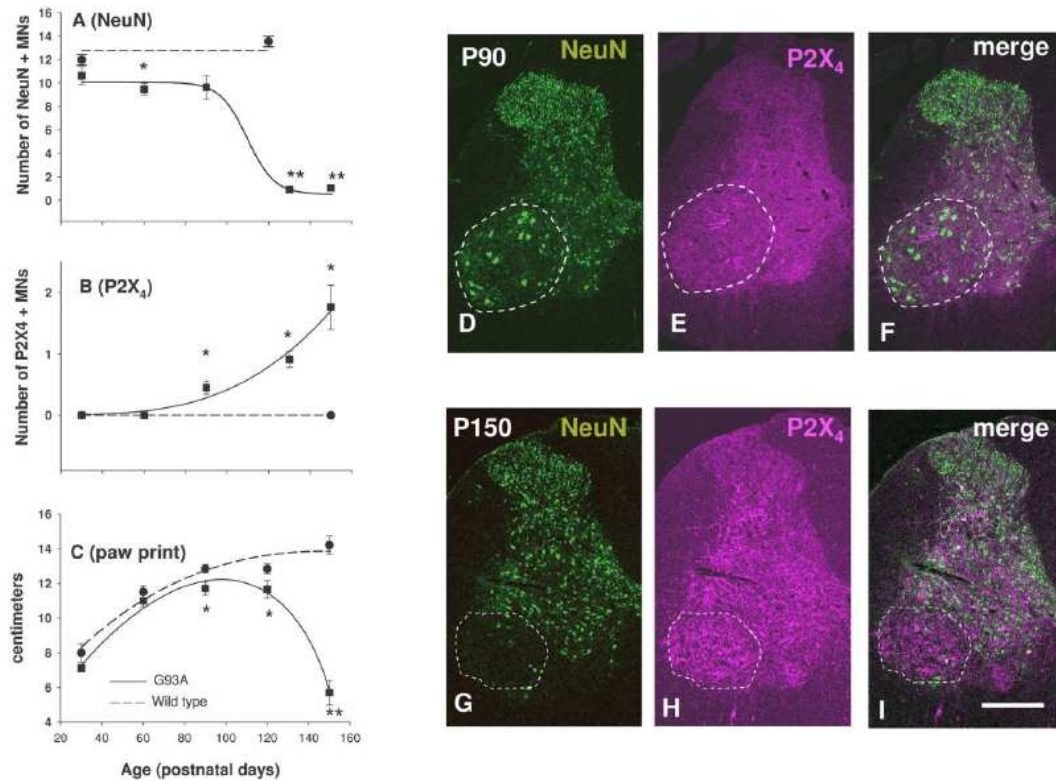


Fig. 3. Time course of P2X₄-LIR expression in mSOD^{G93A} rat spinal cord and its relationship with MN degeneration and disease progression. **A,B:** The mean ± SEM of the number of NeuN (A) or P2X₄ (B) immunopositive MNs that are present in a section of lumbar spinal cord ventral horn. **C:** The result of the paw print score is represented at different ages for mSOD^{G93A} and wild-type rats. Note the inverse relationship between the number of MNs with positive NeuN and P2X₄-LIR and the positive correlation between the number of P2X₄-immunoreactive MNs and worsening motor test performance.

D–I: Representative sections of lumbar spinal cord of mSOD^{G93A} rats at 90 (D–F) and 150 (G–I) days after double immunolabeling for NeuN (D,G, green), P2X₄ (E,H, magenta), and merged images (F,I). MN numbers were obtained after counting 20–72 sections of two animals in each condition. In the paw print scores, each point represents the average of 4–19 animals in each condition. Mann-Whitney test: **, *P* ≤ 0.0001; *, *P* < 0.01 vs wild type in A. Mann-Whitney test: *, *P* ≤ 0.0001 vs wild type in B. ANOVA test: **, *P* ≤ 0.0001; *, *P* ≤ 0.05 vs wild type in C. Scale bar = 500 μm.

when these immunoreactivities were individually studied in consecutive sections, it was clear that degenerating MNs displaying a strong P2X₄ signal did not contain any positive caspase-3 immunostaining (Fig. 6I–J). These results indicate that P2X₄-LIR is not associated with the typical cytochemistry of apoptosis. To corroborate the dissociation between apoptotic MN death and P2X₄-LIR, a series of experiments was performed following a model in which MN apoptosis was induced in young rats after peripheral nerve axotomy (Casanovas et al., 2001). It was confirmed that apoptotic MNs present in lumbar spinal cord after 3 days of sciatic nerve axotomy did not display positive P2X₄ immunolabeling (Fig. 6K,L).

Ventral, but not dorsal, axons of mSOD^{G93A} rats were positively immunostained with P2X₄ antibodies in the early stages of disease development. Even at P30, when ventral axons do not yet show appreciable degenerative

changes, such as myelin alteration, and when P2X₄ labeling in the spinal cord has not yet developed, ventral nerve roots and motor axons in the white matter display intense P2X₄ staining (Fig. 7B,E). During the end stage (P150), almost all ventral root axons are degenerating and are engulfed by phagocytic Schwann cells, which are axonal debris strongly labeled by the P2X₄ antibody (Fig. 7C,F). All these aspects are clearly reflected in Figure 7H, which shows the ratio values for the intensity of P2X₄-LIR in ventral versus dorsal roots, which is about seven times greater in mSOD^{G93A} than in wild-type rats.

Ultrastructural immunolabeling of spinal cord tissue using P2X₄ antibody from P150 mSOD^{G93A} rats showed that in addition to axons, dendrites, and degenerating neuronal bodies, P2X₄-LIR was often associated with cytoplasmic structures of ventral horn MNs that otherwise do not display any conspicuous ultrastructural

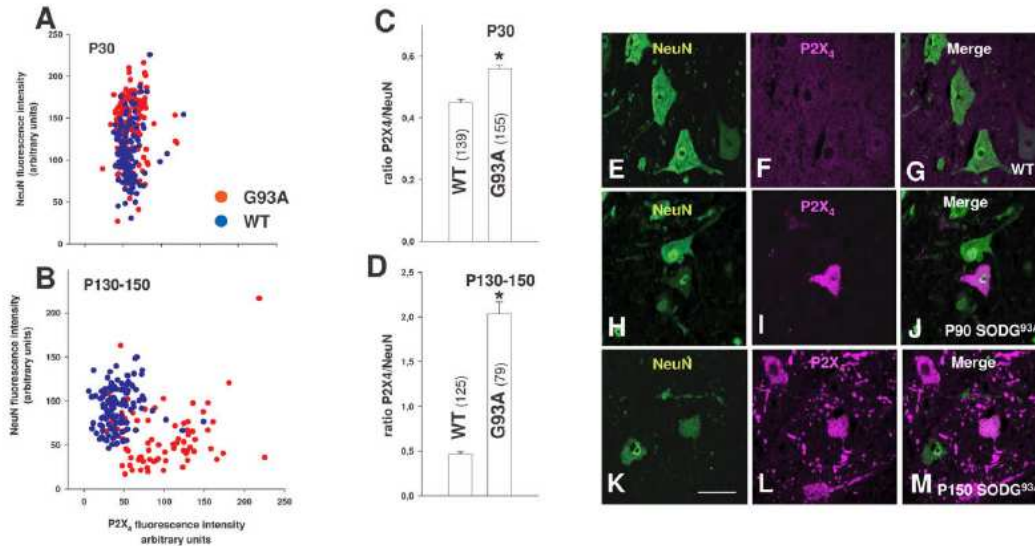


Fig. 4. Dissociation between NeuN and P2X₄ immunofluorescence intensity signals in individual MNs of clinically affected mSOD^{G93A} rats. A,B: The fluorescence intensities of NeuN and P2X₄ were measured and plotted for each large neuronal cell body at the ventral horn of wild-type and mSOD^{G93A} rats at asymptomatic (P30) or end-

terminal (P150) stages of disease. C,D: The mean of the ratio values for the P2X₄/NeuN fluorescence of all the cell bodies measured for each condition are also shown with vertical bars. Mann-Whitney test: *, $P \leq 0.0001$ vs wild type. E–M: Representative examples of the measured cell bodies. Scale bar = 50 μ m.

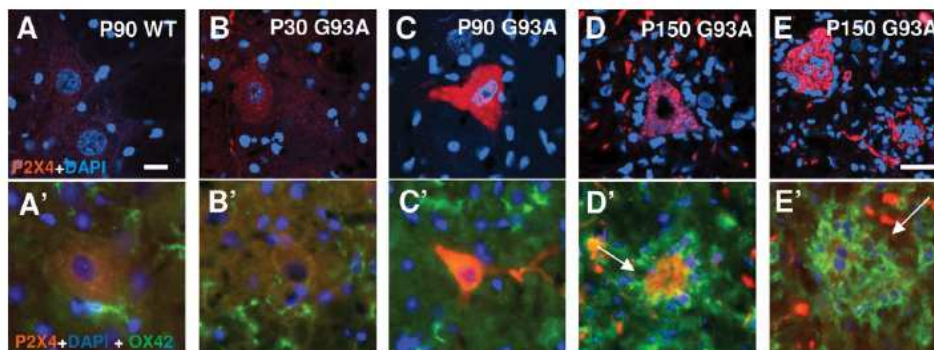


Fig. 5. Acquisition of P2X₄-LIR degenerating MNs is followed by interaction with microglia. A,A': In wild type, scarce microglial cells occasionally interact with MNs, which are devoid of P2X₄. B,B': At presymptomatic stages (P30) mSOD1^{G93A} MNs display a weak P2X₄-LIR and few microglial cells are present in ventral horn. C,C': P2X₄-

immunopositive cell bodies are first detected at P90, and many of them do not come into contact with microglia. D,D',E,E': At P150, many microglial cells are seen surrounding P2X₄-immunopositive cell bodies, with some of them suffering a process of disintegration by neuronophagia (arrows). Scale bar = 20 μ m.

changes indicative of neurodegeneration. They do not, for example, show any signs of chromatin condensation or extensive organelle damage. It seems that immunoreactive deposits are located either between or close to the surface of small membrane vesicles, with the mitochondria and cytoskeleton always being devoid of immunolabeling. On dendrites and axons, labeling showed a similar distribution: presynaptic terminals on the axodendritic synapse of P2X₄-labeled dendrites were unlabeled (Fig. 8).

We looked for P2X₄-LIR at the neuromuscular junctions in mSOD1^{G93A} rats. In some cases muscles were studied for simultaneous detection of four fluorochromes; DAPI, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, and Cy5, to reveal, respectively, the locations of DNA, nicotinic AChRs, P2X₄-LIR, and intramuscular axons (Fig. 9). No P2X₄-immunolabeled structures were found in neuromuscular synapses of wild-type animals (Fig. 9A–C). At P17, most of the endplates were found to be innervated but lacked

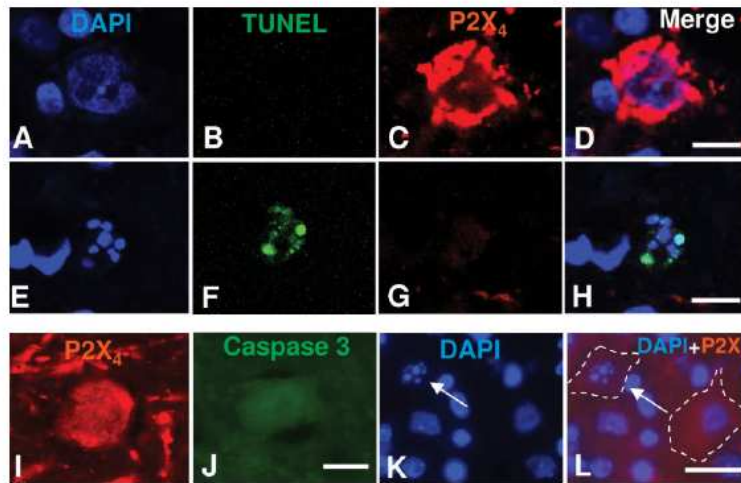


Fig. 6. Absence of association between P2X₄-LIR and cytochemical markers of apoptotic cell death. A–D: An example of a dying cells present in spinal cord of an mSOD^{G93A} rat showing that degenerating cells displaying positive P2X₄ immunoreaction (C,I) do not show either apoptotic morphology (A), TUNEL positivity (B), or positive immunostaining for active caspase 3 (J). E–H: By contrast, a cell with apoptotic nucleus

(E) displaying a positive TUNEL reaction (F), does not show positive P2X₄ immunoreaction (G). K,L: Motoneuronal apoptosis (arrows) was induced in rat lumbar spinal cord by sciatic nerve axotomy in 3-day-old postnatal rats; MNs displaying apoptotic morphology (K) do not have positive P2X₄-LIR (red in L). The somata of MNs are delimited by dashed lines in L. Scale bar = 10 μ m in A–H; 25 μ m in I–L.

appreciable amounts of P2X₄-LIR. At P30, neuromuscular junctions displaying positive P2X₄ signals associated with nerve terminals were occasionally detected on gastrocnemius muscle but not those with intramuscular axons. At P60 and P90, most of the endplates observed in the extensor digitorum longus (EDL), soleus, tibialis, and gastrocnemius, showed positive P2X₄ immunostaining associated with presynaptic terminals, as evidenced after examination of their relative locations with respect to AChRs and β -tubulin by confocal microscopy (Fig. 9D–M). However, at P150, hardly any presynaptic P2X₄-positive structures were seen; at this age, most of the endplates were denervated, whereas others exhibited plastic changes such as altered morphology of the postsynaptic apparatus that was innervated by multiple thin nerve fibers and terminals. This finding strongly suggests that they were, in fact, reinnervated synapses (Fig. 9O,S). The nerve terminals examined in these reinnervated synapses did not show any detectable P2X₄ immunolabeling. In some cases, reinnervated endplates displayed irregular deposits of P2X₄-immunoreactive materials that did not correspond either to β -tubulin-positive nerve terminals or to specific arrangements of postsynaptic membrane: they could possibly represent degenerated remnants of the original nerve terminals at this synapse (Fig. 9N–U).

Strong P2X₄-like immunoreactivity was also related to degenerating neurons in the brainstem and cerebral cortex

Because it is well established that the degenerative process affects upper and cranial motoneurons in humans and experimental ALS, as well as lower motoneurons, we wanted to search for strong P2X₄-positive degenerating

neurons in the brains of animals at the end stage of the disease. In wild-type animals, intense P2X₄-LIR was observed in association with large cell bodies of the lateral vestibular nucleus (Deiter's or magnocellularis nucleus; Fig. 10C,D) and also small mononuclear cells surrounding intracerebral blood capillaries and residing in the connective tissue of the pial surface. Neither nerve fibers nor cell bodies were found to be appreciably immunolabeled in other central nervous system regions.

As expected, degenerating motoneurons and nerve fibers heavily labeled with P2X₄ antibody were observed in G93A rats in all brainstem motor nuclei except the oculomotor (III), trochlearis (IV), and abducens (VI). It should be taken into account that MNs in the oculomotor nuclei are slow to be affected by ALS (Martin and Swash, 1995). By contrast, P2X₄-positive degenerating MNs and nerve fibers were clearly identified in the trigeminal motor nucleus (V), facial (VII), ambiguus (IX, X, and XI), and hypoglossus (XII; Fig. 10I,J). P2X₄-positive MNs in brainstem nuclei are commonly associated with activated OX42-positive microglia that often decorate both cell bodies and neurites according to a pattern similar to that observed in ventral horn MNs (data not shown). In the motor cortex, unlike in other cortical areas, P2X₄-positive large pyramidal neurons were also identified in layer V (Fig. 10A,B). All these data are congruent with the expected distribution of degenerating MNs in the rodent ALS model.

