



Universitat de Lleida

## Explorant la interacció entre remodelació lipídica, agregació proteica i alteracions en la microbiota en l'etiopatogènesi de l'Esclerosi Lateral Amiotròfica

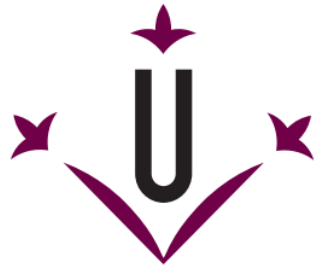
Laia Fontdevila Olivé

<http://hdl.handle.net/10803/690160>

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

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

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



**Universitat de Lleida**

## **TESI DOCTORAL**

# **Explorant la interacció entre remodelació lipídica, agregació proteica i alteracions en la microbiota en l'etiopatogènesi de l'Esclerosi Lateral Amiotròfica**

Laia Fontdevila Olivé

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

Programa de Doctorat en Salut

Directors de Tesi

Manel Portero Otín

Victoria Ayala Jové

2023









**RESUM – RESUMEN – ABSTRACT**



## RESUM

L'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) engloba un conjunt de síndromes que cursen amb degeneració i pèrdua de motoneurons (MN), determinant una paràlisi muscular progressiva. En totes les seves formes, existeixen alteracions dels sistemes d'homeòstasi lipídica, remodelant la composició del lipidoma tissular que podria contribuir a una menor resistència a l'estrès. Els canvis en el lipidoma també poden afectar als sistemes d'homeòstasi proteica resultant en fenòmens d'agregació de proteïnes. Per altra banda, es coneix que la neuroinflamació generada pot coincidir amb alteracions de la microbiota, les quals també podrien contribuir a una major susceptibilitat motoneuronal. En el present treball s'hipotetitza que l'etiopatogenia de l'ELA inclou un deteriorament del sistema d'homeòstasi dels lípids, generant alteracions lipídiques membranals, i s'associarien a canvis en la proteostasi i en el microbioma, contribuint tots ells a una major susceptibilitat a la neurodegeneració. Aquesta hipòtesi s'ha abordat en motoneurons humanes desenvolupades a partir de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC), en el model ratolí G93A i en una anàlisi del microbioma colònic. Els resultats demostren que existeix una relació entre determinants moleculars de l'homeòstasi lipídica cel·lular a MN (SCP2, FADS2, AGPS) i l'agregació patològica de proteïnes (G3BP1 i TDP-43) en l'ELA. A més, s'ha demostrat que, en MN, les disrupcions en l'homeòstasi lipídica s'associen a una agregació de diferents proteïnes que podrien contribuir a la neurodegeneració, en el model preclínic G93A i validat en MN derivades de pacients portadors de mutacions en C9orf72 i FUS. Així doncs, s'ha demostrat una agregació de Rab5/Rab7, SCP2, AGPS, PKC $\beta$ II, PLC $\beta$ 1, FADS2, PMP70 i VAPA/VAPB com a nou participant en la fisiopatologia de l'ELA. Tots aquests canvis en l'homeòstasi lipídica, juntament amb situacions d'estrès cel·lular, s'associen a canvis en els contactes mitocondri-reticle endoplasmàtic i alteracions en els peroxisomes. A més, les MN davant d'estrès cel·lular (peròxid d'hidrogen, sorbitol i ARN forà) responen modificant la distribució d'aquestes proteïnes per tal de protegir-se davant de l'agregació proteica posterior. Per últim, s'ha demostrat que els pacients portadors d'ELA poden exhibir alteracions en l'abundància de diferents bacteris, que modularia la progressió de la malaltia. Les troballes d'aquesta tesi subratllen la importància de l'homeòstasi lipídica i la proteostasi en l'etiopatogènia de l'ELA.





## RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) engloba un conjunto de síndromes que cursan con degeneración y pérdida de motoneuronas (MN), determinando una parálisis muscular progresiva. En todas sus formas, existen alteraciones de los sistemas de homeostasis lipídica, remodelando la composición del lipidoma tisular que podría contribuir a una menor resistencia al estrés. Los cambios en el lipidoma también pueden afectar a los sistemas de homeostasis proteica resultante en fenómenos de agregación de proteínas. Por otra parte, se conoce que la neuroinflamación generada puede coincidir con alteraciones de la microbiota, que también podrían contribuir a una mayor susceptibilidad motoneuronal. En el presente trabajo se hipotetiza que la etiopatogenia de la ELA incluye un deterioro del sistema de homeostasis de los lípidos, generando alteraciones lipídicas membranales, y se asociarían a cambios en la proteostasis y en el microbioma, contribuyendo todos ellos mayor susceptibilidad a la neurodegeneración. Esta hipótesis se ha abordado en motoneuronas humanas desarrolladas a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), en el modelo de ratón G93A y en un análisis del microbioma colónico. Los resultados demuestran que existe una relación entre determinantes moleculares de la homeostasis lipídica celular en MN (SCP2, FADS2, AGPS) y la agregación patológica de proteínas (G3BP1 y TDP-43) en la ELA. Además, se ha demostrado que, en MN, las disrupciones en la homeostasis lipídica se asocian a una agregación de diferentes proteínas que podrían contribuir a la neurodegeneración, en el modelo preclínico G93A y validado en MN derivadas de pacientes portadores de mutaciones en C9orf72 y FUS. Así pues, se ha demostrado una agregación de Rab5/Rab7, SCP2, AGPS, PKC $\beta$ II, PLC $\beta$ 1, FADS2, PMP70 y VAPA/VAPB como nuevo participante en la fisiopatología de la ELA. Todos estos cambios en la homeostasis lipídica, junto con situaciones de estrés celular, se asocian a cambios en los contactos mitocondria-retículo endoplasmático y alteraciones en los peroxisomas. Además, las MN frente a estrés celular (peróxido de hidrógeno, sorbitol y ARN foráneo) responden modificando la distribución de estas proteínas para protegerse frente a la agregación proteica posterior. Por último, se ha demostrado que los pacientes portadores de ELA pueden exhibir alteraciones en la abundancia de diferentes bacterias, que modularía la progresión de la enfermedad. Los hallazgos de esta tesis subrayan la importancia de la homeostasis lipídica y la proteostasis en la etiopatogenia de la ELA.



## ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) includes a group of syndromes that commonly present with degeneration and selective loss of motor neurons (MN), determining progressive muscular paralysis. In all its forms, there are alterations of the lipid homeostasis systems, remodeling the composition of the tissue lipidome that could contribute to a lower resistance to stress. Changes in the lipidome can also affect protein homeostasis systems, resulting in protein aggregation phenomena. On the other hand, it is known that the neuroinflammation generated can coincide with alterations in the microbiota, which could also contribute to greater motor neuronal susceptibility. In this study, it is hypothesized that the etiopathogenesis of ALS includes a deterioration of the lipid homeostasis system, which would generate membrane lipid alterations, and would be associated with changes in proteostasis and changes in the microbiome, all of which contribute to greater susceptibility to neurodegeneration. This hypothesis has been studied in human motoneurons developed from induced pluripotent stem cells (iPSCs), in mice model G93A and in an analysis of the colonic microbiome. The results show that there is a relationship between molecular determinants of cellular lipid homeostasis in MN (SCP2, FADS2, AGPS) and the pathological aggregation of proteins (G3BP1 and TDP-43) in ALS. In addition, it has been demonstrated that, in MN, disruptions in cellular lipid homeostasis are associated with an aggregation of different proteins that could contribute to motor neuronal neurodegeneration, in the preclinical model G93A and validated in derived MN of patients carrying mutations in C9orf72 and FUS. Thus, an aggregation of Rab5/Rab7, SCP2, AGPS, PKC $\beta$ II, PLC $\beta$ 1, FADS2, PMP70 and VAPA/VAPB has been demonstrated as a new participant in the pathophysiology of ALS. All these changes in lipid homeostasis, together with situations of cellular stress, are associated with changes in the mitochondrial-endoplasmic reticulum contacts and alterations in peroxisomes. In addition, MNs respond to cellular stress (hydrogen peroxide, sorbitol, and foreign RNA) by modifying the distribution of these proteins to protect themselves against subsequent protein aggregation. Lastly, it has been demonstrated that patients with ALS can exhibit alterations in the microbiome in the abundance of different bacteria, which would modulate the progression of the disease. The findings of this thesis underline the critical importance of lipid homeostasis and proteostasis in the etiopathogenesis of ALS, opening new perspectives for future research.





# AGRAÏMENTS



## AGRAÏMENTS

I per fi estic aquí, davant d'aquesta pàgina en blanc, sense saber massa que escriure, però amb la il·lusió de saber que això sol pot significar una cosa, i és que aquest llarg camí està arribant al seu fi.

Han estat anys enriquidors però també han estat anys difícils, plens d'incertesa, amb molts moments d'angoixa, de no saber la direcció correcta a seguir, però sempre, sempre, acompanyada de persones que han estat la meva llum en aquest camí. Sense vosaltres de ben segur que aquest camí hagués estat ple de pedres.

Gràcies, infinites gràcies, als meus pares. Sense ells jo no estaria en aquest moment escrivint el final de la meva tesi doctoral. Gràcies per ser sempre els qui heu cregut més en mi, inclòs en els moments en que ni jo mateixa ho feia. Sempre al meu costat, des del primer minut que vaig començar fins a l'últim. M'heu donat la força que he necessitat per acabar aquesta etapa, no us podia fallar, no a vosaltres. Gràcies per no deixar-me rendir mai, especialment en els darrers mesos quan les forces ja començaven a fallar.

Gràcies Roger, gràcies Ramon, gràcies en general a la meva família per donar-me sempre el seu suport i per preocupar-se per mi en tot moment.

Gràcies Lídia, sense tu aquests anys haurien estat molt i molt difícils. Has estat la meva confident durant tots aquests anys. Gràcies per escoltar-me sempre que ho he necessitat, solament tu saps com m'he sentit en cada moment i el que significa per mi acabar aquesta etapa. Gràcies per aconsellar-me en tot moment i ajudar-me a veure les coses des d'una altra perspectiva quan jo sola no ho he pogut fer.

Gràcies a la meva gosseta Cocó, per acompanyar-me durant tots els dies, totes les hores, asseguda a la meva falda mentre escrivia aquesta tesi. Gràcies per no deixar-me sola, gràcies per la teva lleialtat i per aportar-me la calma i la tranquil·litat quan més l'he necessitat.

Gràcies "iaia", per guiar-me sempre des d'algun altre lloc, on sé que estaràs molt orgullosa de la teva neta. Com diu la cançó que em recorda a tu i que ara està sonant, "Llegaré por ti a donde nadie pudo ir". Em vas veure començar en el món de la ciència i donaria el que fos per a que poguessis estar amb mi en aquest moment tant important.



Per últim, però no menys important, gràcies Manel i Victòria per la vostra ajuda i pel vostre suport en tot moment, hagués estat impossible escriure aquesta tesi sense vosaltres. Gràcies també a tots els meus companys de laboratori, en especial al Pascual, per ajudar-me sempre quan ho he necessitat i per ensenyar-me molts dels coneixements que he assolit durant aquests anys.





The background of the page is a blue marbled pattern with various shades of light and dark blue, creating a textured, organic appearance. A white rectangular box with a thin black border is positioned in the center-right of the page, containing the word 'ÍNDIX' in bold black text.

# ÍNDIX



<b>1. L'ESCLEROSI LATERAL AMIOTRÒFICA .....</b>	<b>43</b>
<b>1.1. VISIÓ GENERAL A L'ELA.....</b>	<b>43</b>
<b>1.2. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques.....</b>	<b>44</b>
<b>1.3. DIAGNÒSTIC.....</b>	<b>44</b>
<b>1.4. TRACTAMENT .....</b>	<b>45</b>
<b>1.5. ETIOLOGIA .....</b>	<b>47</b>
1.5.1. ELA i mutacions en C9orf72 .....	49
1.5.1.1. Patogènesi de C9orf72 .....	50
1.5.2. ELA i mutacions en TDP-43 .....	53
1.5.2.1. Patogènesi de TDP-43 .....	56
1.5.3. ELA i mutacions en SOD1 .....	59
1.5.3.1. Tractament dirigit a SOD1 .....	61
1.5.4. ELA i mutacions en FUS.....	62
<b>1.6. MECANISMES PATOGENÈCS EN LA FISIOPATOLOGIA DE L'ELA .....</b>	<b>64</b>
1.6.1. Estrès de reticle endoplasmàtic.....	64
1.6.2. Disfunció mitocondrial .....	66
1.6.3. Excitotoxicitat per glutamat.....	68
1.6.4. Estrès oxidatiu.....	70
1.6.4.1. Compostos inductors d'estrès .....	72
1.6.5. Alteració en el transport axonal.....	74
<b>1.7. MODELS EXPERIMENTALS.....</b>	<b>77</b>
1.7.1. Ratolins transgènics mutants per SOD1.....	77
1.7.2. Cèl·lules mare pluripotents induïdes .....	79
<b>1.8. PROCESSOS CEL·LULARS AFECTATS EN L'ELA.....</b>	<b>81</b>
1.8.1. Tràfic endosomal.....	81
1.8.2. Comunicació entre orgànuls .....	83
1.8.3. Síntesi lipídica.....	85
1.8.3.1. SCP2 .....	86
1.8.3.2. FADS2 .....	88
1.8.3.3. PKCβII .....	89
1.8.3.4. PLCβ1 .....	91
1.8.4. Alteració en proteïnes peroxisomals .....	92
1.8.4.1. AGPS.....	92
1.8.4.2. PMP70.....	93

1.8.5.	Formació de grànuls d'estrès.....	93
1.8.5.1.	G3BP1.....	94
1.8.5.2.	TDP-43.....	96
1.8.6.	Infeccions virals en l'ELA.....	96
1.8.7.	Disbiosi intestinal en l'ELA.....	98
1.8.7.1.	Microbiota intestinal.....	98
1.8.7.2.	L'eix intestí-cervell.....	102
1.8.7.3.	Microbiota i ELA.....	103
1.8.7.4.	Àcids grassos de cadena curta.....	105
<b>2.</b>	<b>HIPÒTESIS.....</b>	<b>113</b>
<b>3.</b>	<b>OBJECTIUS.....</b>	<b>119</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>125</b>
<b>4.1.</b>	<b>MOSTRES DE RATOLÍ.....</b>	<b>125</b>
4.1.1.	Extracció de la medul·la espinal dels ratolins.....	126
4.1.2.	Immunofluorescència en seccions de medul·la espinal lumbar.....	126
4.1.3.	Western Blot en mostres de medul·la espinal.....	128
<b>4.2.</b>	<b>MOSTRES HUMANES.....</b>	<b>132</b>
4.2.1.	iPSC.....	132
4.2.1.1.	Cultiu cel·lular.....	132
4.2.1.2.	Tractaments d'inducció d'estrès oxidatiu, osmòtic i per ARN forà.....	137
4.2.1.3.	Immunofluorescència en cultius de motoneurons.....	138
4.2.1.4.	Western Blot en cultius de motoneurons.....	139
4.2.2.	Mostres de femta humanes.....	140
4.2.2.1.	Extracció de l'ADN.....	140
4.2.2.2.	Anàlisi d'àcids grassos de cadena curta per cromatografia líquida.....	144
4.2.2.3.	Cromatografia líquida d'alta eficàcia.....	146
<b>4.3.</b>	<b>MICROSCÒPIA.....</b>	<b>146</b>
4.3.1.	Microscòpia de fluorescència.....	146
4.3.2.	Microscòpia de fluorescència confocal.....	146
<b>4.4.</b>	<b>ANÀLISI ESTADÍSTIC.....</b>	<b>148</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>153</b>
<b>5.1.</b>	<b>ALTERACIÓ EN PROTEÏNES IMPLICADES EN EL TRÀFIC ENDOSOMAL.....</b>	<b>153</b>

5.1.1.	Anàlisi en seccions de medul·la espinal lumbar de ratolins G93A.....	153
5.1.2.	Anàlisi en el model cel·lular de motoneurons derivades de pacients .....	159
5.1.2.1.	Rab5 .....	159
5.1.2.1.1.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab5 en les cèl·lules de la línia control .....	162
5.1.2.1.2.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab5 en les cèl·lules de la línia C9orf72 .....	164
5.1.2.1.3.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab5 en les cèl·lules de la línia FUS.....	166
5.1.2.2.	Rab7 .....	169
5.1.2.2.1.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab7 en les cèl·lules de la línia control .....	172
5.1.2.2.2.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab7 en les cèl·lules de la línia C9orf72 .....	174
5.1.2.2.3.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab7 en les cèl·lules de la línia FUS.....	177
<b>5.2.</b>	<b>ALTERACIÓ EN PROTEÏNES ENCARREGADES DE LA COMUNICACIÓ ENTRE ORGÀNULS .....</b>	<b>179</b>
5.2.1.	Anàlisi en seccions de medul·la espinal lumbar de ratolins G93A.....	180
5.2.2.	Anàlisi en el model cel·lular de motoneurons derivades de pacients .....	183
5.2.2.1.	VAPA .....	184
5.2.2.1.1.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPA en les cèl·lules de la línia control .....	186
5.2.2.1.2.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPA en les cèl·lules de la línia C9orf72 .....	188
5.2.2.1.3.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPA en les cèl·lules de la línia FUS.....	190
5.2.2.2.	VAPB.....	192
5.2.2.2.1.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPB en les cèl·lules de la línia control.....	194
5.2.2.2.2.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPB en les cèl·lules de la línia C9orf72 .....	196
5.2.2.2.3.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPB en les cèl·lules de la línia FUS .....	198
<b>5.3.</b>	<b>ALTERACIÓ EN PROTEÏNES ENCARREGADES DE LA SÍNTESI LIPÍDICA .....</b>	<b>201</b>
5.3.1.	Anàlisi en seccions de medul·la espinal lumbar de ratolins G93A.....	202
5.3.1.1.	Anàlisi de PKC $\beta$ II a diferents fases de la malaltia en ratolins .....	207
5.3.1.1.1.	PKC $\beta$ II als 90 dies d'edat .....	207
5.3.1.1.2.	PKC $\beta$ II als 120 dies d'edat .....	210
5.3.1.1.3.	PKC $\beta$ II als 150 dies d'edat .....	213
5.3.1.2.	Anàlisi de PLC $\beta$ 1 a diferents fases de la malaltia en ratolins .....	215
5.3.1.2.1.	PLC $\beta$ 1 als 90 dies d'edat .....	216
5.3.1.2.2.	PLC $\beta$ 1 als 120 dies d'edat .....	218
5.3.1.2.3.	PLC $\beta$ 1 als 150 dies d'edat .....	221
5.3.2.	Anàlisi en el model cel·lular de motoneurons derivades de pacients .....	223



5.3.2.1.	SCP2 .....	224
5.3.2.1.1.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de SCP2 en les cèl·lules de la línia control .....	226
5.3.2.1.2.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de SCP2 en les cèl·lules de la línia C9orf72 .....	228
5.3.2.1.3.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de SCP2 en les cèl·lules de la línia FUS .....	231
<b>5.4.</b>	<b>ALTERACIÓ EN PROTEÏNES PEROXISOMALS .....</b>	<b>233</b>
5.4.1.	Anàlisi en seccions de medul·la espinal lumbar de ratolins G93A.....	233
5.4.2.	Anàlisi en el model cel·lular de motoneurons derivades de pacients .....	238
5.4.2.1.	AGPS.....	238
5.4.2.1.1.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació d'AGPS en les cèl·lules de la línia control.....	241
5.4.2.1.2.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació d'AGPS en les cèl·lules de la línia C9orf72 .....	243
5.4.2.1.3.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació d'AGPS en les cèl·lules de la línia FUS .....	246
5.4.2.2.	PMP70.....	248
5.4.2.2.1.	Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de PMP70 en les cèl·lules de la línia C9orf72..	249
<b>5.5.</b>	<b>ALTERACIÓ EN PROTEÏNES PRESENTS EN GRÀNULS D'ESTRÈS.....</b>	<b>252</b>
5.5.1.	Anàlisi en el model cel·lular de motoneurons derivades de pacients .....	252
5.5.1.1.	Línia control .....	254
5.5.1.1.1.	Efecte de l'estrès oxidatiu sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia control.....	254
5.5.1.1.2.	Efecte de l'estrès per ARN forà sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia .....	257
5.5.1.2.	Línia C9orf72 .....	259
5.5.1.2.1.	Efecte de l'estrès oxidatiu sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia C9orf72....	259
5.5.1.2.2.	Efecte de l'estrès per ARN forà sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia .....	262
5.5.1.3.	Línia FUS.....	265
5.5.1.3.1.	Efecte de l'estrès oxidatiu sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia FUS .....	265
5.5.1.3.2.	Efecte de l'estrès per ARN forà sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia FUS ..	267
<b>5.6.</b>	<b>ANÀLISI D'ÀCIDS GRASSOS DE CADENA CURTA.....</b>	<b>270</b>
<b>5.7.</b>	<b>ANÀLISI DE LA MICROBIOTA INTESTINAL .....</b>	<b>272</b>
5.7.1.	Abundància de bacteris a nivell de fílum .....	272
5.7.1.1.	Firmicutes.....	273

5.7.1.2.	Bacteroidetes .....	273
5.7.1.3.	Proteobacteria .....	275
5.7.1.4.	Cyanobacteria .....	275
5.7.1.5.	Actinobacteria .....	276
5.7.1.6.	Fusobacteria .....	277
5.7.2.	Abundància de bacteris a nivell de família .....	279
5.7.2.1.	Bacteroidaceae .....	279
5.7.2.2.	Ruminococcaceae .....	280
5.7.3.	Abundància de bacteris a nivell de gènere .....	282
5.7.3.1.	Bacteroides .....	282
5.7.3.2.	Prevotella .....	283
5.7.3.3.	Clostridium .....	284
5.7.3.4.	Veillonella .....	284
5.7.3.5.	Butyrivibrio .....	286
5.7.4.	Abundància de bacteris a nivell d'espècie .....	288
5.7.4.1.	Pseudobutyrvibrio xylanivorans .....	288
5.7.4.2.	Blautia Wexlerae .....	289
<b>6.</b>	<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>295</b>
6.1.	DETERMINANTS MOLECULARS EN LA FISIOPATOLOGIA DE LA MALALTIA .....	295
6.2.	EL MICROBIOMA I EL SEU METABOLISME COM A DETERMINANT FISIOPATOLÒGIC .....	308
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>323</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>329</b>

## ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Mutacions més freqüents en els gens vinculats amb l'ELA en població europea i asiàtica. .	49
Figura 2. Mecanismes associats a la malaltia per C9orf72. ....	53
Figura 3. Estructura de la proteïna TDP-43. ....	55
Figura 4. Mecanisme de TDP-43 de repressió de la transcripció dels exons críptics en el seu estat normal. ....	58
Figura 5. Esquema de la funció de la proteïna SOD1. ....	59
Figura 6. Diagrama de l'organització genòmica del gen FUS amb les mutacions identificades en l'ELA. ....	63
Figura 7. Esquema representatiu de la relació entre la disfunció mitocondrial i l'estrès oxidatiu. ....	71
Figura 8. Representació del transport axonal i els gens implicats. ....	77
Figura 9. Representació de l'associació de les proteïnes Rab en la formació dels endosomes. ....	82
Figura 10. Funció de SCP2 en el transport i metabolisme del colesterol i altres lípids. ....	87
Figura 11. Via convencional dels PUFA n-3 i n-6. ....	88
Figura 12. Vies d'activació de la PKC. ....	90
Figura 13. Diagrama de la via en la que participa PLCβ1. ....	91
Figura 14. G3BP1 forma part del nucli dels grànuls d'estrès. ....	95
Figura 15. Associació de les alteracions en el rati Firmicutes/Bacteroidetes amb diferents malalties. ....	99
Figura 16. Interacció entre el cervell i el intestí. ....	103
Figura 17. Descripció general de les vies de fermentació bacteriana per la producció d'àcids grassos de cadena curta. ....	108
Figura 18. Protocol d'obtenció de les motoneurons a partir de les iPSC. ....	137
Figura 19. Aparició de cada estàndard en el seu temps de retenció. ....	145
Figura 20. Motoneurons marcades per tubulina βIII. ....	147
Figura 21. Flux de treball de la pipeline creada pel CellProfiler. ....	148
Figura 22. Exemple dels resultats obtinguts de la seqüenciació. ....	149
Figura 23. Agregació de Rab5 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. ....	154
Figura 24. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de Rab5 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. ....	155
Figura 25. Els nivells de Rab5 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies ni als 120 dies d'edat. ....	156
Figura 26. Agregació de Rab7 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. ....	157
Figura 27. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de Rab7 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. ....	158
Figura 28. Els nivells de Rab7 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies ni als 120 dies d'edat. ....	159
Figura 29. Agregació de Rab5 en les cèl·lules de línia control, C9orf72 i FUS. ....	160
Figura 30. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS. ....	161
Figura 31. Agregació de Rab5 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia control. ....	162
Figura 32. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab5 sota l'estrès osmòtic induït amb sorbitol en les cèl·lules de la línia control. ....	163