However, in addition to these structures, other neuronal groups were also found to be pathologically labeled in mSOD1^{G93A} but not in wild-type rats. These include cell bodies and fibers in the superior vestibular nucleus, some neuronal cells in the deep cerebellar nuclei, and the retic-

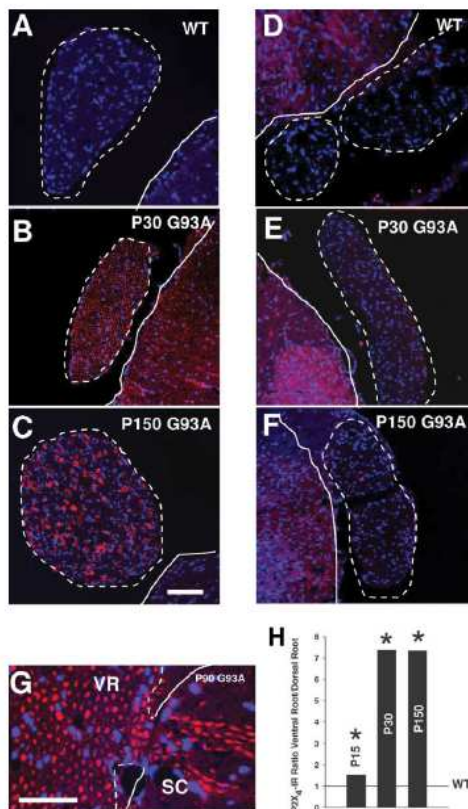


Fig. 7. P2X₄-LIR in spinal cord ventral and dorsal nerve roots from wild-type and mSOD1^{G93A} rats. A–G: In the wild type, P2X₄ labeling is nearly absent both in ventral and dorsal nerve roots (A,D). P2X₄-LIR is acquired in ventral (A–C,G) but not in dorsal (D–F), root axons in diseased mSOD1^{G93A} rats. Increased P2X₄ immunostaining is observed in the ventral axons of transgenic mSOD1^{G93A} rats as early as P30, when degenerative morphological changes had not yet developed (B). At P150, most of the ventral axons are degenerating, and the P2X₄ immunostaining remains highly elevated (C). A detail of P2X₄-immunopositive axons emerging from the spinal cord (SC) to form a ventral root (VR) is depicted in G; nerve roots are delimited by a broken line, and the spinal cord boundary is indicated by a continuous line. H: The ratio of intensity values of P2X₄ immunostaining in ventral compared with dorsal roots was measured and plotted; the horizontal line represents the value of 1 observed in wild-type animals. At least five roots were measured in each condition. Mann-Whitney test: *, $P \leq 0.002$ vs wild type. Error bars are too small to be represented. Scale bar = 100 μ m.

ular formation including the raphe nucleus. In the reticular formation, P2X₄ immunostaining was detected in degenerating serotonergic neurons (Fig. 10K). Even so, the overwhelming majority of serotonergic fibers present in the brainstem did not colocalize with P2X₄. The noradrenergic system was also affected at the end stage of the disease, because P2X₄-immunopositive degenerating neurons and fibers were clearly identified within the locus

coeruleus delimited by TH immunostaining (Fig. 10E–H). Some Purkinje cells at the cerebellar cortex were also affected, as explained below. All these data are summarized in Table 1.

Pathologically, P2X₄-labeled neurons could be easily distinguished from neurons normally expressing P2X₄. In wild-type rats, in large neurons of the lateral vestibular nucleus, which are normally P2X₄ immunoreactive, immunostaining was restricted to cell bodies and exhibited a homogeneous distribution (Fig. 10D). The same pattern was repeated in mSOD1^{G93A} rats, suggesting that this particular nucleus was not affected by the disease process (Fig. 10F). Otherwise, in strongly P2X₄-positive pathological neurons observed in G93A rats, cell body immunolabeling was heavy and extended to dendrites, showing a fragmented or granular pattern, perhaps indicative of degeneration (Fig. 10G). It is clear that strongly P2X₄-positive neuronal immunolabeling was linked to cell degeneration because in virtually all cases and regions examined, it was associated with neuronophagic microglia.

Strong P2X₄-like immunoreactivity demonstrated that cerebellar Purkinje neuronal cells degenerate in mSOD1^{G93A} rat and mouse models of ALS

The use of P2X₄ antibody as a marker for neurodegeneration in the mSOD1^{G93A} rat demonstrated that, in addition to the non-motoneuronal cells described previously, cerebellar Purkinje cells (PCs) also underwent conspicuous degenerative changes. A few P2X₄-positive degenerating PCs were first detected at P90. More abundant, strongly P2X₄-positive PCs were found in the cerebellar cortex at P150, intercalated between apparently normal neurons (Fig. 11A,B). Counts performed on three end-terminal animals (P120–P150) indicated that $2.04 \pm 0.34\%$ of PCs displayed this change. The pattern of immunostaining within a given PC showed some variability: in some cases, P2X₄ labeling delineated the whole PC (cell body and dendritic shaft) but not the axon, whereas in other cases only segments of dendritic arborization were strongly labeled, with the remaining cellular structure being only slightly labeled (Fig. 11C–E). After combining P2X₄ labeling with OX-42 immunocytochemistry for microglia, it was evident that, in almost all cases, P2X₄-positive PCs included a considerable number of attached microglial cells. Detailed observation of confocal microscope images led us to deduce that the microglia were first attracted to P2X₄ and then migrated through the space between parallel fibers to reach the PC. The microglia then conducted their phagocytic activity, and segments of the PC (i.e., the dendritic arbor) were destroyed, resulting in a loss of P2X₄ immunolabeling. Fragments of P2X₄-immunopositive material were often observed inside the cytoplasm of microglial cells in the vicinity of areas of PC destruction (Fig. 11G–I).

It is interesting to note that the nuclei of P2X₄-positive PCs did not show any appreciable alteration (i.e., chromatin condensation) compared with normal PCs after DNA staining with DAPI (Fig. 11J–M).

P2X₄-immunopositive PCs displaying features comparable to those described in rat were also detected in mSOD1^{G93A} mouse cerebellum at the end stage of the disease (Fig. 11F).

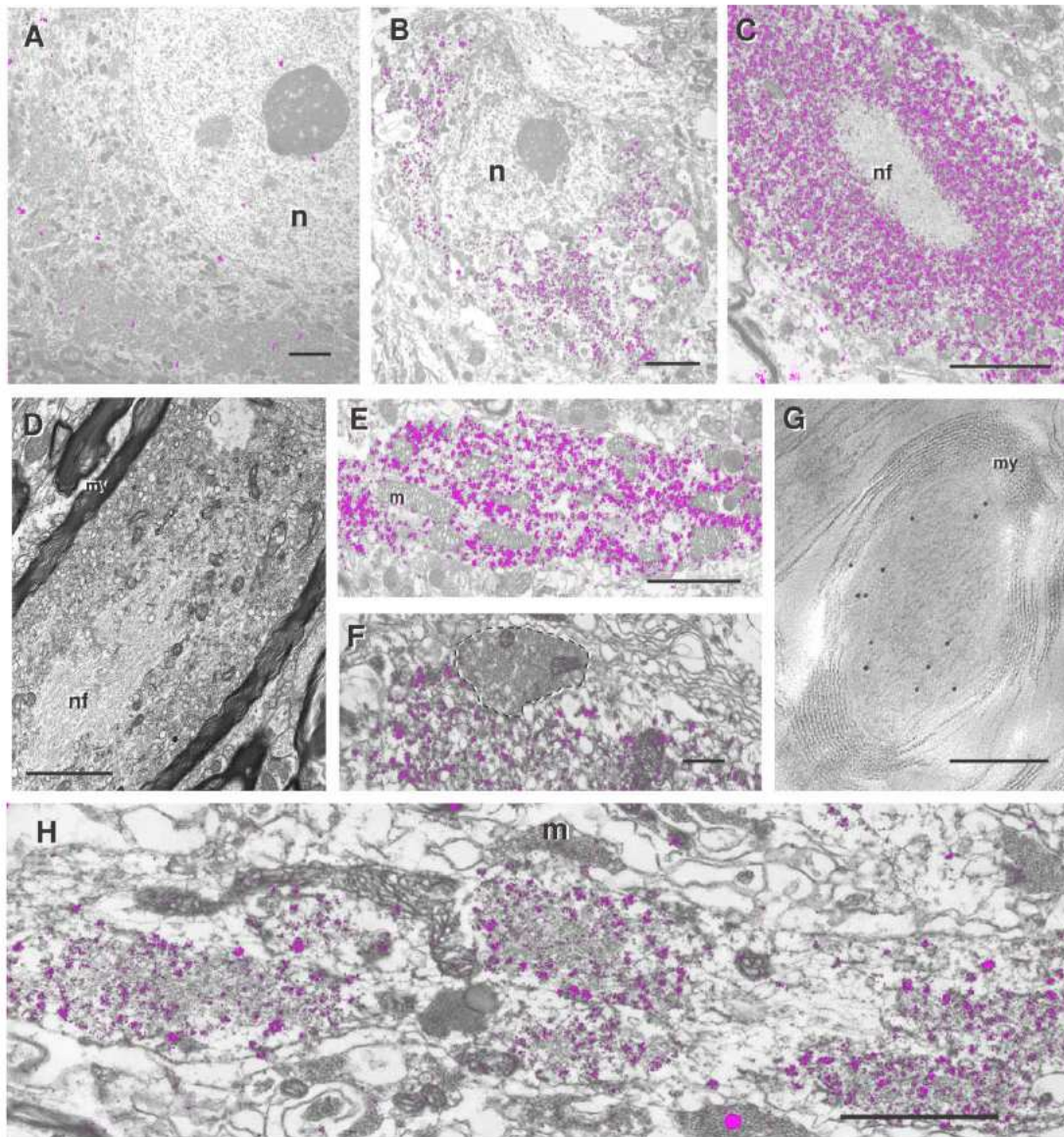


Fig. 8. Ultrastructural localization of P2X₄-LIR in lumbar ventral horn of wild-type and mSOD^{G93A} animals at the end of the terminal stage. The results of pre-embedding (A–F, H) and post-embedding (G) procedures are shown. To facilitate the identification of silver deposits in micrographs from pre-embedded immunostaining, a magenta mask obtained by image thresholding was overlaid. A: An MN cell body of a wild-type animal with scarce P2X₄ immunolabeling. n, nuclei. B: An example of an MN cell body in which P2X₄ immunolabeling was mainly located in the cytoplasm; nuclei (n) do not display chromatin condensation, and no gross degenerative changes are observed in this neuron. Detail of P2X₄ immunolabeling showing the patchy ultrastructural distribution equivalent of the granular immunostaining seen under a light microscope. C: Strongly P2X₄-labeled degenerating MN axon showing that neurofilament (nf) bundles are devoid of labeling. D: Ul-

trastructural image taken from a sample processed by conventional electron microscopy to show the aspect of a degenerating MN axon equivalent to that displayed in C but without the perturbation introduced by immunolabeling. E: High magnification of P2X₄ immunolabeling in a dendrite in which the absence of silver deposits in mitochondria (m) can be observed. F: P2X₄ deposits are seen distributed between dendritic membranous organelles; note the absence of immunolabeling in the presynaptic terminal in this axodendritic synapse (encircled). G: An example of the P2X₄ immunogold labeling in a myelinated axon obtained by the freeze-substitution postembedding procedure. my, indicates myelin sheath. Gold particles are seen concentrated in the axon. H: Detail of P2X₄-LIR showing the ultrastructural patchy distribution in a neuronal process equivalent to the granular appearance of immunostaining seen under a light microscope. Scale bar = 2 μm in A–E, H; 0.5 μm in F; 0.2 μm in G.

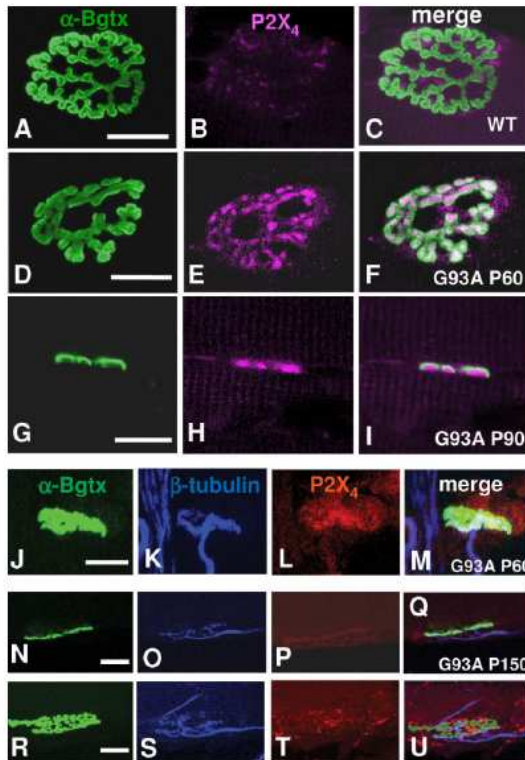


Fig. 9. P2X₄-LIR in the neuromuscular junction from wild-type (A–C) and mSOD^{G93A} (D–U) rats. Neuromuscular synaptic sites were studied after multiple fluorescent labeling: α -Bgtx (green) for AChRs, P2X₄ (magenta, in B,E,H or red, in L,P,T) and, in some cases, β -tubulin (blue). P2X₄-LIR is absent in wild-type (B) and transiently present at presynaptic nerve terminals of mSOD^{G93A} rat neuromuscular junctions (D–U). The neuromuscular junction of the soleus at P60 (D–F) or EDL muscles at P90 (G–I) were imaged under a confocal microscope. A positive P2X₄ signal with a distribution complementary to AChRs is seen in both the horizontal and lateral view, suggesting its presynaptic localization at these ages. J–M: The presynaptic localization of the P2X₄ signal was further confirmed by using an axonal marker in a P60 soleus muscle. N–U: In advanced stages of disease, presumably reinnervated neuromuscular synapses are devoid of P2X₄, as seen in this example of optical sections taken from an EDL endplate of an mSOD^{G93A} rat; a complete Z-axis projection of the same endplate is presented in R–U, in which the P2X₄-positive debris detected could represent remnants of the former degenerated presynaptic terminal. Scale bar = 20 μ m.

Specificity of P2X₄ antibody in the recognition of P2X₄ ATP-receptor protein in mSOD1^{G93A} rat spinal cord

An obvious question arising from our results is whether an upregulation of ATP-receptor protein underlay the previously mentioned changes in P2X₄ immunohistochemistry. After applying the P2X₄ antibody on Western blots from whole spinal cord extracts, two main bands were observed in both wild-type and mSOD1^{G93A} samples, with Mr of 58 and 42 kDa. A minor 30-kDa band was also

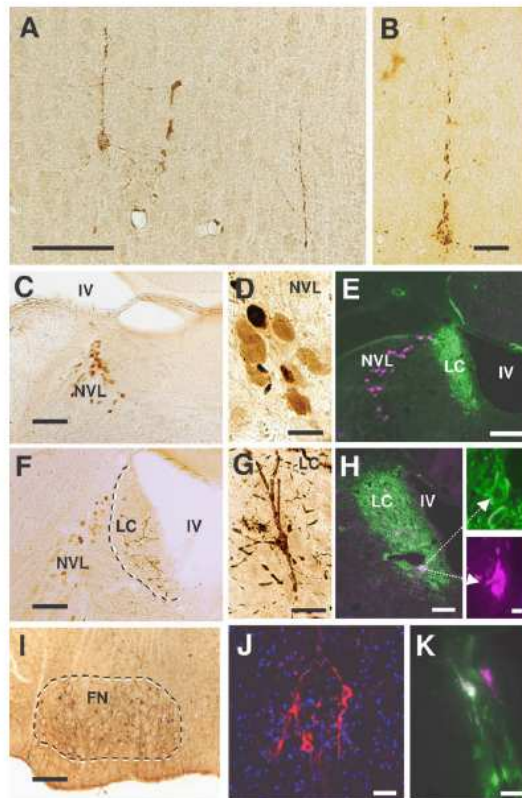


Fig. 10. A,B: P2X₄-LIR P2X₄-positive degenerating pyramidal neurons in the V layer of the motor cortex of P150 mSOD^{G93A} rat. C,D: P2X₄-positive neurons normally present in the lateral vestibular nucleus (NVL) of wild-type rats showing the fine homogeneous distribution of P2X₄-immunopositive material within cell bodies; IV indicates IV ventricle. E: Double fluorescent labeled image taken from the brainstem of a P90 mSOD^{G93A} rat showing the distribution of P2X₄-LIR (magenta) and tyrosine hydroxylase (green) in a plane containing the lateral vestibular nucleus (NVL) and locus coeruleus (LC); at this age, pathological P2X₄ immunopositivity has not yet developed. F–H: An equivalent section taken from P120–150 mSOD^{G93A} rats demonstrates the presence of degenerating P2X₄-immunopositive neurons in the LC: a high-magnification image of a degenerating LC neuron with the coarse granular appearance of P2X₄-immunoreactive material is shown in G; the noradrenergic nature of P2X₄-positive degenerating LC neurons is demonstrated after double fluorescent labeling of P2X₄ (magenta) and tyrosine hydroxylase (green), seen in H. I: Transversal section of the brainstem of a P150 mSOD^{G93A} rat showing the facial nucleus (FN, encircled) enriched in immunoperoxidase-stained P2X₄-positive degenerating MNs. J: P2X₄-positive degenerating MNs (red) from a P120 mSOD^{G93A} rat are also concentrated in the nucleus ambiguus; nuclei were counterstained with DAPI (blue). K: Double fluorescent labeling of neuronal cells in the raphe nucleus demonstrating that some degenerating P2X₄-positive neurons (magenta) colocalize (white) with serotonin labeling (green). Scale bar = 100 μ m in A,C,F,H; 50 μ m in B,D,G,J; 200 μ m in E,I; 25 μ m in K; 20 μ m in insets in H.

detected but only in whole extracts of mSOD1^{G93A}. To follow the changes in these protein bands more closely, throughout the course of the disease, analysis was per-

TABLE 1. Brain and Brainstem Distribution of P2X₄ in mSOD^{G93A} Rat as Revealed by Immunohistochemistry¹

Distribution of P2X ₄ -LIR	mSOD ^{G93A}	WT
Oculomotor nucleus	-	-
Trochlearis nucleus	-	-
Abducens nucleus	-	-
Motor trigeminal nucleus	+++	-
Facial nucleus	+++	-
Ambiguous nucleus	+++	-
Hypoglossal nucleus	+++	-
Motor cortex (pyramidal neurons, layer V)	++	-
Hippocampus	-	-
Cerebellar cortex (Purkinje neurons)	+	-
Cerebellar cortex (granular layer)	-	-
Locus coeruleus	++	-
Superior vestibular nucleus	++	-
Lateral vestibular nucleus	++	++
Reticular formation	+/++	-
Raphis nucleus	+/++	-
Inferior olivary complex	-	-

The proportion of P2X₄ immunopositive neurons at the distinct regions was scored according to: 1–10% (+), 10–50% (++), >50% (+++), absence of immunostaining (-). mSOD^{G93A}, subtype G93A of mutated superoxide dismutase; P2X₄-LIR, P2X₄-like immunoreactivity; WT, wild type.

formed after fractionation of whole extracts. The 58- and 42-kDa bands were concentrated in the crude membrane fraction, and no gross changes were detected in samples taken from ages P30 to P90 when they were compared with controls. However, in extracts from end-terminal diseased animals (P120–150), a strong upregulation of the 58-kDa band was observed (Fig. 12A). In the soluble fraction, a 42-kDa band was observed in wild-type and mSOD1^{G93A} animals that persisted without appreciable changes under all the conditions studied. We also clearly detected 30 kDa in the soluble fraction. This band was only present in transgenic mSOD1^{G93A} animals and was observed in increasing amounts from P30 to end-terminal ages (Fig. 12B). Immunostaining of all the described protein bands was eliminated when the antibody was preincubated with the immunizing peptide.

DISCUSSION

In this paper, we show that a commercially available antibody against P2X₄ ATP-receptor protein selectively binds degenerating MNs in transgenic rat and mouse ALS models. In addition, the ability of this antibody to detect damaged neurons allowed us to unmask neuronal pathology in central nervous system areas that are not usually thought to be affected by the course of the ALS disease process. Thus, in spite of uncertainties about the physiological significance of the P2X₄-LIR described here in animals with ALS, the use of the antibody as a marker provided a unique and valuable tool for revealing sick neurons in these models. It is interesting to note that the affected neurons did not display any other changes commonly associated with other types of neuronal degeneration, such as cell death, caspase-3 activation, or TUNEL staining. Our results concerning the lack of apoptotic morphology in degenerating MNs in transgenic rats are in accordance with those reported in other studies relating to transgenic ALS mice (Migheli et al., 1999; Guégan and Przedborski, 2003; Martin et al., 2007) and with the lack of upregulation of cell death-associated genes (Perrin et al., 2005, 2006).

The acquisition of P2X₄-LIR should be considered in the context of several other alterations that have been de-

scribed in MNs before cellular death in ALS models. These include: mitochondrial alterations, fragmentation of the Golgi apparatus (Mourelatos et al., 1996), impairment of axonal transport (Zhang et al., 1997; Williamson and Cleveland, 1999; Dupuis et al., 2000), retraction of neuromuscular synapses (Fischer et al., 2004; Pun et al., 2006), deposits of ubiquitinated materials, astroglial changes and loss of EAAT2 (Howland et al., 2002), chaperone downregulation (Maatkamp et al., 2004), upregulation of transcription factor ATF3 (Vlug et al., 2005), and changes in other genes involved in cell growth and maintenance (Perrin et al., 2005). Nevertheless, P2X₄-LIR appears along with the first clinical symptomatology, indicating its association with motoneuronal dysfunction. The observed inverse relationship between NeuN and P2X₄ may be a sign of this abnormality. NeuN is a neuron-specific nuclear protein (Mullen et al., 1992) that has been used to follow motoneuronal loss in the transgenic mouse (Hafezparast et al., 2003).

Although the number of NeuN-positive cells decreased under several pathological conditions, this finding does not necessarily imply neuronal death, but rather the depletion of NeuN protein or loss of protein antigenicity associated with neuronal injury (Unal-Cevik et al., 2004). In our case, MNs that had lost NeuN displayed cytological phenotypes ranging from near normal to obvious cellular destruction with P2X₄-LIR always being upregulated. There can be no doubt that NeuN-negative/P2X₄-positive MNs were irrevocably damaged, because once P2X₄ positivity was acquired, MNs attracted microglial cells, which initiated a process of neuronophagia that culminated in MN loss. Whether a P2X₄-immunoreactive protein is involved in the activation and targeting of microglia to altered MNs remains to be determined. This is a very important point, because it is already well established that motoneuronal injury in ALS is strongly influenced by microglial cells (Beers et al., 2006; Moisse and Strong, 2006), which are also considered presumably significant cellular targets for ALS therapy.

The attainment of P2X₄ positivity was not only confined to the cell body but also extended to the dendrites and axons. At the motor terminals, P2X₄-LIR was moderate but only clearly visible in the early and intermediate stages of the disease. If this was an expression of the dying-back neurodegenerative process observed in SOD1^{G93A} mice (Fischer et al., 2004; Gould et al., 2006), it should be investigated further.

Another relevant question deriving from our results relates to molecular substrate and strong P2X₄-LIR. It should first be noted that the P2X₄ antibody that we used has already been extensively applied to detect P2X₄ receptors in different cells and tissues with satisfactory results in terms of its specificity (see, for example, Rubio and Soto, 2001; Atkinson et al., 2003; Qiao et al., 2003; Doctor et al., 2004; Nasu-Tada et al., 2006; Yeung et al., 2006). Moreover, in brain and other tissues of P2X₄ knockout mice, the same antibody was unable to detect any signal by Western blotting or immunocytochemistry (Sim et al., 2006). By using Western blotting, we detected two protein bands in the expected range of the P2X₄ molecular weight in crude membrane fraction extracts of the spinal cord. These bands were eliminated when the antibody was preincubated with the immunizing peptide. The glycosylation

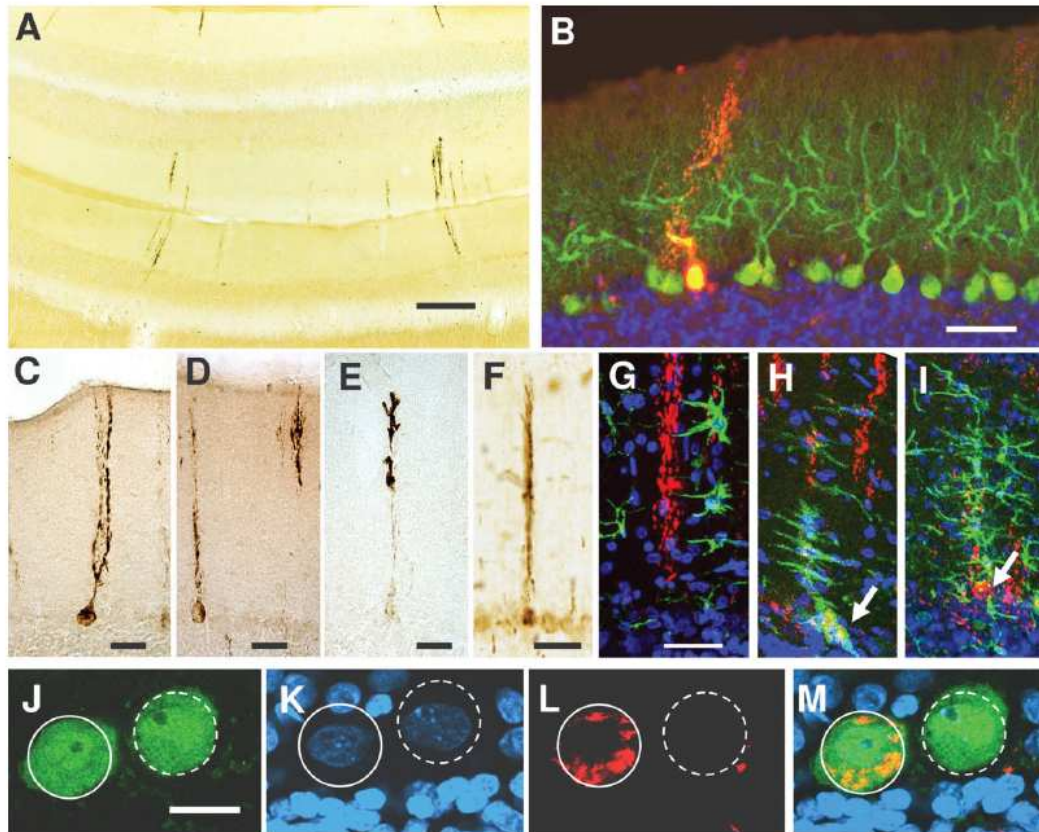


Fig. 11. P2X₄-LIR detects degenerating PCs in P150 mSOD^{G93A} rat cerebellum. **A:** Low-magnification view of transverse section of cerebellum processed for P2X₄ immunoperoxidase staining in which sparsely distributed positive PCs are seen. **B:** P2X₄-positive PCs (red) are intercalated between apparently normal ones immunostained with calbindin (green); the sample was also labeled with DAPI, which clearly delineates the granular cell layer. **C–E:** details of P2X₄-positive immunoperoxidase-stained PCs showing an example of the distinct patterns observed, which range from whole cell (**C**) to dendrite segmental staining (**D,E**). **F:** P2X₄-positive immunoperoxidase-stained PCs are also present in P120 end-terminal mSOD^{G93A} mouse cerebellum. **G–I:** Triple fluorescent labeling showing P2X₄-immunoreactive PC (red) in combination with the microglial cell marker OX-42 (green) and nuclear DAPI staining (blue) to demonstrate that activated microglial cells mi-

grate toward P2X₄-positive PCs and carry out a cell destruction process that proceeds according to the following steps: (**G**) extended microglial cell processes make early contact with P2X₄-positive PC dendrites; (**H**) horizontally extended microglial cells reach and cover a P2X₄-positive PC in a process of neuronophagic disintegration and loss of P2X₄-LIR; (**I**) An almost completely destroyed P2X₄-positive PC with microglial accumulation is seen. **J–M:** Degenerating PCs do not display changes in chromatin organization, as shown in this triple fluorescent high-magnification photo in which the nuclear structure of a P2X₄-negative, apparently normal, PC (encircled by a dashed line) can be compared with a neighboring P2X₄-positive degenerating PC (encircled by a continuous line). Triple immunolabeling was as follows: (**J**) calbindin in green; (**K**) DAPI in blue; (**L**) P2X₄ in red; and (**M**) merged. Scale bar = 250 μ m in **A**; 40 μ m in **B–I**; 20 μ m in **J–M**.

of the P2X₄ receptor may explain the observed variability in molecular weight, as the protein has six (North, 2002) or seven (Rettinger et al., 2000) sites for *N*-glycosylation.

A good relationship does not exist between changes in the number of these P2X₄ protein bands and data from P2X₄ immunocytochemistry throughout the course of the disease because significant P2X₄ protein upregulation is only observed in samples from end-terminal mSOD1^{G93A} animals. However, the 30-kDa band present in the soluble

fraction extracts showed a profile that overlapped, even exhibiting increased sensitivity, with that of P2X₄ immunocytochemistry. This was because a 30-kDa band was clearly observed after P30 in mSOD1^{G93A} but was absent in wild-type animals. At present, we do not know whether 30 kDa is a protein that is unrelated to P2X₄ but shares certain epitopes with it or whether it is a product of P2X₄ cleavage resulting from altered processing of this protein in ALS MNs.

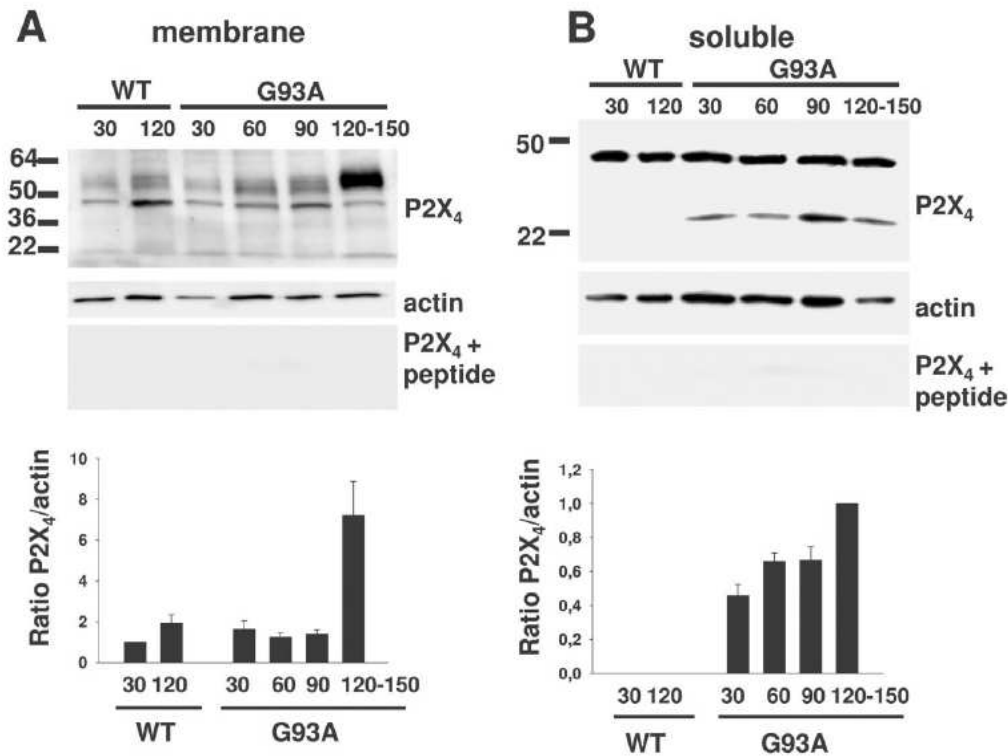


Fig. 12. Identification by Western blot of protein bands recognized by P2X₄ antibody in fractionated rat spinal cord tissue. A: Crude membrane extracts. B: Soluble fraction. The relative amounts of

protein in the bands are represented by vertical bars. Data were obtained from seven SDS-PAGE separations from three independent tissue samplings and extractions.

It is interesting to note that P2X₄ receptors, but no other P2X receptors, are subjected to intense membrane internalization and recycling (Bobanovic et al., 2002). There is also increased delivery of endosomal P2X₄ receptors to lysosomes and/or other proteolytic pathways, which could explain the appearance of abnormal fragments in this protein. In fact, altered internalization and lysosomal degradation of a membrane protein has already been documented in the ALS cellular model (Vanoni et al., 2004). In addition, perturbation of proteins and membrane vesicle trafficking through the secretory pathway has been recognized in MNs of transgenic ALS animal models (Urushitani et al., 2006) and also after excitotoxicity (Tarabal et al., 2005). The validity of this hypothesis will be specifically addressed in further experiments.