Figura 33. Agregació de Rab5 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	164
Figura 34. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab5 sota l'estrès osmòtic induït amb sorbitol en les cèl·lules de la línia C9orf72.....	165
Figura 35. Alteració en els nivells de Rab5 sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de línia C9orf72. ....	166
Figura 36. Agregació de Rab5 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia FUS.....	167
Figura 37. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab5 sota l'estrès osmòtic induït amb sorbitol en les cèl·lules de la línia FUS. ....	168
Figura 38. Els nivells de Rab5 no es troben alterats sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de línia FUS.....	169
Figura 39. Agregació de Rab7 en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS.....	170
Figura 40. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab7 en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS.....	171
Figura 41. Agregació de Rab7 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia control. ....	172
Figura 42. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab7 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de línia control. ....	173
Figura 43. Agregació de Rab7 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de línia C9orf72.....	174
Figura 44. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab7 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia C9orf72.....	175
Figura 45. Alteració en els nivells de Rab7 sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de línia C9orf72. ....	176
Figura 46. Agregació de Rab7 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia FUS.....	177
Figura 47. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab7 sota l'estrès osmòtic induït amb sorbitol en les cèl·lules de la línia FUS. ....	178
Figura 48. Els nivells de Rab7 no es troben alterats sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia FUS. ....	179
Figura 49. Agregació de VAPA en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. ....	180
Figura 50. El nombre d'agregats de VAPA no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat.....	181
Figura 51. Agregació de VAPB en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. ....	182
Figura 52. El nombre d'agregats de VAPB no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat.....	183
Figura 53. Agregació de VAPA en les cèl·lules de línia control, C9orf72 i FUS.....	184
Figura 54. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPA en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS.....	185
Figura 55. Agregació de VAPA sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia control.....	186
Figura 56. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPA sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia control.....	187
Figura 57. Agregació de VAPA sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72. ...	188

Figura 58. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPA sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia C9orf72.....	189
Figura 59. Agregació de VAPA sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia FUS.....	190
Figura 60. El nombre d'agregats de VAPA no es troba alterat en cap de les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades en les cèl·lules de la línia FUS.....	191
Figura 61. Agregació de VAPB en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. ....	192
Figura 62. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPB en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS.....	193
Figura 63. Agregació de VAPB sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia control. ....	194
Figura 64. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPB sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia control. ....	195
Figura 65. Agregació de VAPB sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72. ...	196
Figura 66. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPB sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia C9orf72.....	197
Figura 67. Alteració en els nivells de VAPB sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	198
Figura 68. Agregació de VAPB sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia FUS.....	199
Figura 69. El nombre d'agregats de VAPB no es troba alterat en cap de les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades en les cèl·lules de la línia FUS.....	200
Figura 70. Alteració en els nivells de VAPB sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia FUS. ....	201
Figura 71. Agregació de SCP2 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. ....	203
Figura 72. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de SCP2 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat.....	203
Figura 73. Alteració en els nivells de SCP2 en les cèl·lules dels ratolins G93A de 120 dies d'edat. ...	204
Figura 74. Agregació de FADS2 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. ....	205
Figura 75. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de FADS2 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. ....	206
Figura 76. Els nivells de FADS2 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A ni als 90 dies ni als 120 dies d'edat. ....	207
Figura 77. Agregació de PKC $\beta$ II en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 90 dies d'edat. ....	208
Figura 78. El nombre d'agregats de PKC $\beta$ II no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies d'edat.....	209
Figura 79. Els nivells de PKC $\beta$ II no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies d'edat. ....	210
Figura 80. Agregació de PKC $\beta$ II en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 120 dies d'edat. ....	211
Figura 81. El nombre d'agregats de PKC $\beta$ II no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 120 dies d'edat.....	212

Figura 82. Els nivells de PKC $\beta$ II no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 120 dies d'edat. ....	213
Figura 83. Agregació de PKC $\beta$ II en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. ....	214
Figura 84. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de PKC $\beta$ II en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. ....	215
Figura 85. Agregació de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 90 dies d'edat. ....	216
Figura 86. El nombre d'agregats de PLC $\beta$ 1 no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies d'edat. ....	217
Figura 87. Els nivells de PLC $\beta$ 1 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies d'edat. ....	218
Figura 88. Agregació de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 120 dies d'edat. ....	219
Figura 89. El nombre d'agregats de PLC $\beta$ 1 no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 120 dies d'edat. ....	220
Figura 90. Els nivells de PLC $\beta$ 1 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 120 dies d'edat. ....	221
Figura 91. Agregació de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. ....	222
Figura 92. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. ....	223
Figura 93. Agregació de SCP2 en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. ....	224
Figura 94. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de SCP2 en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS. ....	225
Figura 95. Agregació de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia control. ....	226
Figura 96. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de línia control. ....	227
Figura 97. Agregació de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	228
Figura 98. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	229
Figura 99. Els nivells de SCP2 no es troben alterats sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	230
Figura 100. Agregació de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia FUS. ....	231
Figura 101. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia FUS. ....	232
Figura 102. Agregació d'AGPS en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. ....	233
Figura 103. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears d'AGPS en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. ....	234
Figura 104. Els nivells d'AGPS no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies ni als 120 dies d'edat. ....	235

Figura 105. Agregació de PMP70 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. ....	236
Figura 106. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de PMP70 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. ....	237
Figura 107. Els nivells de PMP70 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies ni als 120 dies d'edat. ....	238
Figura 108. Agregació d'AGPS en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. ....	239
Figura 109. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics d'AGPS en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS. ....	240
Figura 110. Agregació d'AGPS sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia control. ....	241
Figura 111. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics d'AGPS sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia control. ....	242
Figura 112. Agregació d'AGPS sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72. ...	243
Figura 113. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears d'AGPS sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	244
Figura 114. Alteració en els nivells d'AGPS sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	245
Figura 115. Agregació d'AGPS sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia FUS. ....	246
Figura 116. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears d'AGPS sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia FUS. ....	247
Figura 117. Agregació d'AGPS en les cèl·lules de la línia control i C9orf72. ....	248
Figura 118. No es detecten canvis en el nombre d'agregats de PMP70 en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	249
Figura 119. Agregació de PMP70 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	250
Figura 120. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de PMP70 sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	251
Figura 121. Agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. ....	252
Figura 122. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS. ....	253
Figura 123. Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia control. ...	255
Figura 124. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de G3BP1 i en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de TDP-43 sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia control. ....	256
Figura 125. Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès per ARN forà en les cèl·lules de la línia control. ....	257
Figura 126. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de G3BP1 i en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de TDP-43 sota l'estrès per ARN forà induït amb Poly-IC en les cèl·lules de la línia control. ....	259
Figura 127. Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia C9orf72. ...	260
Figura 128. Alteració en el nombre d'agregats citosòlic i nuclears de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	261
Figura 129. Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès per ARN forà en les cèl·lules de la línia C9orf72. ....	263

Figura 130. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès per ARN forà induït amb Poly-IC en les cèl·lules de la línia C9orf72.....	264
Figura 131. Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia FUS. ....	265
Figura 132. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia FUS. ....	266
Figura 133. Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès per ARN forà en les cèl·lules de la línia FUS.	268
Figura 134. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès per ARN forà induït amb Poly-IC en les cèl·lules de la línia FUS. ....	269
Figura 135. Els nivells d'àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric no es troben alterats en l'ELA. ....	271
Figura 136. Els nivells d'àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric no es troben alterats en cap dels fenotips de l'ELA. ....	271
Figura 137. Correlació entre els nivells d'àcid butíric i àcid propiònic en els controls, pacients d'ELA espinal i ELA bulbar. ....	272
Figura 138. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum Firmicutes en l'ELA. ....	273
Figura 139. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum Bacteroidetes en l'ELA....	274
Figura 140. No es detecten canvis en el rati Firmicutes/Bacteroidetes en l'ELA. ....	274
Figura 141. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum Proteobacteria en l'ELA. ...	275
Figura 142. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum Cyanobacteria en l'ELA. ...	276
Figura 143. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum Actinobacteria en l'ELA. ..	276
Figura 144. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum Fusobacteria en l'ELA. ....	277
Figura 145. Separació per fílum dels bacteris presents en la microbiota dels pacients d'ELA espinal i ELA bulbar. ....	278
Figura 146. Correlació entre la durada de la malaltia i l'abundància de bacteris del fílum Proteobacteria, Deferribacteres i Fibrobacteres. ....	279
Figura 147. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris de la família Bacteroidaceae en l'ELA. ....	280
Figura 148. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris de la família Ruminococcaceae en l'ELA.....	280
Figura 149. Correlació entre l'abundància de Ruminococcaceae i els nivells d'àcid butíric en els pacients d'ELA espinal i ELA bulbar.....	281
Figura 150. Separació per família dels bacteris presents en la microbiota dels pacients d'ELA espinal i ELA bulbar. ....	282
Figura 151. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del gènere Bacteroides en l'ELA. ....	283
Figura 152. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del gènere Prevotella en l'ELA.....	283
Figura 153. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del gènere Clostridium en l'ELA. ....	284
Figura 154. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del gènere Veillonella en l'ELA. ....	285
Figura 155. Correlació entre l'abundància de Veillonella i els nivells d'àcid propiònic en els pacients d'ELA bulbar. ....	286
Figura 156. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del gènere Butyrivibrio en l'ELA. ....	286
Figura 157. Correlació entre l'abundància de Butyrivibrio i els nivells d'àcid butíric en els pacients d'ELA bulbar. ....	287
Figura 158. Separació per gènere dels bacteris presents en la microbiota dels pacients d'ELA espinal i ELA bulbar. ....	288
Figura 159. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris de l'espècie Pseudobutyrvibrio xylanivorans en l'ELA.....	288



Figura 160. Correlació entre l'abundància de <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> i els nivells d'àcid butíric en els pacients d'ELA bulbar.....	289
Figura 161. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris de l'espècie <i>Blautia Wexlerae</i> en l'ELA.....	290
Figura 162. Correlació entre l'abundància de <i>Blautia Wexlerae</i> i la pèrdua de pes en els pacients d'ELA bulbar.....	290
Figura 163. La diversitat d'espècies no es troba alterada en l'ELA.....	291

## ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Ratolins G93A i ratolins no transgènics amb les seves edats corresponents. ....	125
Taula 2. Anticossos primaris utilitzats per immunofluorescència en les seccions de medul·la espinal. ....	127
Taula 3. Anticossos secundaris utilitzats per immunofluorescència en les seccions de medul·la espinal. ....	127
Taula 4. Medi i concentracions utilitzades pel tampó d'homogeneïtzació. ....	128
Taula 5. Components i concentracions utilitzades pel Loading Buffer. ....	129
Taula 6. Components i concentracions utilitzades pel gel separador. ....	129
Taula 7. Components i concentracions utilitzades pel gel empilador. ....	130
Taula 8. Anticossos primaris utilitzats per Western Blot en les mostres de medul·la espinal. ....	131
Taula 9. Línies de iPSC utilitzades amb la seva mutació corresponent. ....	132
Taula 10. Medi i concentracions utilitzades pel creixement i manteniment de les iPSC. ....	133
Taula 11. Medis i concentracions utilitzades per la diferenciació de les motoneurons a partir de les iPSC. ....	134
Taula 12. Tractament d'inducció d'estrès en els cultius de motoneurons. ....	138
Taula 13. Anticossos primaris utilitzats per immunofluorescència en els cultius de motoneurons. ....	139
Taula 14. Anticossos primaris utilitzats per Western Blot en els cultius de motoneurons. ....	140
Taula 15. Dades clíniques dels controls i pacients d'ELA. ....	141
Taula 16. Concentracions d'ADN en les mostres de femta de controls i pacients d'ELA mesurades amb el Nanodrop a una longitud d'ona de 260nm. ....	143



The image features a blue and white marbled background with a white rectangular box in the center containing the text 'ABREVIATURES'.