Activation of purinergic signaling through ionotropic P2X receptors by ATP released at synapses, axons, and glial cells forms part of the complex events involved in neuronal and neuroglial communication in physiological and pathological states (for review, see Fields and Burnstock, 2006; Burnstock, 2007). Changes in the expression of P2X₁ and P2X₂ subtypes of ATP receptors have been observed in axotomized facial MNs (Kassa et al., 2007). P2X₄ was not studied in this work but was found in in-

creased concentrations in axotomized vagal MNs in another study (Atkinson et al., 2003). The P2X₄ subtype of ATP receptors has been found to be upregulated in several models of neuronal injury but is generally associated with an activated macrophage/microglial cellular population and with the generation of neuropathic pain (Cavaliere et al., 2003; Guo and Schluesener, 2005; Guo et al., 2005; Franke and Illes, 2006; Trang et al., 2006; Zhang et al., 2006). As far as we know, there has only been one reported description of P2X₄-immunopositive degenerating neuronal bodies and neurites in rat spinal cord after physical injury (Schwab et al., 2005). This suggests that this property may not be exclusive to MN degeneration in ALS models.

The involvement of P2X₄ receptors in the modulation of MN degeneration has been recently reported in association with the protective effects of low concentrations of ATP and ivermectin on kainate-induced MN excitotoxicity (Andries et al., 2007). In the same study, it was found that ivermectin was able to prevent MN degeneration and extend survival times for SOD1^{G93A} mice. In the context of our findings, these are intriguing results because they define P2X₄ as a molecular target for ALS therapy. This should be further investigated in order to understand its

role in neuronal degeneration in ALS and perhaps in other pathologies.

Although motoneuronal degeneration is considered the hallmark of ALS pathology, we also observed, confirming other observations (Martin and Swash, 1995), that other neuronal populations could also be affected.

The superb ability of P2X₄ antibody to detect degenerating neurons allowed us to demonstrate that other neuronal populations, besides MNs, were also affected in transgenic ALS animal models. These include serotonin-containing neurons of the raphe, noradrenergic neurons at the locus coeruleus, and PCs in the cerebellum. In all these cases, strongly P2X₄-positive labeling indicates neuronal degeneration because activated microglia are selectively recruited by these cells to begin a neuronophagia, as seen in MNs. The involvement of a serotonergic system in human and experimental ALS has been consistently observed in studies in which serotonin or its receptors have been found to be reduced at early stages of the disease (Turner et al., 2005; Sandyk, 2006).

In addition, pharmacological potentiation of serotonergic neurotransmission delays weakness and mortality in SOD1^{G93A} mice (Turner et al., 2003). Although the involvement of noradrenergic neurons in animal ALS models has yet to be described, the occurrence of neuronal degeneration in the locus coeruleus, which sometimes includes Bunina bodies, has been described in isolated human ALS cases (Iwanaga et al., 1997; Machida et al., 1999). It is interesting to note that norepinephrine-containing neurons in the locus coeruleus primarily project to the ventral horn spinal cord (Aston-Jones et al., 1995) and that this descending pathway has modulatory effects on spinal cord motoneuron activity (Liu et al., 1995).

Even though circulating autoantibodies against P-type calcium channels have been found in ALS patients (Llinás et al., 1993), and spinocerebellar involvement has been detected in ALS (Hudson, 1981), there was no consistent evidence of cerebellar pathology in human or transgenic animal models of ALS. Even so, it should perhaps be added that a loss of PCs was reported in a case of familial ALS (Hirano et al., 1967). Here we show that PCs are unambiguously affected in SOD1^{G93A} mice and rats. This should be taken into account because the cerebellum of transgenic animals has been used as a control tissue in several studies. Degenerating P2X₄-positive PCs do not display changes indicative of apoptosis, but—as also seen in the other neuronal types described in this paper—they constitute an attractive focus for the microglia, which migrate to the PC body and dendrites through the interstices between parallel fibers at the molecular layer. Complex mechanisms involving apoptotic, nonapoptotic, and autophagic pathways have been seen to be involved in developmental PC death and in other models of cerebellar degeneration (Baurle et al., 2006; Dusart et al., 2006) in which microglial activation seems to play a primordial role (Marin-Teva et al., 2004). The further study of P2X₄ expression in these models may help us to understand its role in different neuronal death pathways.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Imma Montoliu and Xavier Calomarde for their technical assistance and Victoria Ayala for helping in animal genotyping. Special thanks go to Mara Diers-

sen and Gloria Arqué for their excellent help with behavioral analysis of transgenic rats. We also thank Jordi Calderó for helpful comments on the article and Manel Portero for helping with the management of our mSOD1^{G93A} rat colony.

LITERATURE CITED

- Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. 2001. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57:1282–1289.
- Andries M, Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L. 2007. Ivermectin inhibits AMPA receptor-mediated excitotoxicity in cultured motor neurons and extends the life span of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 25:8–16.
- Aston-Jones G, Shipley MT, Grzanna R. 1995. The locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. New York: Academic Press. p 197–201.
- Atkinson L, Shigetomi E, Kato F, Deuchars J. 2003. Differential increases in P2X receptor levels in rat vagal efferent neurones following a vagal nerve section. *Brain Res* 977:112–118.
- Baurle J, Kranda K, Frischmuth S. 2006. On the variety of cell death pathways in the Lurcher mutant mouse. *Acta Neuropathol Berlin* 112:691–702.
- 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* 24:16021–16026.
- Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD. 2002. P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* 22:4814–4824.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312:1389–1392.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72:248–254.
- Brosenitsch TA, Adachi T, Lipski J, Housley GD, Funk GD. 2005. Developmental downregulation of P2X3 receptors in motoneurons of the compact formation of the nucleus ambiguus. *Eur J Neurosci* 22:809–824.
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27:723–749.
- Burnstock G. 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659–797.
- Casanovas A, Ribera J, Hager G, Kreutzberg GW, Esquerda JE. 2001. c-Jun regulation in rat neonatal motoneurons postaxotomy. *J Neurosci Res* 63:469–479.
- Cavaliere F, Florenzano F, Amadio S, Fusco FR, Viscomi MT, D'Ambrosi N, Vacca F, Sancesario G, Bernardi G, Molinari M, Volonte C. 2003. Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience* 120:85–98.
- Costa AC, Walsh K, Davisson MT. 1999. Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiol Behav* 68:211–220.
- 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.
- Doctor RB, Matzakos T, McWilliams R, Johnson S, Feranchak AP, Fitz JG. 2005. Purinergic regulation of cholangiocyte secretion: identification of a novel role for P2X receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:779–786.
- Dupuis L, de Tapia M, Rene F, Lutz-Bucher B, Gordon JW, Mercken L, Pradier L, Loeffler JP. 2000. Differential screening of mutated SOD1 transgenic mice reveals early up-regulation of a fast axonal transport component in spinal cord motor neurons. *Neurobiol Dis* 7:274–285.
- Dusart I, Guenet JL, Sotelo C. 2006. Purkinje cell death: differences between developmental cell death and neurodegenerative death in mutant mice. *Cerebellum* 5:163–173.
- Fields RD, Burnstock G. 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7:423–436.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD. 2004. Amyotrophic lateral

- sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185:232–240.
- Franke H, Illes P. 2006. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther* 109:297–324.
- Franke H, Krugel U, Illes P. 2006. P2 receptors and neuronal injury. *Pflügers Arch* 452:622–644.
- Friedlander RM, Gagliardini V, Hara H, Fink KB, Li W, MacDonald G, Fishman MC, Greenberg AH, Moskowitz MA, Yuan J. 1997. Expression of a dominant negative mutant of interleukin-1 beta converting enzyme in transgenic mice prevents neuronal cell death induced by trophic factor withdrawal and ischemic brain injury. *J Exp Med* 185: 933–940.
- Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW. 2006. Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 34:8774–8786.
- Guégan C, Przedborski S. 2003. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest* 111:153–161.
- Guégan 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 LH, Schluesener HJ. 2005. Lesional accumulation of P2X₄ receptor (+) macrophages in rat CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* 134:199–205.
- Guo LH, Trautmann K, Schluesener HJ. 2005. Expression of P2X₄ receptor by lesionally activated microglia during formalin-induced inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 163:120–127.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772–1775.
- Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM. 2003. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300:808–812.
- Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. 1998. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23:249–256.
- Hirano A, Kurland LT, Sayre G.P. 1967. Familial amyotrophic lateral sclerosis. A subgroup characterized by posterior and spinocerebellar tract involvement and hyaline inclusions in the anterior horn cells. *Arch Neurol* 16:232–243.
- 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.
- Hudson AJ. 1981. Amyotrophic lateral sclerosis and its association with dementia, parkinsonism and other neurological disorders: a review. *Brain* 104:217–247.
- Iwanaga K, Wakabayashi K, Honma Y, Takahashi H. 1997. Amyotrophic lateral sclerosis: occurrence of Bunina bodies in the locus ceruleus pigmented neurons. *Clin Neuropathol* 16:23–26.
- Kang SJ, Sanchez I, Jing N, Yuan J. 2003. Dissociation between neurodegeneration and caspase-11-mediated activation of caspase-1 and caspase-3 in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 23:5455–5460.
- Kassa RM, Bentivoglio M, Mariotti R. 2007. Changes in the expression of P2X₁ and P2X₂ purinergic receptors in facial motoneurons after nerve lesions in rodents and correlation with motoneuron degeneration. *Neurobiol Dis* 25:121–133.
- Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. 1997. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 277:559–562.
- Li M, Ona VO, Guégan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM. 2000. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288:335–339.
- Liu RH, Fung SJ, Reddy VK, Barnes CD. 1995. Localization of glutamatergic neurons in the dorsolateral pontine tegmentum projecting to the spinal cord of the cat with a proposed role of glutamate on lumbar motoneuron activity. *Neuroscience* 64:193–208.
- Lundy PM, Hamilton MG, Mi L, Gong W, Vair C, Sawyer TW, Frew R. 2002. Stimulation of Ca(2+) influx through ATP receptors on rat brain synaptosomes: identification of functional P2X₇ receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 135:1616–1626.
- Linás 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.
- Maatkamp A, Vluc A, Haasdijk E, Troost D, French PJ, Jaarsma D. 2004. Decrease of Hsp25 protein expression precedes degeneration of motoneurons in ALS-SOD1 mice. *Eur J Neurosci* 20:14–28.
- Machida Y, Tsuchiya K, Anno M, Haga C, Ito T, Shimo Y, Wakeshima T, Iritani S, Ikeda K. 1999. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis with multiple system degeneration: a report of an autopsy case without respirator administration. *Acta Neuropathol Berlin* 98:512–515.
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 19:535–547.
- Martin JE, Swash M. 1995. The pathology of motor neuron disease. In: Leigh PN, Swash M, editors. *Motor neuron disease*. Berlin: Springer-Verlag. p 92–118.
- 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 mitochondrialopathy and cell death. *J Comp Neurol* 500:20–46.
- Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H. 2006. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 83: 119–133.
- Migheli A, Atzori C, Piva R, Tortarolo M, Girelli M, Schiffer D, Bendotti C. 1999. Lack of apoptosis in mice with ALS. *Nat Med* 5:966–967.
- Milligan CE, Cunningham TJ, Levitt P. 1991. Differential immunohistochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 314:125–135.
- Moisse K, Strong MJ. 2006. Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:1083–1093.
- Mourelatos Z, Genatas NK, Stieber A, Gurney ME, Dal Canto MC. 1996. The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu, Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5472–5477.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201–211.
- 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.
- Nasu-Tada K, Koizumi S, Tsuda M, Kunifusa E, Inoue K. 2006. Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X₄, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia* 53:769–775.
- North RA. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 4:1013–1067.
- Pasinelli P, Brown RH. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7:710–723.
- Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH Jr, Cleveland DW. 2000. Free in PMC Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu, Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13901–13906.
- Perrin FE, Boisset G, Docquier M, Schaad O, Descombes P, Kato AC. 2005. No widespread induction of cell death genes occurs in pure motoneurons in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Hum Mol Genet* 14:3309–3320.
- Perrin FE, Boisset G, Lathuilière A, Kato AC. 2006. Cell death pathways differ in several mouse models with motoneuron disease: analysis of pure motoneuron populations at a presymptomatic age. *J Neurochem* 98:1959–1972.
- Pun S, Santos AF, 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.
- Qiao R, Zhou B, Liebler JM, Li X, Crandall ED, Borok Z. 2003. Identifica-

- tion of three genes of known function expressed by alveolar epithelial type I cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:98–105.
- Rettinger J, Aschrafi A, Schmalzing G. 2000. Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X₁ receptor. *J Biol Chem* 275:33542–33547.
- Rubio ME, Soto F. 2001. Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21:641–653.
- Rubio ME, Wenthold RJ. 1999. Differential distribution of intracellular glutamate receptors in dendrites. *J Neurosci* 19:5549–5562.
- Sandyk R. 2006. Serotonergic mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Neurosci* 116:775–826.
- Schwab JM, Guo L, Schluesener HJ. 2005. Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X₄ receptor expression. *J Neuroimmunol* 163:185–189.
- Sim JA, Chaumont S, Jo J, Ulmann L, Young MT, Cho K, Buell G, North RA, Rassendren F. 2006. Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X₄ knock-out mice. *J Neurosci* 26:9006–9009.
- Stoeckel ME, Uhl-Bronner S, Hugel S, Veinante P, Klein M.J., Mutterer J, Freund-Mercier MJ, Schlichter R. 2003. Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X₂ subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 457:159–174.
- Tarabal O, Calderó 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.
- Trang T, Beggs S, Salter MW. 2006. Purinoceptors in microglia and neuropathic pain. *Pflugers Arch* 452:645–652.
- Turner BJ, Lopes EC, Cheema SS. 2003. The serotonin precursor 5-hydroxytryptophan delays neuromuscular disease in murine familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4:171–176.
- Turner MR, Rabiner EA, Hammers A, Al-Chalabi A, Grasby PM, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN. 2005. [¹¹C]-WAY100635 PET demonstrates marked 5-HT_{1A} receptor changes in sporadic ALS. *Brain* 128:896–905.
- Unal-Cevik I, Kilinc M, Gursay-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T. 2004. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res* 1015:169–174.
- 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.
- Vanoni C, Massari S, Losa M, Carrega P, Perego C, Conforti L, Pietrini G. 2004. Increased internalisation and degradation of GLT-1 glial glutamate transporter in a cell model for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Cell Sci* 117:5417–5426.
- Vlug AS, Teuling E, Haasdijk ED, French P, Hoogenraad CC, Jaarsma D. 2005. ATF3 expression precedes death of spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis-SOD1 transgenic mice and correlates with c-Jun phosphorylation, CHOP expression, somato-dendritic ubiquitination and Golgi fragmentation. *Eur J Neurosci* 22:1881–1894.
- Vukosavic S, Stefanis L, Jackson-Lewis V, Guégan C, Romero N, Chen C, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. 2000. Delaying caspase activation by Bcl-2: a clue to disease retardation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 20:9119–9125.
- 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.
- Witting A, Walter L, Wacker J, Moller T, Stella N. 2004. P2X₇ receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3214–3219.
- Xiang Z, Burnstock G. 2005. Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development. *Glia* 52:119–126.
- Yeung D, Zablocki K, Lien CF, Jiang T, Arkle S, Brutkowski W, Brown J, Lochmuller H, Simon J, Barnard EA, Gorecki DC. 2006. Increased susceptibility to ATP via alteration of P2X receptor function in dystrophic mdx mouse muscle cells. *FASEB J* 20:610–620.
- 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 Z, Artelt M, Burnet M, Trautmann K, Schluesener HJ. 2006. Lesional accumulation of P2X₄ receptor+ monocytes following experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 197:252–257.

Neurotoxic species of misfolded SOD1^{G93A} that can be recognized by antibodies against the P2X4 subunit of the ATP receptor accumulate in damaged neurons of transgenic animal models of amyotrophic lateral sclerosis

Sara Hernández, BS, Anna Casanovas, MD, PhD, Lidia Piedrafita, BS, Olga Tarabal, PhD and Josep E. Esquerda, MD, PhD

Universitat de Lleida, Facultat de Medicina, Departament de Medicina Experimental, Unitat de Neurobiologia Cel·lular, and IRBLLEIDA, Lleida, Catalonia, Spain.

Address for correspondence and reprint requests to: Josep E. Esquerda, Universitat de Lleida, Departament de Medicina Experimental, Montserrat Roig 2, 25008, Lleida.
Phone: +34-973702427. Fax: +34-973702426. E-mail: Josep.esquerda@mex.udl.cat

Supported by Grant SAF2008-03001, from the Ministerio de Ciencia e Innovación, and by grant 063030 from the Fundació La Marató de TV3.

Running title: Detection of neurotoxic mutant SOD1 in ALS

Abstract

We have recently described how degenerating motor neurons of SOD1^{G93A} rodents exhibit intense immunoreactivity to P2X₄ antibodies. Neurons with strong P2X₄-like immunoreactivity (P2X₄-LIR) are often associated with microglial cells displaying neuronophagic activity and do not show apoptotic phenotype when dying. After western blot analysis, it was found that, in addition to P2X₄ ATP receptor protein, P2X₄ antibodies recognize a hitherto unidentified low MW band. The objective of this work was to identify the molecular counterpart of the strong P2X₄-LIR observed in association with neuronal degeneration in SOD1^{G93A} animals. After MALDI-TOF, we found that the low MW, P2X₄-immunoreactive protein was SOD1. Further analysis demonstrated that P2X₄ antibody recognizes a form of misfolded mutant SOD1^{G93A} which is expressed in neuronal cells undergoing degeneration but not in glial cells. No positive P2X₄ immunostaining was detected in mice overexpressing human WT SOD1. When affinity chromatography-isolated P2X₄-immunoreactive SOD1^{G93A} species were injected intracerebrally they promote microglial and astroglial activation. We concluded that cross-reactivity could have been due to the abnormal exposure of an epitope in the inner hydrophobic region of SOD1 which shared structural homology with the P2X₄ immunizing peptide that was used for raising the antibody.

Key Words: ALS; SOD1; P2X₄; microglia; protein misfolding; anti-SOD1 antibody; astroglia.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset neurodegenerative disease that affects the upper and lower motoneurons (MNs) in the cerebral cortex, brain stem and spinal cord. It results in progressive MN loss, muscle paralysis and atrophy leading to death within a few years. Most ALS cases occur sporadically but ~10 % are inherited or familial (FALS). In about 20 % of patients with FALS the disease is caused by mutations in the gene encoding Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) (see 1 for review). Transgenic animals overexpressing mutant SOD1 develop a disease with clinical and pathological similarities to human FALS (2, 3). However, ALS does not develop in SOD1-deficient mice (4). Although the mechanism by which SOD1 mutants cause MN death is still unknown, there is now general consensus that the involvement of mutant SOD1 in ALS pathogenesis is due to an increase in toxic function which leads to MN loss due to a non-cell autonomous mechanism involving non-neuronal cells. For example, degeneration of mutant SOD1 expressing MNs is delayed when they associate with WT non-neural cells (5, 6).

Chronic microglial neuroinflammation with increased production of neurotoxic substances is another well documented feature of ALS pathology (see Moisse and Strong 2006 for a review (7)). In transgenic animals, microglial expression of mutant SOD1 results in the activation of these cells which promotes the release of factors that kill motoneurons (8), while the reduction of mutant SOD1 in microglial cells is neuroprotective (9). From these studies it has been deduced that the disease initiation mechanism depends on expression of mutant SOD1 within MNs, while the inflammatory response produced by mutant expressing microglial cells determines its progression. This interpretation is, however, a source of some controversy (10). A more direct relationship between mutant SOD1 and neuroinflammation was deduced from

studies demonstrating that although both normal SOD1 and mutant SOD1 are cytosolic proteins, they may also be secreted to extracellular space through secretory pathways (11, 12). It has also been that, after secretion, extracellular mutant SOD1 induces microglial activation and MN death, which points to a prominent pathogenetic role for secreted mutant SOD1 in FALS.

Other recent studies identify astrocytes as poisonous neighbours that may contribute to the killing of MNs in ALS (13-16). However, confining the expression of mutant SOD1 in microglia, astrocytes or neurons was not sufficient to induce motor neuron disease in mice (8, 17-19). It also seems that the expression of mutant SOD1 in oligodendrocytes does not contribute to the initiation of MN degeneration (6).

The way in which MNs die in ALS is the subject of some debate, given the existence of apparently contradictory observations from biochemical and morphological analyses: whereas neither apoptotic morphology nor apoptotic markers are found "in situ" in degenerating the MNs of ALS tissue sections (20-23), biochemical activation of apoptotic signalling pathways has been reported in ALS spinal cord and the beneficial effects of its inhibition have also been observed (see Guégan and Przedborski 2003 for review (21)). In a recent report, we described how degenerating neurons in SOD1^{G93A} rats and mice were labeled using antibodies against the P2X₄ subunit of the ATP receptor (23). Dying neurons displaying strong P2X₄-like immunoreactivity (PX₄-LIR) did not exhibit apoptotic morphology, nor did they display positive labeling to apoptotic markers such as active caspase or TUNEL reaction. However, we observed that massive microglial recruitment with neuronophagic activity occurred around neurons with positive P2X₄-LIR. This seems to be a relevant phenomenon since the time course for acquiring neuronal P2X₄-LIR is an exquisite marker for neuronal pathology which has a good correlation with disease progression in SOD1^{G93A} animal ALS models. For

example, by using this antibody the detection of degenerating neurons in cerebral cortex in transgenic SOD1 animals is reliable and allowed us to demonstrate the presence on degenerating cerebellar Purkinje cells and aminergic brain stem neurons in these animals (23). The obvious question deriving from this study is whether or not strong upregulation of the P2X₄ subunit of the ATP receptor underlines these changes. This was not conclusively demonstrated by our previous report. In fact, from western blots of spinal cord extracts of SOD1^{G93A} rats, we found that P2X₄ antibody detected an unidentified protein band that migrated at a lower molecular weight than that expected for P2X₄. Here, we have specifically addressed this issue with the aid of proteomics and found that P2X₄ antibodies cross-react with misfolded forms of mutant SOD1 that are present in neurons but not in glial cells. We also described that neuronal SOD1^{G93A} conformers with P2X₄-LIR may have pathogenetic relevance in the promotion of neuroinflammation since they were able to activate WT microglia and astroglia and when applied intracerebrally in normal animals.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Sprague Dawley NTac: SD-TgN (SOD1^{G93A}) L26H rats were obtained from Taconic Farms (Germantown, NY). Upon arrival, the animals were kept in a strictly controlled environment. Wild type Sprague Dawley rats were also purchased from Taconic. Adult male C57BL/6J mice were purchased from Charles River laboratory (Wilmington, MA) at 2 months of age. Occasionally, samples from mice overexpressing SOD1^{G93A} (B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur) or SOD1 WT (B6SJL-TgN(SOD1)2Gur) from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) were also used. Appropriate rules and procedures were

followed (Generalitat de Catalunya DOGC 2073, 1995) and approved by the Ethical Committee for Animal Testing of the Universitat de Lleida.

Histology and Immunohistochemistry

Animals (n=8) were deeply anaesthetized with pentobarbital and transcardially perfused with physiological saline solution followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.4. Samples of spinal cord were post-fixed overnight in the same solution, cryoprotected in 30% sucrose, and frozen for cryostat sectioning. Transversal sections (16 μ m thick) were washed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Triton X-100 for 15 min, blocked in 3% normal goat serum (NGS) for 30 min, and incubated overnight at 4°C with the primary antibody. Different primary antibodies were used: polyclonal rabbit anti-P2X4 (1:500) from Alomone Labs (Jerusalem, Israel); monoclonal mouse anti-neuronal nuclei (anti-NeuN; 1:500) from Chemicon International (Temecula, CA, USA); polyclonal rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (anti-GFAP; 1:400) from Chemicon or, alternatively, when required for double immunofluorescent labeling together with anti-Iba-1, the polyclonal chicken anti-GFAP (1:1000) from Abcam (Cambridge UK) were used; polyclonal sheep anti-superoxide dismutase(Cu/Zn) (anti-SOD1; 1:1000) from Calbiochem (Darmstadt, Germany); polyclonal rabbit anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 (anti-Iba1; 1:500) from Wako Chemical GmbH (Neuss, Germany). For immunofluorescence, washed sections were directly incubated for 1h with an appropriate secondary antibody (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 from Molecular Probes (Eugene OR), or Cy3 from Jackson ImmunoResearch Laboratories, (West Grove, PA). Fluorochrome 4' and 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) were usually applied at 50ng/ml. To reveal microglial cells, some spinal cord sections were incubated with FITC- conjugated

Bandeiraea simplicifolia lectin (BS-1; 30 μ /ml) from Sigma-Aldrich (Alcobendas, Spain) or, alternatively, by using the monoclonal mouse anti-CD11b (OX42; 1:100) from Serotec (Oxford, UK). Images were obtained using an Olympus BX51 (Hamburg, Germany) epifluorescence microscope equipped with a cooled CCD camera (DP30BW). A FluoView 500 Olympus confocal laser scanning microscope was also used. Colocalization analysis was performed under Olympus FV500 software. For studies of mouse microglial cells after intracerebral SOD1 injections, Iba-1 immunostaining was performed in brain serial coronal sections (80 μ m thick) obtained with a vibratome. Sections were collected in 0.1 M PB, permeabilized in PBS with 0.1% Triton X-100, blocked in 10% normal goat serum (NGS) for 30 min, and incubated overnight with the anti-Iba-1 antibody at 4°C. Sections were then incubated with a biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:100; Vector, Burlingame, CA) and processed for immunoperoxidase staining according to standard ABC procedures (Vectastain, Vector). For electron microscopic examination, animals were perfused with a mixture of 1% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in 0.1 M PB. Dissected tissues were postfixed in 1% osmium tetroxide and processed for Embed 812 embedding according to standard procedures. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate. Semithin sections (1 μ m thick) stained with methylene blue were also used for observation. For ultrastructural immunolabeling with anti-P2X₄ the same protocol previously described by Casanovas et al. (23) was followed.

Preparation of Spinal Cord Fractions

Animals (n=10 WT; n=14 SOD1^{G93A}) were killed using lethal doses of pentobarbital. Spinal cords were rapidly dissected, frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until use.

Samples were homogenized in 10 volumes of ice-cold buffer (0.32 M sucrose, 10 mM HEPES pH 7.4, 2 mM EDTA, containing the protease inhibitor cocktail (Sigma P8340) and homogenized using 10-15 strokes of a motor-driven glass-teflon homogenizer. Samples were spun at 1000 x g for 15 min to remove pelleted nuclear fraction (P1). Supernatants (S1) were taken and spun at ~200,000 x g (50,000 rpm for 30 min in a Beckman 70.1 Ti rotor) to yield crude cytosol (S2) and crude membrane pellets (P2). Pellets were re-suspended in homogenization buffer and spun again at ~200,000 x g to yield washed crude membrane pellets (P2'). Pellets were re-suspended in HEPES-Lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 2 mM EDTA, with protease inhibitor cocktail). Protein concentrations were measured by the Bradford method and samples were stored at -80°C.

Electrophoresis and Western blotting

Samples were separated according to size through denaturing 11% sodium dodecyl sulphate- polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). An equal amount of protein from 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 polyacrilamide gels. The proteins were electro-transferred to a nitrocellulose membrane in Tris-glycine-methanol buffer. The membrane was blocked for 1 hr at room temperature in a blocking solution mixture of 5% non-fat dry milk, 0.1% Tween 20, and TBS. The membrane was then incubated for 2 hr at room temperature with primary antibody. The membrane was rinsed once with TBS-Tween 20 for 15 min and washed twice with blocking solution for 5 min and then incubated for 1 h at room temperature in peroxidase-labeled secondary antibodies from Amersham (Buckinghamshire, UK). The blot was washed once for 15 min, once for 10 min and three times for 5 min and then

processed for analysis using a Supersignal ChemiLuminescence detection kit (Pierce, Rockford, IL) as described by the manufacturer.

Two-dimensional (2D) Electrophoresis

A protocol similar to that described by Carrette et al. (24) was followed. The volume carrying 100 µg of total soluble protein was mixed with the rehydration buffer containing 8 M urea, 0.5% (v/v) CHAPS, 50 mM dithiothreitol (DTT), 0.5% (v/v) Biolytes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) to bring it to a final volume of 200 µl. A trace amount of bromophenol blue was added to the sample, which was then placed in an 11 cm strip holder. The IPG strip (pH 3-10; 11 cm, Biorad) was placed over the protein sample and overlaid with a cover fluid (mineral oil). The IPG strip was then allowed to actively rehydrate with the protein sample for 2 h, which was directly linked to a six-step focusing protocol (6 h 30 v, 3 h 60 v, 1 h 200 v, 1 h 500 v, 1 h 5000 v, 1 h 8000 v). The whole procedure was conducted at a fixed temperature of 20 °C. The strip gel was incubated in equilibration buffer (EB, 1.5M 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 EB supplemented with 135 mM iodoacetamide for 10 min at room temperature. The IPG strip was then placed on the 10% SDS-PAGE gel. The protein standards were loaded adjacent to the pH 3.0 end. Electrophoresis was carried out at 50 mA. The western blotting was made as described above. To visualize protein spots, the PAG was subsequently stained with Flamingo Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad) or silver nitrate (Silver Staining Kit, GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

Identification of proteins by MALDI-TOF Mass Spectrometry

We followed a previously described procedure (25). The bands were manually sliced from the gel and individually digested overnight with 100–150 ng of trypsin (Promega, Alcobendas, Spain) at 37°C using a Montage In-Gel DigestZP (Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's standard protocol. The resulting peptides were dried and resuspended in 0.1% trifluoroacetic acid. 0.5 µl of them were then mixed with the same amount of α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA, 3 mg/ml). Next, they were analyzed using a MALDI-TOF Voyager DE Pro mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) operated in delayed extraction reflector mode an accelerating voltage of 20 kV and with a 90 ns pulse delay time, 75% 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 identified using the Protein Prospector MS-Fit software version 3.2 and using Swiss-Prot for the database search.

Immunoprecipitation

Samples of rat spinal cords were homogenated in non-denaturing lysis buffer (20 mM Tris HCl pH 8, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 2 mM EDTA) using a glass homogenizer. Volumes of lysis buffer had to be determined in relation to the amount of tissue present. Samples were centrifuged in a microcentrifuge for 10 min at 12,000 rpm and at a temperature of 4°C and then placed on ice. The supernatant was aspirated and placed in a fresh tube, then kept on ice and incubated with the antibody (1:200 polyclonal sheep anti-SOD1 from Calbiochem or 1:250 polyclonal rabbit anti-P2X₄ from Alomone) overnight at 4°C, under agitation. Meanwhile, the protein A Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech AB) were prepared. 100 mg of beads were incubated in 1 ml PBS 0.1M, blocked for 1 h with 1ml PBS-Bovine serum albumin (BSA, 1% w/v), washed for 1 h in PBS and then stored at 4°C. The lysate-

beads mixture was incubated at 4°C under rotary agitation for 4 h. After that, the samples were centrifuged, the supernatant was collected and the beads were washed in lysis buffer three times. Finally, the last supernatant was removed, 25 µl of 2x loading buffer were added to the beads, and both the first collected supernatant and the samples were boiled at 95-100°C for 5 min for ulterior SDS PAGE and western blot.

Affinity chromatography

A MicroLink Protein Coupling Kit, was used as described by the manufacturer (Pierce Termo Fisher Scientific, ref # 20475). The antibody used for coupling was anti-P2X₄ (Alomone; 1 mg/ml). Crude cytosol (S2) rat spinal cord proteins were added to the column and incubated for 2 h RT. To reduce non-specific interactions, the column was washed with 0.5M NaCl- 0.02% Tween-20. 300 µl of Coupling Buffer was added to remove the non-bounded fraction. The column was eluted by incubation with 100 µl ImmunoPure Elution Buffer for 10 min at room temperature. The recovered protein was neutralized by adding 5 µl Tris 1M pH=9. The eluted and non-bounded fractions were used in stereotaxic experiments. After analysis by western blotting and Commassie staining only one ~22 kDa band was detected on eluted fraction.

SOD1 in vitro misfolding

A procedure similar to that described by Rakhit et al (26) was followed. SOD1 from human erythrocytes was purchased from Sigma. Stock 106 µM SOD1 in 50mM Hepes, pH 7.5, was diluted overnight and at room temperature in 8M urea, 2mM DTT and 1mM EDTA to a final concentration of 2µM. This is referred to as 'unfolded SOD1'. Stock SOD1 was similarly diluted in PBS overnight ('folded SOD1'). 'Unfolded SOD1' and 'folded SOD1' were diluted 1/20 in PBS containing 1µg/ml anti P2X₄ antibody

from Alomone and using 2mg/ml BSA from Sigma as a stabilizer. This reaction was incubated for 1 h at room temperature. This was followed by immunoprecipitation with 50µl of washed Protein A sepharose beads (Amersham) for 1h at room temperature. Supernatants from each reaction were treated as a loading control. Samples were Western blotted using as a primary antibody sheep anti SOD1.