## **ABREVIATURES**



## ABREVIATURES

ABREVIATURA	SIGNIFICAT
<b>A:</b>	
AGCC	Àcid gras de cadena curta
AGE	Producte de glicació avançada
AGPS	Alquilglicerona fosfat sintasa
ALA	Àcid $\alpha$ -linolènic
AMPA	Àcid $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiònic
AR	Aldosa reductasa
ARN	Àcid ribonucleic
ARNbc	Àcid ribonucleic bicatenari
ARNi	Àcid ribonucleic d'interferència
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
ARNr	Àcid ribonucleic ribosòmic
ASO	Oligonucleòtid antisentit
ATF6	Factor de transcripció activador 6
ATG4B	Autophagy related 4B cytesine peptidase
ATP	Adenosina trifosfat
<b>B:</b>	
BDNF	Factor neurotròfic derivat del cervell
BF	Blocking Buffer
BMP	Bone morphogenetic protein signaling
<b>C:</b>	
CEIM	Comitè d'ètica i experimentació amb medicaments
CoA	Acil-coenzim A
CNTF	Factor neurotròfic ciliar
<b>D:</b>	
DAG	Diacilglicerol
DHA	Àcid docosahexaenoic
DPA	Àcid docosapentaenoic
DPR	Repetició de dipèptids
<b>E:</b>	
ELA	Esclerosi lateral amiotròfica
ELAE	Esclerosi lateral amiotròfica esporàdica
ELAF	Esclerosi lateral amiotròfica familiar
ESC	Cèl·lules mare embrionàries
ETC	Cadena de transport d'electrons
EV	Enterovirus
<b>F:</b>	
FADS2	Àcid gras desaturasa 2
FDA	Administració d'aliments i medicaments

FGF	Factor de creixement de fibroblasts
FUS	Fused in sarcoma
<b>G:</b>	
GAP	Proteïna intercanviadora de la hidròlisis de GTP
GEF	Factor intercanviador de nucleòtid guanina
GLA	Àcid $\gamma$ -linolènic
<b>H:</b>	
HDL	Lipoproteïnes d'alta densitat
HPLC	Cromatografia líquida d'alta eficàcia
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peròxid d'hidrogen
<b>I:</b>	
IF	Immunofluorescència
IL-1 $\beta$	Interleuquina 1 $\beta$
IL-6	Interleuquina 6
iPSC	Cèl·lules mare pluripotents induïdes
IP3	Inositol trifosfat
IRE1	Enzim 1 requeridor d'inositol
<b>K:</b>	
KOH	Hidròxid de potassi
<b>L:</b>	
LA	Àcid linoleic
LCR	Líquid cefalorraquidi
LDL	Lipoproteïna de baixa densitat
<b>M:</b>	
MAPT	Proteïna tau associada a microtúbuls
MCI	Deteriorament cognitiu lleu
MCS	Llocs de contacte de membrana
MN	Motoneurons
MNI	Motoneurons inferiors
MNS	Motoneurons superiors
<b>N:</b>	
NES	Senyal d'exportació nuclear
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
NGS	Normal goat sèrum
NLS	Senyal de localització nuclear
NMDA	N-metil-d-aspàrtic
NOS	Òxid nítric sintasa

<b>P:</b>	
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PERK	Quinasa del reticle endoplasmàtic
PFA	Paraformaldehid
PIDK	Quinasa dependent de fosfatidilinositol
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PKC	Proteïna quinasa C
PKC $\beta$ II	Proteïna quinasa C $\beta$ II
PLC	Fosfolipasa C
PLC $\beta$ 1	Fosfolipasa C $\beta$ 1
PMP70	Proteïna de membrana peroxisomal
Poly-IC	Polyinosinic:polycytidylic acid potassium salt
PUFA	Àcids grassos poliinsaturats
<b>R:</b>	
RAN	Traducció no iniciada per AUG
RBP	Proteïnes d'unió a l'ARN
RCDP	Condrolàsia punctata rizomèlica
RE	Reticle endoplasmàtic
RNP	Ribonucleoproteïna
ROS	Espècies reactives d'oxigen
<b>S:</b>	
SCP2	Proteïna transportadora d'esterols
SDH	Sorbitol deshidrogenasa
SFPQ	Factor de <i>splicing</i> ric en prolina i glutamina
SHH	Sonic hedgehog
SNC	Sistema nerviós central
SOD1	Superòxid dismutasa 1
SPTLC1	Serina palmitoiltransferasa subunitat bàsica 1 de cadena llarga
<b>T:</b>	
TDP-43	TAR DNA-binding protein 43
TGF- $\beta$	Factor de creixement transformador $\beta$
TLR-3	Receptor tipo toll 3
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>U:</b>	
UPR	Resposta a proteïnes desplegadas
<b>V:</b>	
VAMP	Proteïnes de membrana associades a vesícules
VAP	Proteïnes associades a VAMP
<b>W:</b>	
WB	Western Blot







# **INTRODUCCIÓ**



# 1.

# L'Esclerosi Lateral Amiotròfica

## 1.1. Visió general a l'ELA

L'esclerosi lateral amiotròfica (ELA), també coneguda com malaltia de Lou Gehrig, és una malaltia neurodegenerativa que afecta a les motoneurons (MN), tant a les motoneurons inferiors (MNI) localitzades al tronc cerebral i medul·la espinal com a les motoneurons superiors (MNS) situades a l'escorça motora (K. Yamanaka & Komine, 2018). Els patrons d'inici de la malaltia són variables, encara que la gran majoria comencen amb signes de degeneració de les MNI (Brotman et al., 2022).

Al ser una malaltia progressiva, la pèrdua neuronal acaba provocant atròfia muscular, debilitat i espasticitat, amb tots els casos amb paràlisi de la musculatura encarregada de la respiració i per tant, causant la mort del pacient per insuficiència respiratòria (K. Yamanaka & Komine, 2018).

L'edat mitja d'aparició dels símptomes és variable, normalment és de 58 a 63 anys en el cas d'ELA esporàdica (ELAe) i entre els 40 i 60 anys en els casos d'ELA familiar (ELAf) (Logroscino et al., 2010).

A nivell mundial és la malaltia de la motoneurona més prevalent en l'adult (45-75 anys), amb una incidència de 1-3 persones de cada 100.000 habitants per any tot i que ascendeix fins a 4-8 persones per 100.000 persones i per any en el grup d'edat que tenen major risc de desenvolupar la malaltia (45-75 anys). La prevalença és de 10-12 per cada 100.000 a Europa tot i que existeixen diferències geogràfiques significatives (GBD 2016 Motor Neuron Disease Collaborators, 2018; Logroscino et al., 2010; Marin et al., 2017).

L'ELA afecta a més homes que a dones en una proporció de 2:1 (Bozzoni et al., 2016). Es tracta d'una malaltia on l'esperança de vida mitja és de 2 a 5 anys després del diagnòstic, encara que el 30% dels pacients estan vius després dels 5 anys, i entre un 10% i 20% després

dels 10 anys. Els factors que estan associats a una major supervivència són l'augment de pes (obesitat lleu) i ser més jove, ambdós factors en el moment del diagnòstic (Limousin et al., 2010; Westeneng et al., 2018).

Els primers informes sobre aquesta malaltia van ser publicats en la literatura mèdica britànica a principis del 1830, tot i així, la descripció més detallada de l'ELA va ser a l'any 1869 pel francès Dr. Jean Charcot. Aquest autor es considera un dels pioners de la neurologia i el pare de l'ELA, no per ser el primer en informar sobre aquesta malaltia, sinó per fer un estudi sobre la debilitat muscular present en l'ELA (Katz et al., 2015).

## **1.2. Característiques clíniques**

En la majoria dels casos els símptomes apareixen entre els 50 i 65 anys, essent menys freqüent les formes juvenils. Hi ha diverses variants clíniques d'aquesta malaltia que corresponen a diferents punts d'inici dels símptomes, sent l'ELA clàssica la més coneguda. Dins de l'ELA clàssica, on hi ha afectació de la MNS i MNI, trobem el fenotip medul·lar i el bulbar. En el cas del fenotip medul·lar (75% dels casos), els primers símptomes en aparèixer són la debilitat muscular, acompanyada d'atròfia muscular i progressant a una paràlisi de tipus espàstica on els músculs es troben rígids i hipertònics. Aquesta paràlisi és progressiva i acostuma a començar a les extremitats inferiors i s'estén als llocs contigus. Ja en les fases més avançades de la malaltia, hi ha afectació de la musculatura encarregada de la respiració, donant insuficiència respiratòria, sent aquesta una des les causes de mort dels pacients amb ELA. Per altra banda, el fenotip bulbar (25% dels casos) es troben símptomes molt diferents, com la disfàgia (dificultat en la deglució) i disàrtria (alteracions de la parla). Aquest fenotip té una esperança de vida menor i la causa de mort és també, normalment, la insuficiència respiratòria (H.-F. Li & Wu, 2016; Zarei et al., 2015).

## **1.3. Diagnòstic**

El diagnòstic d'aquesta malaltia es du a terme a partir de l'exploració física. Al 1990 es van publicar un conjunt de criteris clínics, anomenats El Escorial, que es divideixen en diversos nivells depenent de la presència i de la progressió dels signes d'afectació de la MNS i MNI. Aquests criteris, 8 anys després, es van actualitzar i per tal de poder diagnosticar la malaltia

cal que alguns criteris estiguin presents i d'altres no. En concret, El Escorial estableix que pel diagnòstic d'ELA es requereix la presència de: evidència clínica, electrofísica o neuropatològica de degeneració de la MNS, de la MNI i evidència de propagació progressiva de símptomes o signes dins d'una regió o altres regions. Tot això combinat amb una absència d'evidències electrofisiològiques o patològiques d'altres processos patològics que podrien explicar la degeneració de la motoneurona del pacient (Brooks et al., 2000; Brotman et al., 2022).

L'electromiograma també és eficient ja que les fibril·lacions són indicadores d'un procés actiu de dennervació (Al-Chalabi & Leigh, 2000; Zarei et al., 2015).

#### **1.4. Tractament**

Durant les últimes dècades, més de 40 assaigs aleatoris en pacients amb la malaltia no han mostrat cap efecte beneficiós sobre la progressió de la malaltia o sobre la supervivència, mostrant doncs la complexitat de la malaltia (Mitsumoto et al., 2014).

Desafortunadament, en la majoria dels països europeus l'únic tractament aprovat per l'administració d'aliments i medicaments (FDA) és el Riluzol. Amb una administració de 50mg dues vegades al dia s'ha demostrat que millora la supervivència, allargant de 6 fins a 21 mesos l'esperança de vida del pacient. Aquest fàrmac solament es recomana en pacients amb ELA definitiva o probable segons els criteris de El Escorial on s'hagin descartat altres causes d'atròfia muscular progressiva (Bensimon et al., 1994; Mitsumoto et al., 2014). Aquest fàrmac té més d'una diana molecular relacionada amb la neuroprotecció, com per exemple la inhibició de l'excitotoxicitat mitjançada pel glutamat i bloqueig de canals de calci, sodi i potassi. Els efectes secundaris més freqüents són les nàusees, l'astènia, els vòmits, la diarrea, l'anorèxia i altres més severes com pancreatitis, hepatitis i neutropènia (Pereira et al., 2017).

Més recentment, s'ha estudiat un altre fàrmac, l'Edaravone, que és un eliminador de radicals lliures. Amb una administració intravenosa de 60mg/dia dues setmanes al mes durant 6 mesos s'ha observat que redueix l'estrès oxidatiu i que podria ser beneficiós en aquells pacients amb símptomes en una etapa primerenca. Malgrat això, fins ara aquest

fàrmac solament està aprovat en Estats Units, Canadà, Japó, Corea del Sud i Suïssa, però no en la Unió Europea (Abe et al., 2017).

Una altra teràpia que està sota investigació és el Mastinib el qual és un inhibidor oral de la tirosina quinasa. En un assaig aleatoritzat on s'utilitza 4.5mg/kg/dia com a teràpia addicional al Riluzol va suggerir un efecte positiu en els pacients que tenien una progressió típica de la malaltia (Mora et al., 2020).