Intracerebral injection

Two-month old adult male C57BL/6J laboratory mice (n=14) were anaesthetized with Isoflurane (3% vol.) for 1-2 min and then injected with 2% Rompun from Bayer (Kiel, Germany) and 10% Ketamine hydrochloride from Merial (Barcelona, Spain) in 0.9% NaCl (10 µl/g) and placed on a stereotaxic apparatus (ASI instruments, Warren, MI). The animals received an injection of 1µl, of either recombinant human SOD1 WT, or SOD1^{G93A} species immunoisolated by anti-P2X₄ antibody (both at 1µg/µl) which was delivered into the hippocampus (-1.0 mm lateral and -1.82mm dorsoventral from the Bregma) at a speed of 1µl/min. The delivery needle was left in place for 1 min and then slowly retracted (1mm/min). The incisions were sutured and the mice were left to recover. The animals were intracardially perfused at different times (24h or 120h) after the injection. Coronal serial sections of the whole brains were obtained by means a vibratome processed for Iba-1 immunohistochemistry (n=6 for SODWT and n=6 for mutant SOD1; n=3 after 24 h and n=3 after 120 h, in both conditions). All tissue sections were digitally imaged at low magnification (1.6 X objective) and Iba-1 immunoreactivity was quantified by densitometry in the injected (ipsilateral) and in the non-injected (contralateral) hemispheres by using Visilog 6.3 (Noesis, Orsay, France) image analyzer. One additional pair of WT and mutant brains were serially sectioned and processed for a triple fluorescent staining for simultaneous demonstration of

astroglia, microglia and nuclear morphology by using the already mentioned reagents. GFAP immunoreactivity was evaluated on confocal microscope images obtained after Z-axis projection of optically sectioned samples (2 μm thick) captured by a 20X (0.70 N.A.) objective. The relative area occupied by GFAP positive cells and processes were determined by image analysis (Visilog 6.3).

Experiments with motoneuron-like hybrid cell line NSC-34

Mouse motoneuron-like hybrid cell line NSC-34 were purchased from CELLutions Biosystems (Toronto, Canada). Cells were subcultured in 6-well plates (2×10^5 cells per well) and transiently transfected with plasmids (10 μg DNA per well) using a 1:1 ratio of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, El Prat de Llobregat, Spain) to DNA. Expression vectors for human SOD1^{WT}-EGFP, SOD1^{G93A}-EGFP and SOD1^{A4V}-EGFP, which had been kindly provided by Dr. Bradley Turner, were used for transfection. Cells were fixed at 24-48 h with 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS-0.1 % triton-X100, blocked in normal goat serum and incubated overnight at 4°C in rabbit anti P2X₄ antibody (Alomone). Immunoreaction was visualized after incubation with Cy5-conjugated anti-rabbit secondary antibody from Jackson Labs (1:500 in PBS) under an Olympus FV500 confocal microscope. In initial experiments, Cy3- or Alexa Fluor 546-conjugated secondary antibodies were used, but during sample excitation with 546 helium-neon laser, we observed a shift in the spectral properties of mutant SOD1-EGFP, resulting in high cross-talk between Alexa Fluor 546 and mutant SOD1-EGFP. To circumvent this inconvenience, we used red fluorochrome Cy5 instead.

For calcium imaging, transfected cells that were grown on glass coverslips were incubated with 5 μM Fura 2 AM (Invitrogen) dissolved in an extracellular physiological solution containing (in mM) 150NaCl, 1CaCl₂, 1 MgCl₂, 5KCl, 20 HEPES pH 7.4, 10

Glucose and 0.1% BSA, for 30 min at 37°C. The coverslips were then inserted into a PH1 (Warner Instrument Corp, Hamden, CT) perfusion chamber which was placed in a Nikon Eclipse TE200 inverted fluorescence microscope equipped with a monochromator and an Orca ER camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). All of this was done under the control of Aquacosmos software (Hamamatsu Photonics) for calcium imaging. Cells were continuously perfused with the previously mentioned solution. Stimulating agents were added to the perfusion chamber when needed. Ratio images were captured using a 40X 1.3 NA Nikon S Fluor oil-immersion objective and subsequently analyzed.

RESULTS

P2X₄ immunolabeling of degenerating neurons in SOD1^{G93A} animals.

Some of the results obtained from our previous work were replicated here: conventional fluorescence or confocal microscopy was performed on multilabeled spinal cord sections from SOD1^{G93A} rats. As shown in Fig1 (A-F), at P30, the stage at which clinical symptomatology has not yet emerged, many large ventral horn motoneurons (MNs) that were visualized after NeuN immunostaining (A) did not display any substantial P2X₄ immunolabeling (B) or structural abnormality when examined in combination either with DAPI or Nissl fluorescent staining (not shown). By contrast, when the disease is fully developed (i.e. P150) and MNs loss is conspicuous (D), the cell bodies and processes of degenerating MNs acquired strong P2X₄-LIR (E). Ventral but not dorsal root axons showed P2X₄ immunopositivity from P90 on (Fig 1 G and H). We observed that strong P2X₄-LIR was specifically associated with degenerating neuronal cells and was completely dissociated from glial cells. When P2X₄ and GFAP immunostaining were combined, colocalization analysis demonstrated the absence of cells with double-labeling (Fig 1 P-S). Similarly, P2X₄ immunolabeling was not found

colocalized with either of the microglia cell markers OX-42 (Fig 1 L-O) or BS-1 lectin (Fig 1 T-Y). Nevertheless, we observed that P2X₄-immunopositive neurons were often completely decorated by adjacent phagocytosing microglial cells which progressively disintegrate neuronal P2X₄-immunoreactive structures (Fig 1 I-O). Degenerating MNs with P2X₄ positive immunolabeling do not display chromatin condensation or apoptotic morphology as shown after DAPI staining or by immunoelectron microscopy (supplemental digital content Fig 1 A-C). The recruitment of microglial cells by degenerating MNs is depicted in semithin sections. Even in the advanced stages of cellular disruption, rests of the MN nuclei do not undergo prominent chromatin condensation (supplemental digital content Fig 1 D-G and H); similar results were obtained in tissues from SOD1^{G93A} mouse (not shown). All these data corroborated our previous work (23) and emphasize the need for further elucidation of the chemical nature of P2X₄-LIR.

P2X₄ antibodies cross-react with misfolded species of SOD1

Soluble extracts of spinal cords were analyzed by western blot using anti-P2X₄ antibody. A band migrating to the MW of the P2X₄ protein was present in samples from both normal and transgenic animals. In addition, P2X₄ antibody did recognize an additional protein band of lower MW in samples from transgenic SOD1^{G93A} rats whatever their age was (Fig. 2A). The labeling must have been specific, because it was abolished when the antibody was preincubated with the P2X₄ immunizing peptide. We hypothesized that the low MW band may have resulted from an abnormal proteolytic cleavage of the P2X₄ receptor protein or could perhaps have represented some other protein that was unrelated to P2X₄ but shared one or more epitopes with it. To resolve this question, we performed a proteomic analysis using MALDI-TOF mass

spectrometry. Proteins were separated by 2D electrophoresis and P2X₄-immunoreactive spots were identified by comparing silver-stained gels with P2X₄-immunostained 2D western blots (Fig. 2B). After spectrum analysis, 7 peptide fragments of SOD1 were recognized (threshold: 7.46×10^4). The matched peptides cover 38 % of the protein (60 of the 154 amino acids). Thus, the low MW P2X₄-immunoreactive protein was identified as SOD1 (Fig. 2C). This result was corroborated by analyzing the pattern of spots obtained after reacting 2D western blots with either anti-P2X₄ or anti human SOD1 antibodies and assessing their equivalence (Fig. 2D).

All these results suggested that SOD1^{G93A} and P2X₄ share some epitope(s) that can be revealed by anti-P2X₄ antibodies. On comparing the amino acid sequence of the P2X₄ immunizing peptide with the complete sequence of human SOD1, we found that the peptide sequence could be aligned within a region of SOD1 comprising between 34 and 53 amino acids of which 3 residues were identical and 8 were similar (Fig. 2 E). This sequence is enriched in hydrophobic amino acids and locates in the inner region of native monomer in human SOD1, where it is presumably not available for antibody binding in its native form. Mutated SOD1 in ALS is prone to conformational changes that promote misfolding and the aggregation of toxic forms that accumulate in neuronal and glial cells (27). In order to identify native P2X₄-immunoreactive SOD1^{G93A} conformers, extracts of soluble and membrane fractions of spinal cord from either SOD1^{G93A} or WT rats were immunoprecipitated with anti-P2X₄ and anti SOD1 antibodies. Under non-denaturing conditions, monomeric SOD1 was immunoprecipitated with anti-P2X₄ antibodies in either soluble or membrane extracts of presymptomatic (P30) and end-terminal (P120) mutant animals (Fig 3A). Only traces of SOD1 were immunoprecipitated in WT extracts. High molecular weight SOD1 aggregates were also immunoprecipitated to some extent at P120. Conversely, anti-

SOD1 immunoprecipitated SOD1 monomers were also immunolabeled with anti-P2X₄ in both soluble and membrane fraction extracts from transgenic animals (Fig. 3B). To explore whether SOD1 epitope cross-reactive with anti-P2X₄ antibodies is better exposed after unfolding, human erythrocyte-derived SOD1 was subjected to immunoprecipitation in its native folded state and after unfolding in the presence of highly concentrated urea. This is a protocol similar to that described by Rakhit et al. (26). We found that anti-P2X₄ antibody reacts with urea-unfolded SOD1 and that only a trace reaction occurred with native SOD1 (Fig. 3C).

SOD1 and P2X₄ immunostaining in sections of spinal cord tissue from SOD1^{G93A} rats

The relationship between SOD1 and P2X₄ immunostaining was examined in double fluorescent sections of labeled spinal cord from WT and SOD1^{G93A} rats. Samples from mice over expressing human WT SOD1 were also evaluated. As expected, SOD1 immunostaining was extensive and strong in SOD1^{G93A} rats and present in both neuronal and glial cells. The strong P2X₄-immunoreactive signal present in degenerating MNs was always colocalized with intense SOD1 immunolabeling. However, intense SOD1 immunostaining was also detected in cells and areas devoid of P2X₄ immunolabeling (Fig. 4 A-C). For example, after double labeling with GFAP, SOD1^{G93A} also accumulated in great numbers of astrocytes, whereas P2X₄ immunoreactivity was never associated with astrocytes (Fig 4 J-O). To evaluate whether acquisition of P2X₄ immunolabeling is a property of SOD1^{G93A} expressed in degenerating neurons or, alternatively, a mutation-independent characteristic of SOD1, we examined spinal cord sections from mice over expressing human WT SOD1: as

shown in Fig 4 D-F, SOD1 immunostaining was not seen in association with P2X₄-LIR in this case. These facts were objectivated after colocalization analysis (not shown).

Activation of microglia and astroglia by extracellular P2X₄- immunoreactive SOD1^{G93A} conformers.

It has been demonstrated that mutated SOD1 cause microgliosis and neuron death when secreted in the extracellular space (12). As many degenerating neurons displaying positive P2X₄-LIR in SOD1^{G93A} animals are seen to be intimately associated with activated microglial cells, we wondered whether P2X₄- immunoreactive SOD1^{G93A} conformers were able to induce microglial activation when applied "in vivo". We therefore first isolated P2X₄- immunoreactive SOD1^{G93A} species (SOD1^{G93A}-P2X₄-LIR) from extracts of soluble spinal cord from mutant rats by affinity chromatography, using a matrix with immobilized anti-P2X₄ antibody. The protein recovered after elution was then dialyzed against PBS and injected into the hippocampus of normal WT mice by stereotaxis. Human erythrocyte SOD1 (SOD1 WT) in PBS was also injected as a control. Microgliosis was assessed after Iba-1 immunostaining in serial sections of a whole brain at both 24h and 5 days after injection. As shown in Fig 5 (A-E), microglial activation was monitored as it spread through the brain from the site of the injection and also extended to the contralateral hemisphere. The densitometric values of the Iba-1 signal were always higher after administration of SOD1^{G93A}-P2X₄-LIR when compared with SOD1 WT. Microglia activated by SOD1^{G93A}-P2X₄-LIR species display a hypertrophic and ramified morphology. In another experiment, serial sections of brain injected either with SOD1 WT or SOD1G93A-P2X4-LIR were double fluorescent immunolabeled with anti-GFAP and anti-Iba-1 for simultaneous visualization of astroglial and microglial cells (Fig 5 F-K). It was also evidenced that after 5 days

mutant SOD1 conformers induced extensive astrocytic activation from in the injected areas. Activated astrocytes displayed more intense GFAP immunoreactivity, increased cell-size and processes number when compared with those present around the site of injection in SOD1 WT animals. This was objectified after measurement of the relative area of GFAP-immunopositive structures that showed a more than 100 % increase after mutant SOD1 conformers injection (Fig 5 K).

P2X₄ cross-reactive epitopes of mutant SOD1 are masked in aggregates.

Since misfolded mutant SOD1 is prone to aggregation and neurotoxicity, we explored whether the unmasking of P2X₄-immunoreactive epitope occurs during the aggregation of mutant forms of SOD1 in transfected mouse motoneuron-like hybrid cell line NSC-34. These cells were transfected with WT and ALS-linked mutant (G93A and A4V) human SOD1-enhanced green fluorescent protein (hSOD1-EGFP). Aggregates of hSOD1 were readily seen in cells expressing G93A or A4V mutations, but were more frequent and prominent in the latter. After P2X₄ immunocytochemistry, we found that mutant SOD1 aggregates did not share immunoreactivity to P2X₄ (Fig. 6A). As the levels of the band corresponding to the ATP receptor P2X₄ subunit increased in the spinal cord tissue of end-terminal G93A rats (23), we assessed the possibility of mutant SOD1 transfection influencing endogenous expression of calcium-permeable ATP receptors. This would be noticeable because treatment with the P2X₄ allosteric modulator of the P2X₄ subtype of ATP receptor increases the survival of SOD1^{G93A} mice (28). Changes in intracellular calcium were analyzed in Fura2-loaded NSC-34 cells after stimulation with ATP. Calcium transients were induced by ATP in many control (untransfected) NSC-34 cells, but decreased when WT or mutant SOD1 were overexpressed. However, the decrease was most prominent in cells overexpressing

mutant SOD1, which indicate that the increased function of the P2X₄ receptors is not present in this ALS cellular model (Fig. 6B).

DISCUSSION

We demonstrated that the strong P2X₄-LIR observed during neurodegeneration in SOD1^{G93A} transgenic animals reveals the accumulation of mutant SOD1 in a particular configuration of misfolding that may have a prominent pathogenic role. This can be deduced from the fact that neurons expressing P2X₄-LIR recruit neuronophagic microglia and also because SOD1^{G93A}-P2X₄-LIR conformers that were exogenously applied to intact brain induced noticeable degrees of microglial and astroglial activation. The observed antibody cross-reactivity can be explained by the similarity between the amino acid sequences in the immunizing peptide used in the production of P2X₄ antibody and a SOD1 sequence in its inner hydrophobic region. This epitope must have a high affinity for binding to the P2X₄ antibody and it should be unmasked for unknown reasons in degenerating neurons. Obviously, P2X₄ antibody is able to recognize unfolded SOD1 in denaturing western blots being immunoprecipitation the appropriate procedure for demonstrating the presence of SOD1^{G93A}-P2X₄-LIR in tissue homogenates. Misfolded mutant SOD1 is prone to the formation of aggregates that have been considered neurotoxic (29-33). These aggregates are found in both neurons and glial cells (34, 35). We found that aggregates of mutant SOD1 in NSC-34-transfected cells did not exhibit P2X₄-LIR. On the other hand, we never found P2X₄-LIR associated with neuronal protein aggregates or within glial cells, which indicated that SOD1^{G93A}-P2X₄-LIR was unmasked under conditions other than those of protein aggregation. This is interesting to consider in relation to the open controversies about the cytoprotective versus noxious effects of protein aggregates in neurodegenerative diseases, which have

been emerged after evidencing that inclusion bodies may be protective by either sequestering toxic diffuse mutant proteins or by other mechanisms (32, 36, 37). Otherwise, misfolded soluble SOD1 monomers with externalized hydrophobic regions have been found in tissues from mutant SOD1 ALS mice models and may ~~also~~ be particularly involved in ALS neurotoxicity (38). Since misfolded proteins are likely to externalize parts of the hydrophobic interior it is possible that P2X₄-LIR epitopes could be unmasked in particularly neurotoxic soluble or oligomeric forms of misfolded mutant SOD1. If so, they would concord with cytosolic ultrastructural localization P2X₄-LIR sites in degenerating neurons (23).

Although SOD1 is a cytosolic protein and does not contain a translocation signal for entering secretory pathways, it has been shown that it can be secreted to extracellular space (11) after reaching ER-Golgi compartments (12, 39). Activation of ER-stress pathways by mutant SOD1 is an early change in most vulnerable MNs in ALS (40).

Unlike WT SOD1, extracellular mutant SOD1 is able to activate microglial cells that are neurotoxic in primary spinal cord cultures (41). Here, we have shown that extracellular SOD1^{G93A}-P2X₄-LIR conformers are inducers of microglial activation when introduced in normal brain "in vivo". This suggests that its presence in degenerating neurons during ALS progression may have a role in determining reactive microgliosis and neuronophagia. Although controversy remains (10), it seems that microgliosis is a relevant pathogenetic factor in ALS progression (8, 42) and that other immune cells, such as T lymphocytes, may modulate microglial activity (43, 44). Targeting microglia is therefore an important therapeutic strategy in ALS. It has been reported that reducing neurotoxic extracellular SOD1 by means of immunotherapy has a beneficial effect on disease symptoms and improves the life expectancy of mutant SOD1 mice ALS models (39).

Astrocytic activation is a well established feature of ALS pathology that occurs both in human and animal models of the disease (45). Astrocytes bearing SOD1 mutations are neurotoxic for MNs (13-16), but the induction of astrocytic activation by extracellular mutant SOD1 was not previously reported. It would be important to investigate whether astrocytes when activated by injection of SOD1^{G93A}-P2X₄-LIR conformers upregulate the production of molecules that promote neuronal death, as it was described in the ALS context.

An antibody against SOD1-exposed-dimer-interface (SEDI) has recently been developed that recognizes SOD1 in misfolded conformation but not in native protein (26). By immunostaining degenerating motoneurons and ventral roots, axons are labeled in a pattern that is comparable with the one that we found with P2X₄ antibody.

However, in contrast with P2X₄ antibody, SEDI also detects inclusion bodies in MNs and astrocytes. This is an indication that several distinct forms of misfolded SOD1 must coexist differentially distributed in ALS rodents and that it can be detected by specific antibodies. More recently developed monoclonal antibodies support this assumption and provide valuable new agents for therapeutic strategies (46).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Imma Montoliu for their technical assistance. Special thanks go to Marti Aldea for their help and advice in protein biochemistry. We would also like to thank Jordi Calderó for helpful comments and Josep M^e Estanyol from the Proteomic Unit of the University of Barcelona for his technical support in the proteomic analysis.

ABBREVIATIONS

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; ATP, adenosine triphosphate; FALS, familial amyotrophic lateral sclerosis; GFAP, glial fibrillary acidic protein; hSOD1-EGFP, human SOD1-enhanced green fluorescent protein; MN, motoneuron; P2X₄-LIR, P2X₄-like immunoreactivity; P2X₄-LIR-SOD1^{G93A}, affinity chromatography-isolated P2X₄-immunoreactive SOD1^{G93A} species; SOD1, superoxide dismutase 1; WT, wild type.

REFERENCES

1. Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:806-819
2. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994;264:1772-1775
3. Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 2008;85:94-134
4. Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 1996;13:43-47
5. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003;302:113-117

6. Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, et al. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:7594-7599
7. Moisse K, Strong MJ. Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:1083-1093
8. Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, et al. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:16021-16026
9. Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006; 312:1389-1392
10. Gowing G, Philips T, Van Wijmeersch B, et al. Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *J Neurosci* 2008;28:10234-10244
11. Turner BJ, Atkin JD, Farg M, et al. Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2005;25:108-117
12. Urushitani M, Sik A, Sakurai T, et al. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2006;9:108-118
13. Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, et al. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell based ALS model. *Nat Neurosci* 2007;10:608-614
14. Nagai M, Re DB, Nagata T, et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 2007;10:615-622

15. Van Damme P, Bogaert E, Dewil M, et al. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:14825-14830
16. Yamanaka K., Chun S.J., Boillee S, et al. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2008;3:251-253
17. Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, et al. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 2000;20:660-665
18. Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, et al. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 2001;21:3369-3374
19. Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 2002;22:4825-4832
20. Migheli A, Atzori C, Fiva R, et al. Lack of apoptosis in mice with ALS. *Nat Med* 1999;5:966-967
21. Guégan C, Przedborski S. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest* 2003;111:153-161
22. Martin LJ, Liu Z, Chen K, et al. Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondrialopathy and cell death. *J Comp.Neurol* 2007;500:20-46
23. Casanovas A, Hernández S, Tarabal O, et al. Strong P2X4 purinergic receptor-like immunoreactivity is selectively associated with degenerating neurons in transgenic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurology* 2008;506:75-92

24. Carrette O, Burkhard PR, Sanchez JC, et al. State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nat Protoc* 2006;1:812-823
25. Vera J, Estanyol JM, Canela N, et al. Proteomic analysis of SET-binding proteins. *Proteomics* 2007;7:578-587
26. Rakhit R, Robertson J, Vande Velde C, et al. An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. *Nat Med* 2007;13:754-759
27. Shaw BF, Valentine JS. How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends Biochem Sci* 2007;32:78-85
28. Andries M, Van Damme P, Robberecht W, et al. Ivermectin inhibits AMPA receptor-mediated excitotoxicity in cultured motor neurons and extends the life span of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2007;25:8-16
29. Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, et al. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 1998;281:1851-1854
30. Johnston JA, Dalton MJ, Guney ME, et al. 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 USA* 2000;97:12571-12576.
31. Wang J, Xu G, Gonzales V, et al. Fibrillar inclusions and motor neuron degeneration in transgenic mice expressing superoxide dismutase 1 with a disrupted copper-binding site. *Neurobiol D* 2002;10:128-138
32. Basso M, Massignan T, Samengo G, et al. Insoluble mutant SOD1 is partly oligoubiquitinated in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Biol Chem* 2006;281:33325-33335

33. Wang Q, Johnson JL, Agar NY, et al. Protein aggregation and protein instability govern familial amyotrophic lateral sclerosis patient survival. *PLoS Biol* 2008;6(7): e170
34. Stieber A, Gonatas JO, Gonatas NK. Aggregates of mutant protein appear progressively in dendrites, in periaxonal processes of oligodendrocytes, and in neuronal and astrocytic perikarya of mice expressing the SOD1(G93A) mutation of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2000;177:114-123
35. Jonsson PA, Ernhill K, Andersen PM, et al. Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2004;127(Pt1):73-88.
36. Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, et al. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431:805-810.
37. Tanaka M, Kim YM, Lee G, et al. Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J Biol Chem* 2004;279:4625-4631.
38. Zetterström P, Stewart HG, Bergemalm D, et al. Soluble misfolded subfractions of mutant superoxide dismutase-1s are enriched in spinal cords throughout life in murine ALS models. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:14157-14162
39. Urushitani M, Ezzi SA, Matsuo A, et al. The endoplasmic reticulum-Golgi pathway is a target for translocation and aggregation of mutant superoxide dismutase linked to ALS. *FASEB J* 2008;22:2476-2487
40. Saxena S, Cabuy E, Caroni P. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 2009;12:627-636
41. Urushitani M, Ezzi SA, Julien JP. Therapeutic effects of immunization with mutant superoxide dismutase in mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:2495-2500

42. Xiao Q, Zhao W, Beers DR, et al. Mutant SOD1(G93A) microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *J Neurochem* 2007;102:2008-2019
43. Beers DR, Henkel JS, Zhao et al. CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:15558-15563
44. Chiu IM, Chen A, Zheng Y, et al. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:17913-17918
45. Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, et al. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 47:263-274
46. Julien JP, Gros-Louis F, Bosco D, et al. Immunization approaches to therapy for ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 2008; 9 (Suppl. 1):56

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. (A-F) Double fluorescent labeling of lumbar spinal cord sections from SOD1^{G93A} rats at presymptomatic (P30, A-C) and end-terminal stages of the disease (P150, D-F) showing immunoreactivity to both NeuN (in green, A and D) and P2X₄ (in red, B and E) at the ventral horn. Note that the marked reduction in normal NeuN-positive large MN cell bodies at the end stage (D) is correlated with the appearance of strongly P2X₄-immunopositive neuronal profiles (E). (G-H) Positive P2X₄-immunolabeling (red) is observed in axons of ventral (G), but not in dorsal, nerve roots (H); tissue section was obtained from a P90 SOD1^{G93A} rat and was counterstained with DAPI (blue). (I-O) Simultaneous triple fluorescent labeling of spinal cord ventral horn of an end-terminal (P150) SOD1^{G93A} rat showing immunoreactivity to P2X₄ (red),

OX42 (a microglial marker, green) and DAPI (blue); note the association of P2X₄ – immunoreactive MN somata and processes with microglial cells displaying the typical pattern of neuronophagia (arrows), as illustrated in L-O at higher magnification. (P-Y) P2X₄-immunostaining was not associated with astroglial or microglial cells, as seen after double immunolabeling with GFAP (P-R) or with lectin BS1 (T-X). BS1 labelling in U adopts neuronal-like profile because it reveals a large amount of clumped microglial cells around P2X₄ positive neuron (* in V); small green structures (arrows in X) are microglial cells and processes far from P2X₄-positive neuronal cell body, but some of them, adjacent to P2X₄-positive neuronal processes; note also in T that DAPI-staining reveals clustered of microglial cell nuclei over MN soma; images were obtained after Z-axis projection of 19 optical sections (1µm thick) under a confocal microscope. Colocalization analysis, performed on single confocal planes, determined the absence of double-labeled cellular structures (S, Y). Bars = (A) 200 µm (valid for A-F); (G) 50 µm (valid for G-H); (I) 100 µm (valid for I-K); (L) 20 µm (valid for L-O); (P) 100 µm (valid for P-R); (T) 50 µm (valid for T-X).

FIGURE 2. Identification of the 22 Kd-P2X₄-immunoreactive band seen in spinal cord extracts of mSOD^{G93A} rats as SOD1. (A) Soluble fraction of spinal cord extracts of control (WT) and mutant (G93A) P150 rats after western blotting with anti-P2X₄ antibody; note the presence of a low MW band in the mutant sample. (B) P2X₄-immunoreactive spots seen after two-dimensional western blotting that were analyzed by MALDI-TOF. (C) The analysis of the MALDI-TOF spectrum of peptides obtained after sample digestion identified SOD1. (D) Anti-human SOD1 and anti-P2X₄ two-dimensional western blotting of spinal cord extracts of end-terminal mSOD^{G93A} rats

results in an overlapping pattern of spots. (E) Alignment of the P2X₄ peptide used for the generation of anti-P2X₄ antibody with a primary sequence of human SOD1 showing significant sequence similarity in the indicated region. Filled rectangles indicate sites of amino acid identity and filled circles signify amino acid similarity. The colour code indicates amino acid polarity: non-polar (black), acid (red) and basic (blue).

FIGURE 3. Both anti-P2X₄ and anti-human SOD1 antibodies immunoprecipitate SOD1 in soluble extracts of spinal cord from end terminal SOD1^{G93A} rats. Spinal cord lysates corresponding to soluble (S2) and membrane (P2') fractions of control (WT) and mutant (G93A) rats at different ages (30 and 120 postnatal days) were immunoprecipitated (IP) with either anti-P2X₄ (A) or anti SOD1 antibodies (B). Immunoprecipitates were analyzed by western blotting (IB) either with anti human SOD1 or anti P2X₄ antibody. (C) Anti P2X₄ antibody immunoprecipitated unfolded human erythrocyte SOD1. SOD1 was denatured by treatment with 8M urea, 2mM DTT, and 1mM EDTA. Bound (B) and eluted fractions were analyzed by western blot using anti-human SOD1 antibody.

FIGURE 4. (A-I) Immunohistochemical localization of P2X₄-LIR (red) and SOD1 (green) in the ventral horn of P120-150 control (WT) and transgenic mice overexpressing mutant human SOD1 (mSOD1^{G93A}) or wild type human SOD1 (SOD1WT). P2X₄-LIR in SOD1^{G93A} P120 mice spinal cord ventral horn (delimited by dashed lines) only partially colocalizes with overexpressed mutant SOD1 (A-C). However, the overexpression of non-pathogenic SOD1WT in aged mice does not involve P2X₄-LIR (D-F); the weak fluorescent red granules seen in D are unspecific because since they are still observed when primary antibody was omitted. Furthermore,

strong P2X₄-LIR was not evidenced in aged WT mice exhibiting lower intensities of SOD1 immunoreactivity (G-I). High levels of SOD1 immunoreactivity were found in both astroglial cells (arrow) and MNs (*) in SOD1^{G93A} animals, as shown (J-O) after double immunofluorescent staining with GFAP (red) and human SOD1 (green) in a ventral horn section from an end-terminal SOD1^{G93A} rat. Scale bar = (A) 100 μm (A-I). Scale bar = (L) 25 μm (J-L). Scale bar = (O) 50 μm (M-O).

FIGURE 5. Anti-P2X₄-bound SOD1^{G93A} conformers induce microglial and astroglial activation when injected in normal brain. (A) After a single intracerebral injection of either human erythrocyte WT SOD1 (control, SOD1 WT) or P2X₄-immunoreactive SOD1^{G93A} (P2X₄-LIR-SOD1^{G93A}), conformers isolated by affinity chromatography mice were killed and coronal sections of whole brain were processed for Iba-1 immunolabeling. For quantitative analysis, the optical density of the Iba-1 signal was measured on each section and plotted in function of its distance from the site of injection. Each point represents the mean ± sem of the data obtained from 3 different animals that received control WT SOD1 (blue) or P2X₄-immunoreactive SOD1^{G93A} (red). (B, C) Representative pseudocolored micrograph showing the strongest neuroinflammatory reaction (red) produced close to the site of injection of P2X₄-LIR-SOD1^{G93A} conformers evidenced after IBA-1 immunostaining which reveals microglial activation (see the inserted high magnification micrographs (D, E) taken from the indicated regions; CC: corpus callosum; Hip: hippocampus; Py: pyramidal cell layer. (F-I) Detail of dentate gyrus from brain after 5 days of injection of either P2X₄-LIR-SOD1^{G93A} conformers (F, G) or SOD WT (H, I); samples were processed for triple fluorescent staining to demonstrate astroglia (GFAP, red), microglia (Iba-1, green) and nuclei (DAPI, blue). Note the increased immunolabeled astroglia and microglia after injection of mutant SOD1 conformers (F, G); Gr: granular cell layer. (J) Detail of

cellular morphology of activated microglial (Iba-1, green) and astroglial (GFAP, red) cells in the hippocampus after 5 days of P2X₄-LIR-SOD1^{G93A} conformers injection; the relative area of GFAP immunoreactivity was measured in both conditions (K). Bars= (B) 500 μm (valid for C); (D) 50 μm (valid for E); (H) 100 μm (valid for F-I); (J) 20 μm. Mann-Whitney test: *, P ≤ 0.0001 vs WT.