Per altra banda, Tofersen és un altre tractament que actualment està sent avaluat en assaigs clínics i esperant la seva aprovació per la FDA en els pròxims mesos. Tal i com s'explicarà amb més detall, un 2% dels casos d'ELA estan associats amb mutacions al gen que codifica per la superòxid dismutasa 1 (SOD1) (Müller et al., 2018) causant un guany tòxic de funció de la proteïna resultant (H. Ilieva et al., 2009). Tofersen és un oligonucleòtid antisentit (ASO) administrat per via intratecal dissenyat per reduir la síntesi de la proteïna SOD1 mitjançant la inducció de l'ARNasa H1 per tal de degradar l'ARNm de SOD1 (T. Miller et al., 2020; Rinaldi & Wood, 2018). En aquest assaig clínic s'ha observat que després de l'administració durant 28 setmanes es reduïa la concentració total de SOD1 en el líquid cefalorraquidi (LCR). A més a més, també reduïa en plasma la cadena lleugera de neurofilament, marcador de dany axonal i neurodegeneració. Tofersen sembla una teràpia prometedora per l'ELA, tot i així, es va realitzar en un nombre reduït de pacients i per aquest motiu es necessita més estudis per tal de comprovar l'eficàcia del tractament (T. M. Miller et al., 2022).

Tot i així, al ser una malaltia molt complexa amb diferent simptomatologia, els pacients necessiten una atenció multidisciplinària, com cuidadors de neurologia, fisioteràpia, teràpia respiratòria, dietètica i infermeria (Andersen et al., 2012; R. G. Miller et al., 2009).

Els pacients amb ELA acostumen a tenir insuficiència respiratòria crònica degut a la debilitat dels músculs diafragmàtics i intercostals. Com aquesta debilitat és progressiva, possiblement en un futur es necessitarà d'una traqueotomia. També s'informa al pacient sobre opcions pal·liatives pel control dels símptomes com ansiolítics, opiacis o la sedació (Andersen et al., 2012).

El debilitament progressiu dels músculs de la masticació i la deglució produeix disfàgia i per tant, s'haurà de tractar a partir de modificacions en la dieta. Hi ha una pèrdua de pes,

sobretot durant els primers anys després del diagnòstic i això s'associa amb un pitjor pronòstic i per tant, es recomana aliments rics en calories i begudes nutricionals. A mesura que empitjora la disfàgia, augmenta el risc d'aspiració i pèrdua de pes. Diversos estudis han demostrat l'eficàcia de la nutrició enteral per gastrostomia percutània (Kasarskis et al., 2014).

### **1.5. Etiologia**

L'ELA és una malaltia de causa desconeguda, tot i que de forma similar a altres malalties neurodegeneratives, es creu que està causada per una combinació de factors genètics, factors ambientals i una disfunció relacionada amb l'envelliment, tots ells, importants en la neurodegeneració. L'heretabilitat de la malaltia és alta, s'estima que és del 30-60% i el risc de desenvolupar-la es duplica en familiars de primer grau (Al-Chalabi et al., 2010; Bozzoni et al., 2016).

D'entre els factors ambientals es troben: la regió geogràfica, el tabac, l'ocupació laboral, els metalls, l'exercici físic i químics en l'agricultura (Oskarsson et al., 2015). Es coneix que la prevalença de la malaltia difereix segons la regió geogràfica, sent menor en els països menys desenvolupats, probablement per diagnòstics menys complets i perquè l'exposició a toxines ambientals és més alta que en els països desenvolupats (K. R. Smith et al., 1999). Pel que fa al tabac, s'ha observat gràcies a diferents estudis que augmenta el risc d'ELA, tot i que encara es desconeix si és degut a la nicotina, per l'estrès oxidatiu o per alguna altra substància tòxica (de Jong et al., 2012). Per altra banda, moltes ocupacions consisteixen en activitats altament físiques amb alt risc de trauma i poden predisposar a desenvolupar ELA. Així doncs s'ha confirmat que el servei militar d'Estats Units és un factor de risc per l'ELA, on hi ha un gran esforç físic, falta de son, trauma, estrès psicològic i exposició a plom (Beard & Kamel, 2015). Tot i així, els exèrcits militars d'altres països no han suggerit una associació positiva amb l'ELA i els seus respectius exèrcits (Drouet et al., 2010). Molts metalls, entre ells el plom, són neurotòxics i poden causar neuropaties amb una forta afectació dels nervis motors. Diversos estudis han trobat una connexió entre el plom i l'ELA tot i que falta encara més evidència (M.-D. Wang et al., 2014), així com també amb d'altres metalls menys estudiats com el mercuri i el seleni (Oskarsson et al., 2015). Per altra banda, l'exercici físic s'han correlacionat positivament amb la incidència de l'ELA en molts estudis (Hamidou et



al., 2014). Es desconeix com l'exercici físic podria causar ELA però podria ser degut a un augment de l'estrès oxidatiu i la potenciació de les toxines ambientals (Longstreth et al., 1991; P. Mattsson et al., 2012).

Per últim, molts pesticides i herbicides són neuro tòxics i tenen un efecte directe en la sinapsis de la MNI (G. Singh & Khurana, 2009). Així doncs, els agricultors poden tenir una major incidència d'ELA (Malek et al., 2012).

En el 90% dels casos l'ELA és esporàdica i aparentment no heretable, per contra, la forma familiar solament representa un 10% dels casos i és una malaltia heretable amb un patró autosòmic dominant amb mutacions en més de 20 gens descrits que s'han associat amb la malaltia. Gràcies a l'estudi dels principals gens implicats en la forma familiar, s'ha pogut conèixer millor aquesta malaltia (Bozzoni et al., 2016).

Les quatre causes genètiques més comunes són: l'expansió d'hexanucleòtids en el marc de lectura obert del cromosoma 9 (C9orf72), mutacions en la SOD1, mutacions en *TAR DNA-binding protein 43* (TDP-43) i mutacions en *fused in sarcoma* (FUS). El conjunt de totes elles comprenen fins al 15% de tots els pacients (Brown & Al-Chalabi, 2017; Hardiman et al., 2017). La Figura 1 mostra les mutacions més freqüents en els gens vinculats amb l'ELA en la població europea i asiàtica.

Una de les característiques patològiques de l'ELA és l'agregació de proteïnes ubiquitinitzades a les motoneurons (Stieber et al., 2000). La majoria de les proteïnes mutades conegudes que causen l'ELA s'han trobat com a part d'aquests agregats, entre elles SOD1, FUS i TDP-43. Les mutacions en aquestes proteïnes alteren la seva conformació normal generant inestabilitat tant en l'ELAE com en l'ELAF. Per tant, hi ha una relació entre la inestabilitat proteica, els agregats proteics i la malaltia (Richards, 2001).

Diversos estudis han identificat també anormalitats en el metabolisme de l'àcid ribonucleic (ARN), disfuncions mitocondrials, estrès oxidatiu i neuroinflamació, suggerint doncs que l'ELA és una malaltia multifactorial (K. Yamanaka & Komine, 2018).



**Figura 1.** Mutacions més freqüents en els gens vinculats amb l'ELA en població europea i asiàtica. (Zou et al., 2017).

### 1.5.1. ELA i mutacions en C9orf72

En la forma familiar la principal mutació associada és la repetició d'hexanucleòtids GGGGCC en C9orf72, descobert al 2011 que correspon a un 30% dels casos d'ELAf (Rohrer et al., 2015).

El gen C9orf72 està ubicat al braç curt del cromosoma 9 i es transcriu en tres *transcripts* principals (V1, V2 i V3), que produeixen les dos isoformes de la proteïna (C9orf72-S i C9orf72-L). La mutació repetida de l'hexanucleòtid GGGGCC es troba al intró 1 entre els exons 1a i 1b. En una persona sana, l'expansió de GGGGCC pot oscil·lar entre 2 i 30 repeticions, però en pacients amb ELA associada a C9orf72, oscil·la entre cent i milers de repeticions (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Donat que aquestes expansions es troben tant en persones sanes com en pacients d'ELA, encara no està clar el número mínim d'expansions de GGGGCC per considerar-se patològic (Gami et al., 2015).

### 1.5.1.1. Patogènesi de C9orf72

La fisiopatologia de l'ELA causada per C9orf72 s'associa a tres mecanismes diferents:

- Mecanisme de pèrdua de funció: disminució de la transcripció de la regió codificant de C9orf72 que porta a una reducció de la producció de la proteïna total C9orf72, també conegut com haploinsuficiència C9orf72 (Belzil et al., 2013; DeJesus-Hernandez et al., 2011; Donnelly et al., 2013). En un estudi amb pacients portadors de l'expansió C9orf72, es va observar una disminució de V1 i V2 (especialment la V2) al còrtex frontal i el cerebel comparat amb el grup control (van Blitterswijk et al., 2015). A més a més, s'ha demostrat que la pèrdua de C9orf72 en *Caenorhabditis elegans* i en el peix zebra provoca la degeneració de les motoneurons (Sellier et al., 2016; Therrien et al., 2013).

En conjunt, totes aquestes hipòtesis demostren que la haploinsuficiència de la proteïna C9orf72 pot ser la base de la malaltia causada per C9orf72. Tot i així, les conseqüències de la reducció dels nivells de la proteïna no es comprenen a la perfecció, de fet, es sap molt poc sobre la proteïna C9orf72 i la seva funció. A nivell molecular, la principal característica estructural que es coneix és un domini DENN que és un factor d'intercanvi GDP/GTP (GEF) que activa les Rab-GTPases (Levine et al., 2013). Investigacions posteriors han trobat que la isoforma C9orf72-L conté els dominis DENN-alpha, mentre que la isoforma C9orf72-S sol conté el domini longin (S. Xiao et al., 2016). Sol la isoforma C9orf72-L pot interactuar amb una altra proteïna que contingui el domini DENN, com SMCR8 o WD41 per tal de formar un complex proteic, que juga un paper molt important en la regulació de la via autofàgia-lisosoma (Amick et al., 2016; Sullivan et al., 2016; S. Xiao et al., 2016). La ubiquïtina i els cossos d'inclusió positiu per p62 (proteïna d'autofàgia), es troben en alguns casos d'ELA, confirmant doncs que el sistema autofagosoma-lisosoma podria estar danyat. Per altra banda, la isoforma C9orf72-S es troba a la membrana nuclear de les neurones sanes i pot interactuar directament amb la importina- $\beta$ 1 o Ran-GTPases (S. Xiao et al., 2015). Per tant, es prediu que C9orf72-S pot actuar com a proteïna de transport nuclear. C9orf72-L doncs, està involucrada en la via autofàgia-lisosoma mentre que C9orf72-S està involucrada en el transport nucleocitoplasmàtic (Q. Yang et al., 2020).

Els ratolins comparteixen un nivell de similitud del 91.89% de nucleòtids i un 98.75% d'aminoàcids amb les regions codificants de l'ortòleg C9orf72 humà (S. Xiao et al., 2016). En una sèrie de models de ratolins amb pèrdua de funció, la inactivació de C9orf72 va tenir poca associació amb la neurodegeneració, i en canvi, va tenir una forta relació amb la linfoadenopatia i esplenomegàlia (Burberry et al., 2016; J. Jiang et al., 2016; O'Rourke et al., 2016). Cap de les inactivacions de C9orf72 en el ratolí va mostrar un fenotip semblant a l'ELA, indicant doncs que l'eliminació de C9orf72 per si sola no és suficient per induir aquesta malaltia. En les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC) derivades de pacients amb ELA, la haploinsuficiència de C9orf72 pot augmentar els receptors de glutamat a la superfície d'aquestes motoneurons, provocant excitotoxicitat i una eliminació deficient de la repetició de dipèptids (DPR) el quals són tòxics i en última instància, la neurodegeneració (Y. Shi et al., 2018).

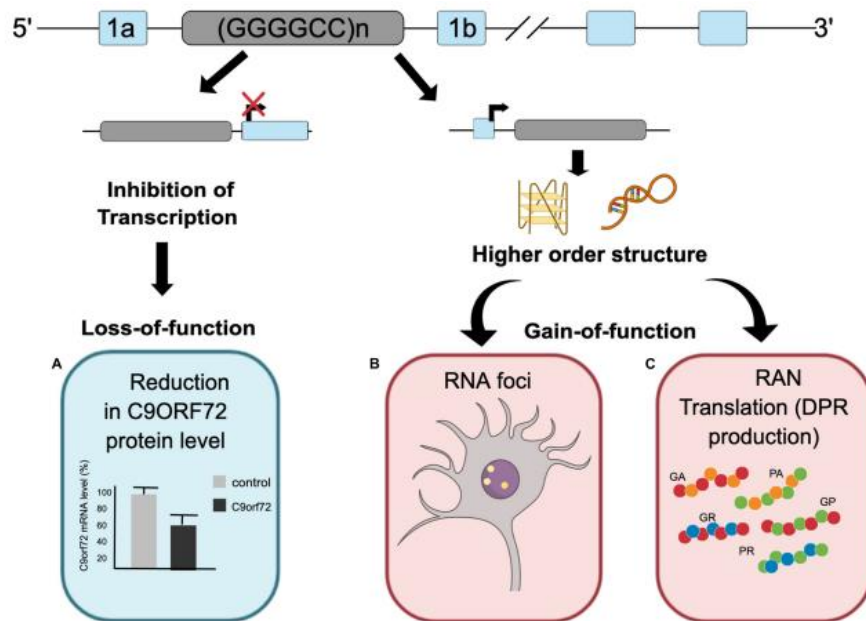
- Mecanisme de guany de funció: sorgeix a través de l'acumulació en el còrtex frontal i en la medul·la espinal d'ARN sentit i antisentit (GGGGCC)<sub>n</sub>. Aquest es plega adoptant unes estructures secundàries (quàdruplexs G4) les quals són molt estables i poden segrestar o alterar la funció de les proteïnes d'unió a l'ARN (RBP) i altres proteïnes. Diferents estudis patològics en l'ELA han trobat que els focus d'ARN sentit i antisentit, estan àmpliament distribuïts per tot el sistema nerviós central (SNC), aportant evidències sobre la participació de mecanismes de guany de funció (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Gendron et al., 2013; Zu et al., 2013).

- Traducció no iniciada per AUG (RAN): l'ARN sentit i antisentit (GGGGCC)<sub>n</sub> produeix cinc proteïnes repetides de DPR. Segons la combinació d'aquests mecanismes, pot tenir major o menor influència en la malaltia (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Gràcies als estudis neuropatològics humans s'ha pogut observar inclusions positives per p62 i negatives per TDP-43 en famílies d'ELA associat a C9orf72 (Boxer et al., 2011). Després d'identificar aquestes característiques patogèniques, els investigadors van demostrar que les inclusions eren subproductes de la traducció RAN (Ash et al., 2013; Josephs et al., 2011). Els ARN sentit o antisentit (GGGGCC)<sub>n</sub> es tradueixen per traducció iniciada per RAN per produir els DPR tòxics: poli-GA, poli-GR (de la cadena sentit) i poli-PA, poli-GP i poli-PE (de la cadena antisentit) (DeJesus-Hernandez et al., 2011; K. Mori et al., 2013). Diferents estudis realitzats en ulls de mosca mostren que els DPR que contenen arginina (poli-GR i poli-PR) són tòxics ja

que causaven la degeneració cel·lular i la mort (Mizielinska et al., 2014). En un model ratolí, aquells que expressaven poli-PR i poli-GR presentaven neurodegeneració i dèficits de comportament que es van anar agreujant gradualment en el temps, suggerint que la neurodegeneració depèn de l'edat. Els ratolins que moren prematurament tenen nivells de poli-PR més alts que els ratolins supervivents. Per tant, els DPR que contenen arginina són tòxics i l'augment de l'expressió d'aquests agreujarà la toxicitat (Y.-J. Zhang et al., 2018, 2019).

Tot i així, les vies cel·lulars a través de les quals funcionen els DPR que contenen arginina són en gran part desconegudes. S'ha demostrat que el DPR rics en arginina interrompen el transport nucleocitoplasmàtic, causen estrès nucleolar i indueixen l'assemblatge de grànuls d'estrès (GS) (Boeynaems et al., 2017; Freibaum et al., 2015; Mizielinska et al., 2017). Sota situacions d'estrès, les cèl·lules inhibeixen la traducció de l'ARN missatger (ARNm), formant GS sense membrana al citoplasma. Investigacions posteriors han trobat que molts factors de transport nucleocitoplasmàtic es recluten als GS i poden interrompre el transport (K. Zhang et al., 2018). En conseqüència, el poli-PR indueix l'expressió d'elements repetitius i l'acumulació d'ARN de doble cadena, que contribueix a la neurodegeneració (Y.-J. Zhang et al., 2019).

Aquesta diversitat en els diferents mecanismes que hi poden estar implicats ajudarien també a explicar l'heterogeneïtat clínica, patològica i pronòstica que es poden observar en els pacients d'ELA (Balendra & Isaacs, 2018). La Figura 2 mostra de forma esquemàtica els mecanismes associats a la malaltia per C9orf72.



**Figura 2. Mecanismes associats a la malaltia per C9orf72.** L'expansió repetida de G4C2 pot causar ELA a través dels tres mecanismes proposats. **(A)** Reducció en els nivells de proteïna C9orf72. **(B)** Formació de focus d'ARN que donen lloc al reclutament d'altres RBP. **(C)** Acumulació de DPR tòxics generats a través de la traducció RAN (Schmitz et al., 2021).

### 1.5.2. ELA i mutacions en TDP-43

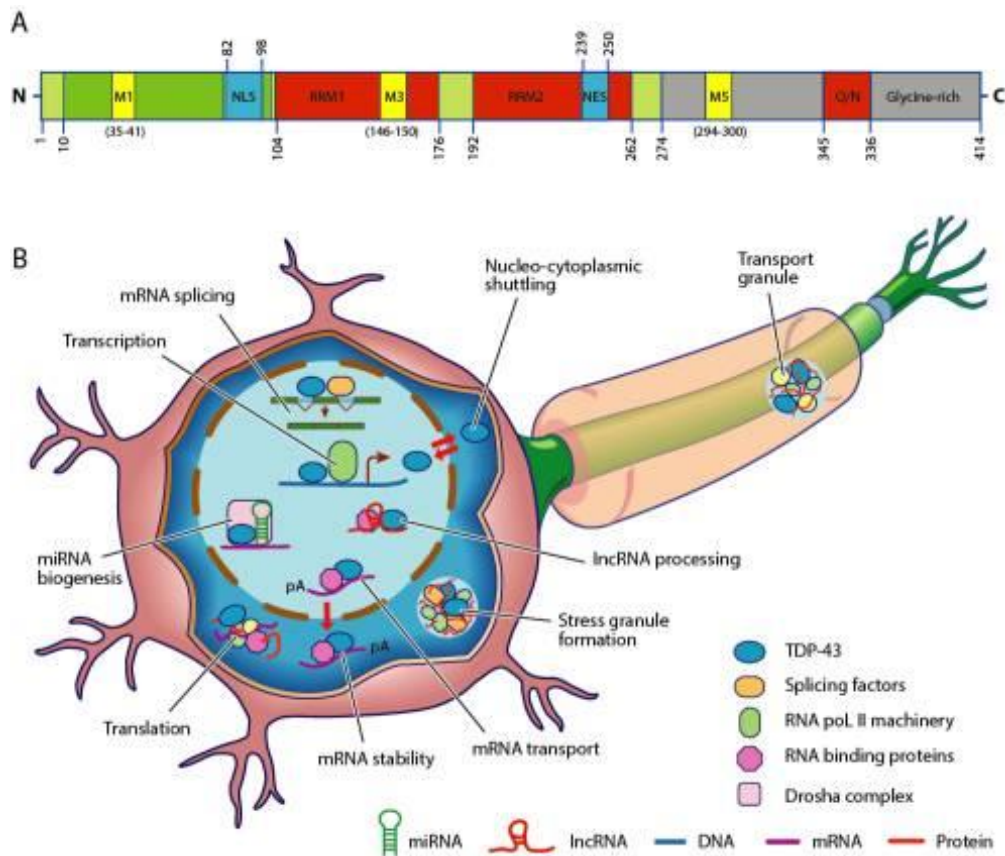
TDP-43, inicialment identificada al 1995 com un supressor de l'expressió del gen del VIH-1, és una proteïna d'unió a ARN/ADN altament conservada i expressada que pertany al grup nuclear de la família de ribonucleoproteïnes. TDP-43 conté 414 aminoàcids i està codificat pel gen TARDBP, que es troba al cromosoma 1. L'estructura de la proteïna està composta per: una regió N-terminal, una senyal de localització nuclear (NLS), dos motius de reconeixement de l'ARN (RRM1 i RRM2), senyal d'exportació nuclear (NES), una regió C-terminal amb un domini ric en glutamina/asparagina (Q/N) i una regió rica en glicines. A la Figura 3 es mostra un esquema de la proteïna amb les seves funcions.

En les cèl·lules sanes, TDP-43 es troba principalment al nucli, mentre que en els pacients amb ELA, quasi totes les neurones presenten inclusions en el citoplasma disminuint el TDP-43 nuclear (Davidson et al., 2016; MacKenzie et al., 2013). TDP-43 es pot transportar entre el nucli i el citoplasma, però en condicions fisiològiques normals, la localització és predominantment nuclear (Pinarbasi et al., 2018). A més a més, TDP-43 es localitza als

mitocondris on s'associa amb el genoma mitocondrial i és important a les vies de la cadena respiratòria (W. Wang et al., 2016).

És fonamental en múltiples funcions cel·lulars, incloent la regulació del metabolisme de l'ARN, el transport de l'ARNm, la maduració del microARN i la formació de GS (Prasad et al., 2019). Posant en rellevància la funció cerebral, TDP-43 pot jugar un paper molt important pel desenvolupament normal de les cèl·lules neuronals durant les primeres etapes de l'embriogènesi. Donat l'ampli espectre de funcions que té TDP-43 en els processos cel·lulars, en particular en desenvolupament del SNC, no sorprèn que la disfunció de les vies relacionades amb aquest gen s'hagi reconegut cada vegada més en les malalties neurodegeneratives (Sephton et al., 2010). Ratolins *knock-out* (absència de funcionalitat) per aquesta proteïna són letals, evidenciant un paper rellevant en el desenvolupament (Ratti & Buratti, 2016).

Al 2006, les inclusions citoplasmàtiques de TDP-43 hiperfosforilades i ubiquitinitzades es van identificar com una característica patològica de l'ELA (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Mutacions amb canvi de sentit en el gen TARDBP, es van identificar com mutacions genètiques causals, tot i que un petit percentatge corresponen a casos familiars. Curiosament, la gran majoria dels pacients no presenten mutacions al gen però mostren anormalitats generalitzades que involucren a TDP-43. L'heterogeneïtat fisiopatològica dels fenotips de l'ELA pot suggerir que múltiples vies patogèniques contribueixen a la mala localització i agregació citoplasmàtica de TDP-43. Durant els últims anys, els agregats de TDP-43 s'han associat amb un nombre cada vegada major de malalties neurodegeneratives, donant lloc a que aquests trastorns es denominin també proteinopaties per TDP-43 (Gao et al., 2018).



**Figura 3. Estructura de la proteïna TDP-43.** (A) Conté 414 aminoàcids i està formada per una regió N-terminal amb una senyal de localització nuclear. A més, consta d'una senyal NES i un domini C-terminal amb regions riques en glutamina i asparagina (Q/N) i en glicina. Les mutacions patològiques es localitzen predominantment dins de les regions C-terminal. (B) La proteïna és fonamental en la regulació del metabolisme de l'ARN. En el nucli, TDP-43 és important per la transcripció i unió de l'ARNm, així com per mantenir l'estabilitat de l'ARN i el transport cap al nucli. Tot i que es troba dins el nucli, TDP-43 es desplaça entre el nucli i el citoplasma. En el citoplasma, TDP-43 participa en l'estabilitat de l'ARNm (E. M. J. de Boer et al., 2020).

El domini N-terminal és important en la formació d'homodímers funcionals, que són crítics per la funció fisiològica adequada de TDP-43. Dins de la regió N-terminal es troba el domini NLS que regula la importació de TDP-43 al nucli per tal d'exercir les seves funcions fisiològiques (Prasad et al., 2019). Els motius RRM1 i RRM2 són essencials per la unió de la proteïna TDP-43 a les molècules d'ARN i ADN, regulant així la transcripció, traducció, unió i estabilitat de l'ARNm (Lunde et al., 2007). A més, TDP-43 forma grànuls de ribonucleoproteïna (RNP) que són importants pel transport de molècules d'ARNm i per promoure la biogènesis d'ARN no codificants, com microARN (Alami et al., 2014; Kawahara & Mieda-Sato, 2012).



Per una altra part, la regió rica en glicines de C-terminal s'ha implicat en la patogènesi de TDP-43 ja que aquesta regió regula la solubilitat de les proteïnes i la seva agregació patològica (Harrison & Shorter, 2017). TDP-43, tal i com s'ha comentat anteriorment, també és important per la formació de GS, protegint les cèl·lules neuronals d'agressions cel·lulars com l'estrès oxidatiu (Aulas & Vande Velde, 2015).