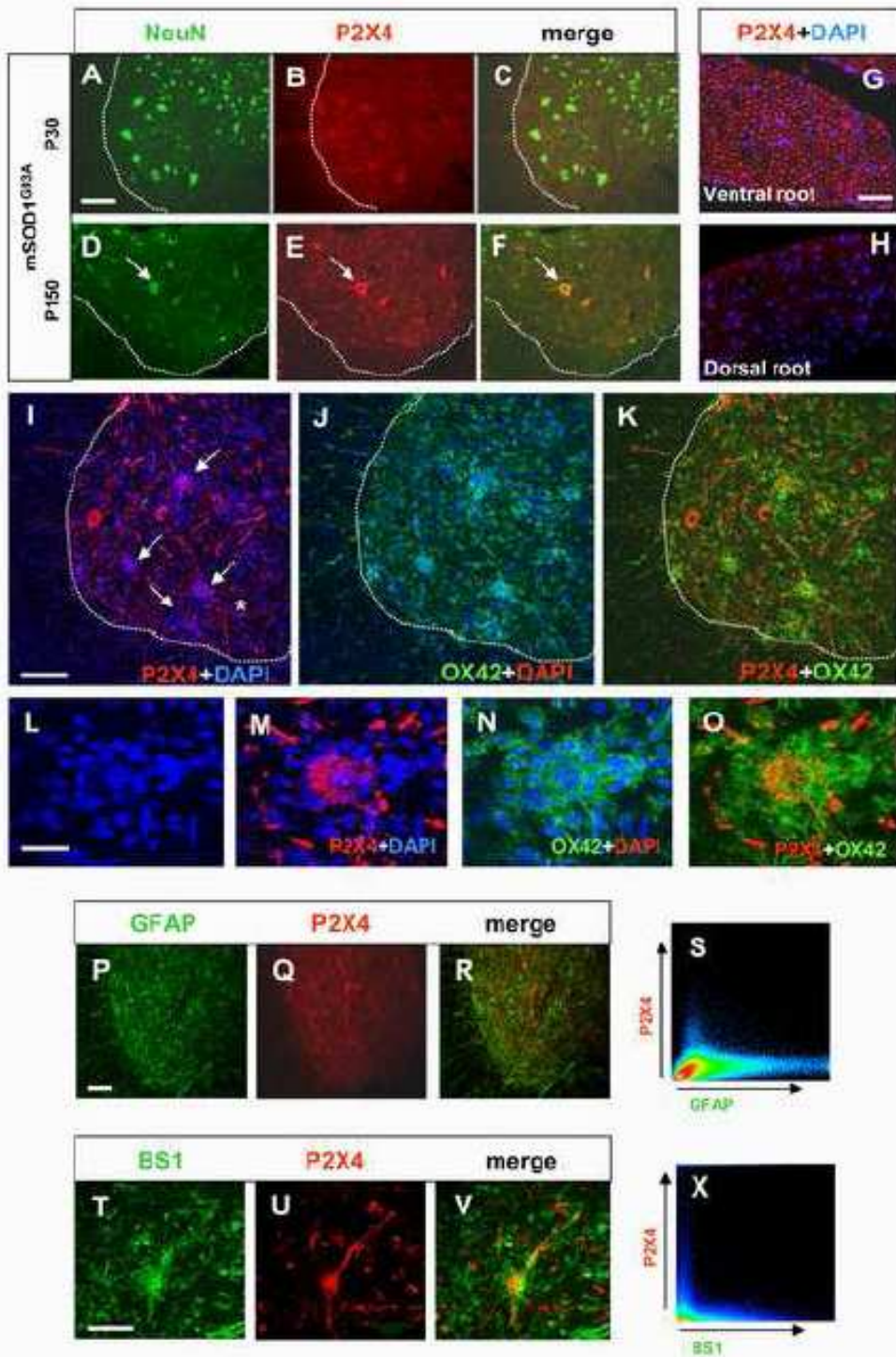
FIGURE 6. (A) Mutant (G93A or A4V) hSOD1-EGFP overexpression in transfected NSC-34 cells induced prominent protein cytoplasmic aggregates. However no aggregates were seen after overexpression of WT SOD1. P2X₄ immunostaining reveals that SOD1 aggregates do not present cross-reactivity with this antibody. (B) Overexpression of SOD1 does not involve upregulation of calcium-permeable ATP receptors since the amplitude of ATP-induced calcium transients in Fura-2 loaded NSC-34 cells decreased after overexpression of either WT or mutated hSOD1-EGFP. Bar= 10 μm.

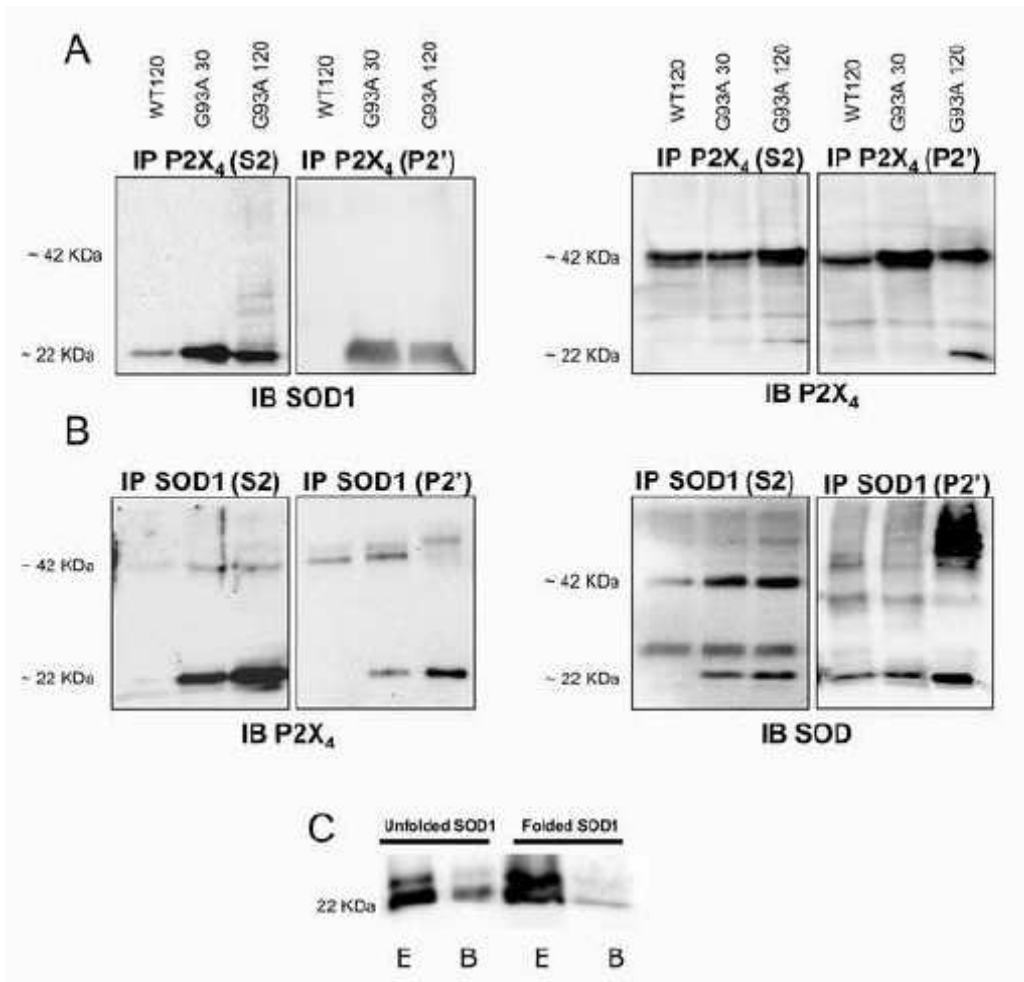
Supplemental Digital Content

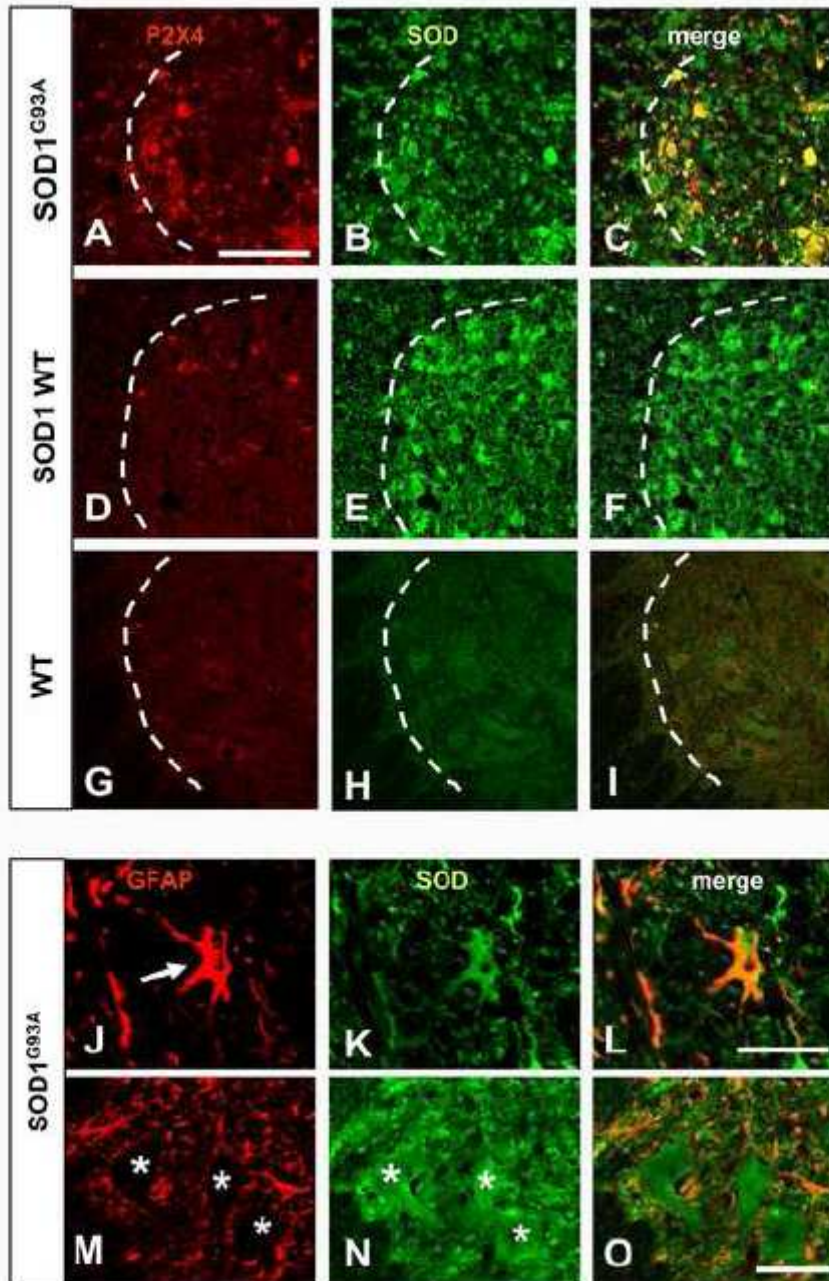
FIGURE 1

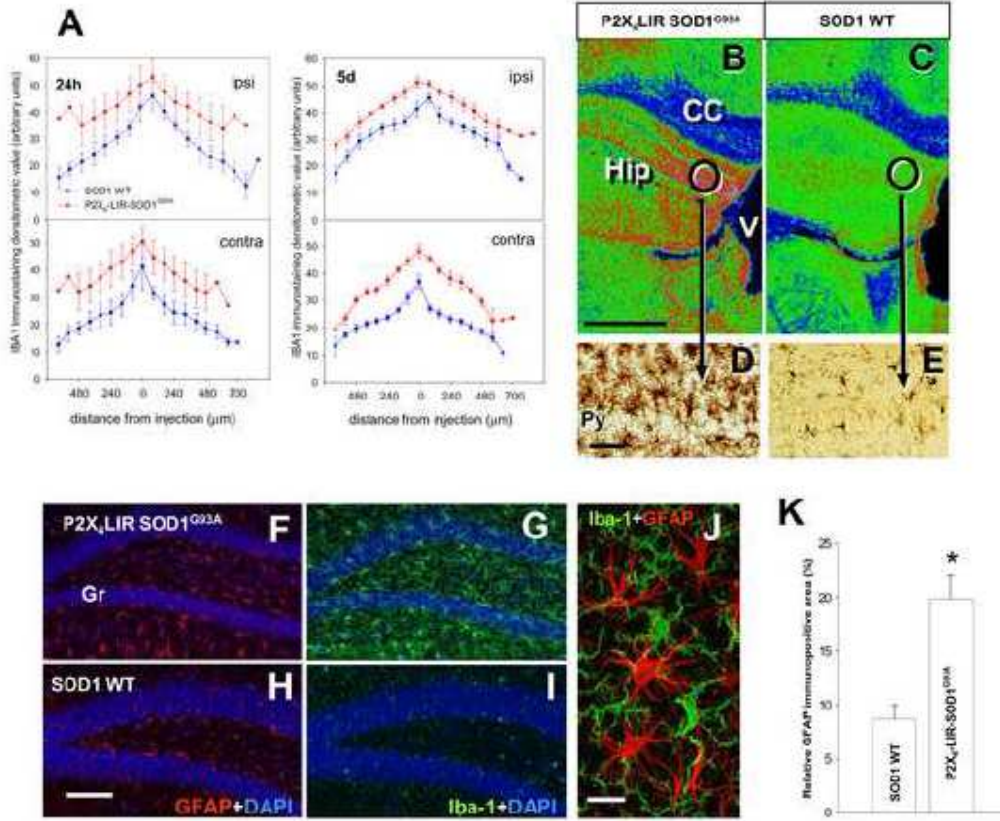
(A-B) Detail of ventral horn MN soma from an age matched control (A) and end-terminal (P150) SOD1^{G93A} rat (B) after double fluorescent labeling with anti-P2X₄ antibody (red) and with DAPI (blue); note the absence of apoptotic chromatin condensation in degenerating P2X₄-immunopositive MN. (C) Ultrastructural appearance of a degenerating P2X₄-immunopositive MN cell body from (P150) SOD1^{G93A} rat spinal cord; highly electron dense granular deposits (*) resulting from the application of a preembedding immunostaining procedure are distributed in the MN cytoplasm without apparent association with any specific organelle. Note the absence of appreciable changes in the ultrastructure of chromatin. Image was highlighted with

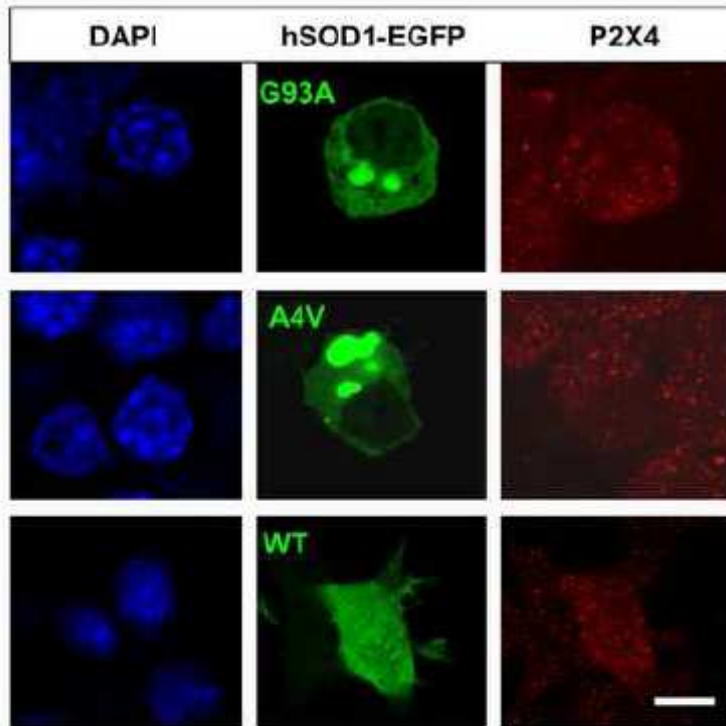
colour to delimitate the neuronal nucleus (blue) and cytoplasm (red). (D-G) Semithin sections (1 μm thick) showing ventral horn MN cell bodies from SOD1^{G93A} rats. (D) No obvious pathological changes were observed in MN somata at the presymptomatic age (P30). (E-G) MN somata taken from end-terminal stage (P150) are often associated with surrounding microglial cells (delimited by red lines) and show near normal (E), degenerating (F) or disrupted (G, delimited by dashed lines) morphology; in advanced stages of neuronophagic neuronal destruction, clustered microglial cells accumulate in the MN hollow (G). (H) Ultrastructural morphology of MN undergoing neuronophagic destruction from P150 SOD1^{G93A} rat. MN nucleus (N) is still recognizable and show a pattern of chromatin condensation in form of scattered clumps quite distinct from the larger masses of condensed chromatin found in apoptotic neurons; the cytoplasm (*) is completely disorganized and surrounded by microglial cell profiles. Image was highlighted with colour to delimitate the neuronal nucleus (blue) and microglial cell profiles (green). Bars = (A) 20 μm (valid for B); (C) 3.6 μm (valid for H); (D-F) 10 μm ; (G) 5 μm .









A**B**