Donat que, aquesta proteïna exerceix funcions molt importants en les cèl·lules neuronals, mutacions i disfuncions en TDP-43 condueixen a malalties neurològiques greus (de Boer et al., 2020).

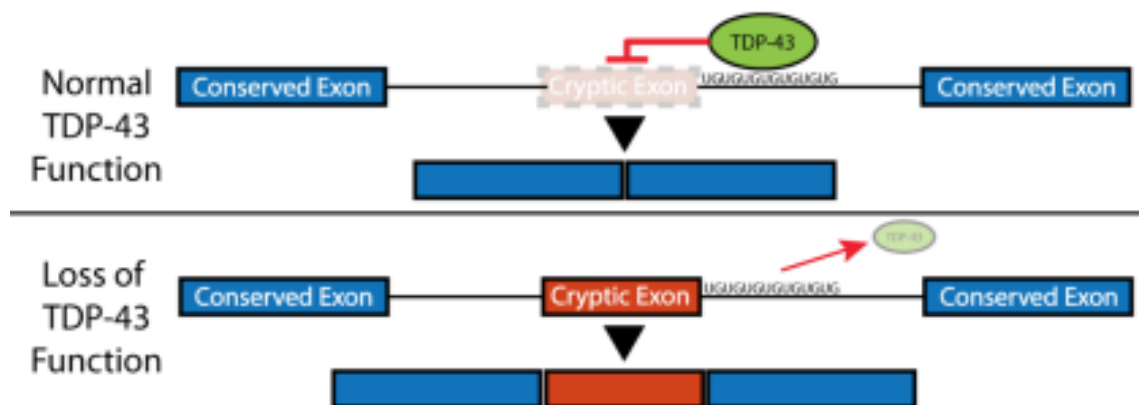
### **1.5.2.1. Patogènesi de TDP-43**

Els mecanismes fisiopatològics pels quals TDP-43 causa neurodegeneració encara no es coneixen amb exactitud. L'evidència que es té fins al moment suggereix que la disfunció biològica en múltiples processos cel·lulars pot contribuir a la mort neuronal (Prasad et al., 2019). L'observació de les característiques histopatològiques de les proteinopaties TDP-43, ha portat a suggerir dos mecanismes patològics no mútuament excloents, la pèrdua de funció nuclear i el guany de funció citoplasmàtica. Estudis en models animals revelen que la sobreexpressió de TDP-43 està associada amb la neurotoxicitat, mentre que eliminar el gen TARDBP és letal en etapes embrionàries (Y.-F. Xu et al., 2010).

- Mutacions al gen TARDBP: s'han reportat més de 50 mutacions en el gen de TDP-43 tant en casos esporàdics com en casos familiars de l'ELA. La majoria d'aquestes mutacions es troben en les regions riques en glicina del C-terminal que augmenta la propensió a l'agregació i citotoxicitat de la proteïna i per tant, condueix a un guany de funció tòxic (Chiò et al., 2020). Les mutacions a la regió central del gen, fan que la proteïna TDP-43 sigui vulnerable a la formació de fibril·les de tipus amiloide, que són característiques de les inclusions presents en l'ELA, generant així també toxicitat neuronal (Neumann et al., 2006). A més a més, mutacions en el gen poden induir la mala localització citoplasmàtica de TDP-43 conduint a una major toxicitat neuronal. La proteïna també està intrínsecament associada amb la formació de GS i per tant, mutacions en ella donen lloc a GS més grans amb una distribució i mobilitat reduïda alterant l'homeòstasi de l'ARN i generant encara més disfunció neuronal (Prasad et al., 2019).

- Depleció nuclear de TDP-43: una característica patològica destacada en totes les proteinopaties de TDP-43 és la depleció nuclear de la proteïna, que s'observa sobretot a les etapes finals del procés de la malaltia (Prasad et al., 2019). A mesura que TDP-43 es desplaça entre el nucli i el citoplasma, realitza diverses funcions dins d'ambdós compartiments. En el nucli, TDP-43 regula molts processos del metabolisme de l'ARN, incloent la unió de l'ARNm i per tant, una pèrdua nuclear de TDP-43 condueix a la degradació i reducció dels ARN així com també processos d'unió d'ARN alterats. Per tant, és probable que la desregulació transcripcional i els defectes en els processos d'unió contribueixin a la disfunció neuronal en les proteinopaties (Polymenidou et al., 2011; Tollervey et al., 2011).
- Transport nuclear alterat: NLS i NES regulen el transport entre el nucli i el citoplasma de la proteïna, i per tant, l'eliminació d'aquests segments condueix a l'esgotament de la reserva nuclear de TDP-43, afectant a la regulació de l'assemblatge de la cromatina i el processament d'histones, procés que dona lloc a una agregació nuclear (Prasad et al., 2019). Curiosament, les mutacions a la regió NLS s'han reportat amb poca freqüència en els pacients d'ELA, tot i que les mutacions en la regió C-terminal també poden impulsar la localització citoplasmàtica (Neumann et al., 2006).
- Disfunció mitocondrial: la disfunció mitocondrial també és un mecanisme important en la toxicitat de TDP-43 (L.-L. Jiang et al., 2016). Específicament, la sobreexpressió de TDP-43 patogen a les motoneurons condueix a una reducció de la longitud mitocondrial, al deteriorament del moviment, de la distribució i la dinàmica mitocondrial, així com també en la fissió i la fragmentació (Neumann et al., 2006). A més, s'ha demostrat que la disfunció mitocondrial potencia la toxicitat de TDP-43, que a la seva vegada, amplifica el grau d'estrès oxidatiu. La interacció entre l'agregació de TDP-43 i l'estrès oxidatiu sembla ser que amplifica la toxicitat cel·lular de TDP-43 així com els efectes nocius de TDP-43 en la funció mitocondrial (Prasad et al., 2019).
- Desregulació del metabolisme de l'ARN: TDP-43 s'uneix a les molècules de pre-ARN missatger tant aviat surten de l'ARN polimerasa II (Ratti & Buratti, 2016), regulant l'*splicing* alternatiu d'exons en regions riques en el dinucleòtid UG el qual TDP-43 hi té una alta afinitat. Recentment, s'ha descrit que la major part de TDP-43 que regula l'*splicing* de les regions riques en UG correspon a exons no conservats evolutivament (exons críptics). Els

exons críptics estan considerats variants d'*splicing* que introdueixen *frameshifts* o codons de *stop* a l'ARNm resultant, generant doncs un ARNm anormal (Torres et al., 2018). TDP-43 actua com a repressor, evitant així la transcripció d'aquests exons críptics. A la Figura 4 es mostra la representació del mecanisme de repressió de la transcripció dels exons críptics per part de TDP-43. Per tant, la pèrdua de funció de TDP-43 comporta la transcripció dels exons (Onozato et al., 2016). Un dels exons críptics on està involucrat TDP-43 és el gen *autophagy related 4B cysteine peptidase* (ATG4B). Aquests ARNm anormals, s'han demostrat que es troben a l'escorça motora dels pacients amb ELA (Torres et al., 2018).



**Figura 4. Mecanisme de TDP-43 de repressió de la transcripció dels exons críptics en el seu estat normal.** Quan hi ha pèrdua de funció no pot actuar com a repressor, induint la transcripció d'aquests (Ling et al., 2015).

Tant la patologia causada per C9orf72 com la causada per TDP-43 no són necessàriament excloents ja que la pèrdua de C9orf72, la formació de focus d'ARN o l'acumulació de DPR podrien promoure la mala localització citoplasmàtica de TDP-43. L'acumulació citoplasmàtica de TDP-43 agreuja els defectes del transport nucleocitoplasmàtic en un cicle de retroalimentació positiva i al mateix temps, augmenta els nivells de DPR, el qual genera un cercle repetitiu. Per tant, la patologia de TDP-43 i el transport nucleocitoplasmàtic sembla ser un punt clau tant en el mecanisme tant de guany com de pèrdua de funció de C9orf72 (Q. Yang et al., 2020).

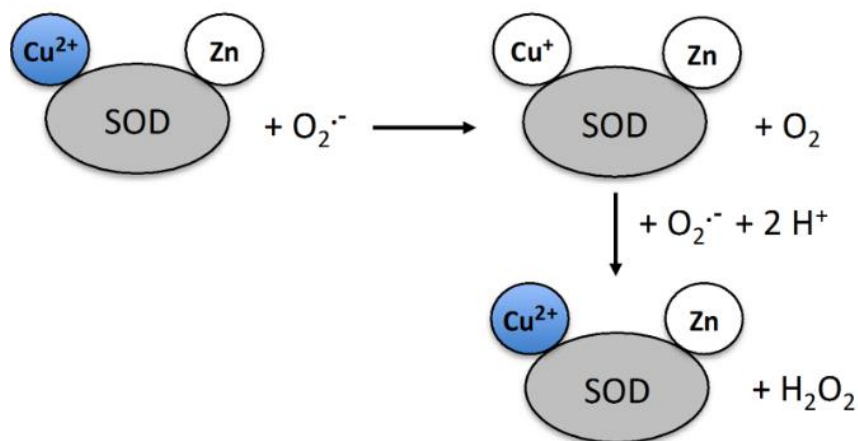
### 1.5.3. ELA i mutacions en SOD1

Les mutacions en el gen de la superòxid dismutasa 1 van ser descobertes al 1993 i engloben un 20% dels casos d'ELA familiar.

Els humans expressen tres formes diferents del gen SOD, anomenats SOD1-3. SOD1 es troba majoritàriament al citoplasma, SOD2 al mitocondri i SOD3 es troba extracel·lular (J. H. Park et al., 2019).

La SOD1 humana és una metal·loproteïna homodimèrica de 32kDa que consta de 153 aminoàcids i amb les dues subunitats unides de forma no covalent (Doucette et al., 2004). SOD1 es distribueix principalment en el citoplasma, tot i així, també s'ha trobat al nucli, lisosomes i mitocondris (Zelko et al., 2002).

La seva funció principal és catalitzar els radicals lliures de superòxid ( $O_2^{\bullet-}$ ) a oxigen molecular ( $O_2$ ) junt amb el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) menys reactiu, eliminant així els radicals lliures causants de l'estrès oxidatiu (McCord & Fridovich, 1969). A la Figura 5 es mostra la funció de SOD1.



**Figura 5. Esquema de la funció de la proteïna SOD1.** És responsable de convertir l'anió superòxid tòxic ( $O_2^{\bullet-}$ ) a oxigen i peròxid d'hidrogen (Franco et al., 2013).

SOD1 doncs, té un paper antioxidant molt important protegint la cèl·lula d'espècies reactives d'oxigen (ROS), les quals són tòxiques per l'organisme. És un enzim que es troba altament conservat al llarg de l'evolució (J. Wang et al., 2006) i representa entre 1 i 2% de la proteïna soluble total en el SNC (Pardo et al., 1995).

L'augment de l'agregació, la desestabilització del dímer o l'oligomerització són tots mecanismes que s'han proposat per la toxicitat del SOD1 mutant, i cada un d'ells podria no ser mútuament exclouent (Pansarasa, Bordoni, Diamanti, et al., 2018). Una de les marques més conegudes de la malaltia és la deposició d'agregats de SOD1 insolubles en les motoneurons, probablement degut a la desestabilització estructural i/o dany oxidatiu induït per mutacions genètiques que a la vegada contribueixen al mal plegament i a l'agregació de SOD1 (McAlary et al., 2016).

Les mutacions en aquest gen van ser les primeres que es van descriure com a causants de l'ELA, fa més de 20 anys (Bunton-Stasyshyn et al., 2015). Fins a dia d'avui, s'han reportat mutacions fins a 154 aminoàcids de la SOD1 i més de 180 mutacions diferents, incloent mutacions puntuals, delecions, insercions i mutacions de truncament en els cinc exons del gen, indicant doncs, que els efectes tòxics de SOD1 són el resultat de diverses afectacions en la proteïna. Diferents evidències científiques conclouen que són les mutacions amb guany de funció les causants de la malaltia tot i que també mutacions amb pèrdua de funció tindrien un paper secundari, almenys en alguns casos d'ELA (Saccon et al., 2013).

Les mutacions més comunes són: D90A, A4V i la G93A. La D90A (àcid aspàrtic al codó 90 canviat per alanina) és la mutació més comuna i es pot heretar tant de forma dominant com de forma recessiva, sent aquesta última la més prevalent (PM, 2006). La A4V (alanina al codó 4 canviada a valina) és la mutació causant d'ELA més comuna (aproximadament el 50% dels casos) en la població dels Estats Units. La G93A (glicina canviada a alanina) és de fet una de les mutacions més estranyes, tot i així, ha estat molt investigada ja que va ser la primera mutació estudiada en un model ratolí transgènic capaç de simular la malaltia (Valentine & Hart, 2003).

Gràcies a l'evidència d'una espècie de WT-SOD1 la qual ha estat modificada de forma endògena en extractes de medul·la espinal de pacients amb ELAe, un grup d'investigadors van suggerir per primera vegada la hipòtesi de la participació d'aquesta proteïna en la patogènia de la malaltia. Altres autors també van demostrar que WT-SOD1 a partir de l'oxidació pot adquirir moltes de les propietats tòxiques lligades a l'ELA (Ezzi et al., 2007). També es va demostrar la presència de SOD1 mal plegada, en forma de petits agregats als

nuclis de les cèl·lules gials (principalment astròcits) de la medul·la espinal de pacients amb ELA (Forsberg et al., 2011).

### **1.5.3.1. Tractament dirigit a SOD1**

Degut a la falta de tractament per aquesta malaltia, la possibilitat de la teràpia gènica ha estat de gran interès. Per aquest motiu, SOD1 és un bon objectiu per la teràpia ja que a més és una de les principals característiques patològiques de la pròpia malaltia. La teràpia gènica fa referència a la transferència d'un gen terapèutic a un teixit objectiu per tal de preservar la funció del gen durant un temps adequat (Pansarasa, Bordoni, Diamanti, et al., 2018).

L'ús d'ASO tenen un gran potencial per aquesta malaltia. Els ASO són àcids nucleics curts sintètics que s'uneixen a l'ARN i funcionen ja sigui dirigint a l'ARN per la seva degradació o prevenint la traducció d'algun ARN específic (Rossor et al., 2018). Aquesta idea, aplicada als trastorns neurodegeneratius, va ser proposada per primera vegada al 2006, però el primer assaig basat en SOD1-ASO no va ser fins al 2013 (R. A. Smith et al., 2006).

Tal i com s'ha explicat anteriorment, en l'ELA es produeixen agregats de SOD1 mutada i per aquest motiu, una de les estratègies terapèutiques és l'eliminació d'aquesta. Els estudis més pioners amb SOD1-ASO en rates i primats no humans van demostrar una àmplia distribució de l'ASO en el SNC, una eliminació efectiva de SOD1 i l'extensió de la supervivència (R. A. Smith et al., 2006). Al gener de 2012 es va completar el primer assaig clínic de fase I en humans. L'estudi va utilitzar dosis baixes d'ASO, no es van modificar els nivells de SOD1 però van poder establir que l'enfocament del tractament era segur (T. M. Miller et al., 2013). Així doncs, després de demostrar la bona distribució de l'ASO per tot el SNC i el LCR i de comprovar que el tractament era segur en humans, s'han anat desenvolupant diferents ASO més potents per tal de perllongar la supervivència en models de rata. Tots aquests estudis estableixen una nova teràpia pel tractament de l'ELA causada per SOD1 (McCampbell et al., 2018), tot i que actualment, es troba encara sota investigació clínic, concretament l'ASO Tofersen, tal i com s'ha comentat anteriorment.

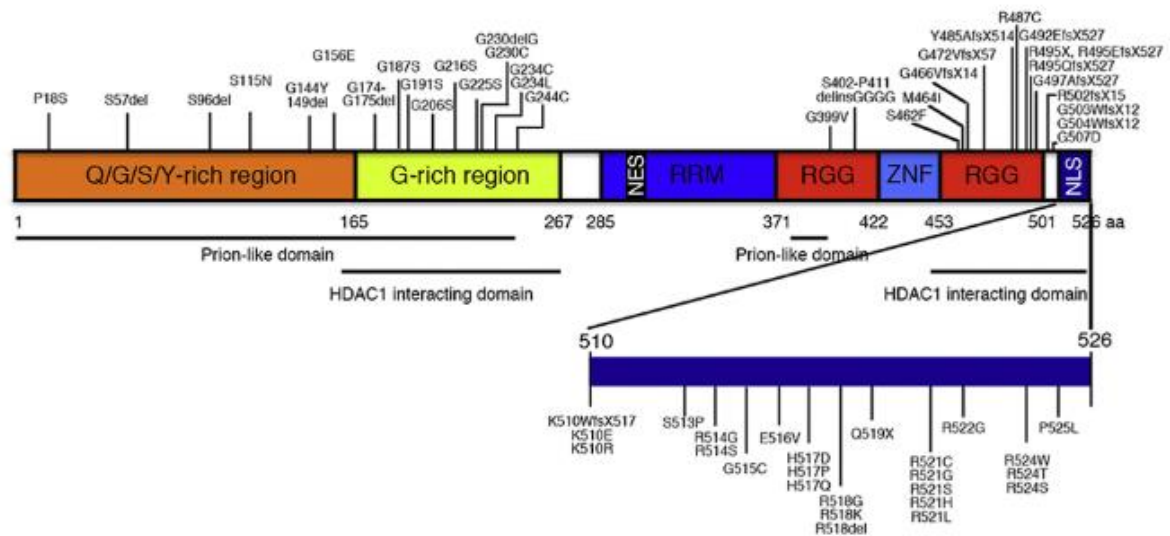
#### 1.5.4. ELA i mutacions en FUS

Recentment s'han descobert mutacions en el gen FUS, representant fins al 5% dels casos d'ELAf i solament entre 0.7-1.8% dels casos esporàdics de la malaltia (Andersen & Al-Chalabi, 2011). En la majoria de les famílies, els pacients són heterozigots per les mutacions de FUS amb un patró d'herència autosòmic dominant. S'han relacionat més de 50 mutacions, la majoria d'elles tenen lloc als exons 6, 14 i 15 (C. Chen et al., 2019).

Les mutacions en FUS representen el 35% de ELAf en pacients menors de 40 anys, mentre que per exemple les mutacions en C9orf72 són més comuns en pacients majors de 50 anys (Millecamps et al., 2012). Un metanàlisis de 154 casos d'ELA amb mutacions de FUS mostren un inici mitjà de la malaltia als 43.8 anys (Deng et al., 2014; Lattante et al., 2013). Més del 60% dels casos amb mutacions de FUS mostren un inici de la malaltia abans dels 45 anys, amb molts casos d'ELA juvenil que es presenten amb l'inici de la malaltia a finals de l'adolescència o principis dels 20 anys (Bäumer et al., 2010; E. J. Huang et al., 2010). Aquesta característica distintiva de FUS planteja la hipòtesis de que les mutacions en FUS poden afectar al desenvolupament, manteniment i homeòstasi del SNC durant les primeres etapes de la vida postnatal i en el procés d'envelliment (Shang & Huang, 2016).

FUS s'expressa en axons, dendrites i espines de les neurones on, mitjançant el transport de l'ARNm, regula la morfologia de l'hipocamp, de les espines dendrítiques, estabilitza l'estructura de les sinapsis (Fujii et al., 2005) i participa en el manteniment i plasticitat d'aquestes neurones (Lagier-Tourenne & Cleveland, 2009).

FUS codifica per una proteïna d'unió a ARN formada per 526 aminoàcids. Es localitza principalment al nucli i consta de 7 dominis: un ric en QGSY, un ric en glicines, motiu de reconeixement d'ARN (RRM), Arg-Gly-Gly1 (RGG1), dit de zinc, RRG2 i un senyal NLS (Da Cruz & Cleveland, 2011). A la Figura 6 es mostra el gen FUS amb les mutacions identificades.



**Figura 6. Diagrama de l'organització genòmica del gen FUS amb les mutacions identificades en l'ELA.**

El gen FUS humà consta de 15 exons, ubicat al cromosoma 16. La proteïna FUS humana conté 526 aminoàcids i 7 dominis diferents (Shang & Huang, 2016).

La majoria de les mutacions que causen la malaltia es localitzen a la regió C-terminal, interrompent el senyal NLS i donen com a resultat una localització citoplasmàtica anormal de FUS. S'ha plantejat la hipòtesi de que la mala localització de FUS afecta a la seva funció nuclear i promou el guany de funció en el citoplasma de les neurones afectades (Hoell et al., 2011; Orozco et al., 2012; H. Qiu et al., 2014). R495X, una mutació de FUS, provoca la pèrdua completa del NLS i mostra un fenotip de malaltia greu. Diferents estudis han observat que R495X té un perfil d'unió de gens alterats que condueix a la neurotoxicitat i per tant a la mort neuronal (Bosco et al., 2010; Waibel et al., 2010) i a més a més, provoca la reducció de la mida dels mitocondris (Nakaya & Maragkakis, 2018).

Prèviament es va descobrir el perfil d'unió de l'ARN de FUS en tot el genoma i es va observar que s'unia preferentment als introns conservats evolutivament d'altres molècules d'unió a l'ARN alterant la seva expressió (Nakaya et al., 2013). De manera similar, altres investigacions han demostrat que FUS controla el procés d'unió de l'ARNm dels seus gens diana (Hoell et al., 2011; Ishigaki et al., 2012; Rogelj et al., 2012). Tot i així, aquests estudis solament han identificat efectes fenotípics menors, tot i després d'eliminar FUS, plantejant doncs la possibilitat de que el fenotip de la malaltia sigui el resultat d'un guany de funció en lloc d'una pèrdua de funció. La sobreexpressió de FUS salvatge en ratolins, rates i també en mosca dona lloc a neurotoxicitat (Y. Chen et al., 2011; Mitchell et al., 2013), mentre que el



FUS mutant provoca la degeneració de les motoneurons a través del guany tòxic de funció (Sharma et al., 2016).

Donat que FUS juga un paper important en múltiples aspectes del metabolisme de l'ARN, el deteriorament del transcriptoma podria ser l'explicació més acurada per la toxicitat neuronal per pèrdua de funció de FUS. Per aquest motiu, s'han identificat diverses molècules regulades per FUS (Ishigaki et al., 2012; Lagier-Tourenne et al., 2012; Nakaya et al., 2013). L'alteració de l'expressió gènica i/o *splicing* alternatiu d'aquests gens pot tenir un gran impacte en la funció neuronal i per tant, en la neurodegeneració observada en l'ELA. Es creu que defectes en la funció de FUS podria alterar els nivells d'expressió d'aquests gens. Per tant, és possible que la neurodegeneració sol es produeixi després de la interrupció transcripcional provocada per la pèrdua de funció de FUS. S'ha demostrat que la unió de l'exó 10 de la proteïna tau associada a microtúbuls (MAPT) és rellevant per la patogènesi de la malaltia (Ishigaki et al., 2017; Orozco et al., 2012). MAPT codifica per la proteïna Tau, una proteïna d'unió a microtúbuls, una acumulació aberrant de la forma fosforilada d'aquesta afecta a les neurones, donant lloc a les taupaties, com és el cas de la malaltia d'Alzheimer (Umeda et al., 2013; Yoshida, 2006). FUS juntament amb un altre factor de *splicing*, factor de *splicing* ric en prolina i glutamina (SFPQ) regula el *splicing* alternatiu de l'exó 10 de MAPT, generant dos isoformes de Tau, 3RTau i 4RTau (Ishigaki et al., 2017). Ratolins amb FUS o SFPQ silenciats presenten un augment dels nivells de 4RTau donant lloc a una pèrdua neuronal (Ishigaki et al., 2017). Per tant, un rati alterat de Tau degut a una desregulació del complex FUS-SFPQ pot ser un factor patogènic en l'ELA.

## **1.6. Mecanismes patogènics en la fisiopatologia de l'ELA**

Darrera la fisiopatologia d'aquesta malaltia es veuen involucrats diversos mecanismes patogènics ja que es tracta d'una malaltia multifactorial (Hollinger et al., 2016). Entre ells trobem:

### **1.6.1. Estrès de reticle endoplasmàtic**

El reticle endoplasmàtic (RE) és l'òrganul que s'encarrega del control de la qualitat de les proteïnes i s'assegura del seu correcte plegament (Sozen et al., 2015). Durant el procés normal, sense estrès, en el plegament de les proteïnes hi participa un sistema de xaperones

(família de proteïnes encarregades del correcte plegament d'altres proteïnes) que inclou la proteïna relacionada amb la glucosa (GRP78 i GRP84), lectina, calnexina i calreticulina. L'augment de la hidrofobicitat és una senyal important per tal de reconèixer proteïnes mal plegades o desplegadas per les xaperones moleculars i així induir que es pleguin correctament (Fra et al., 1993). GRP78 és una de les xaperones del RE que interactua amb les regions hidrofòbiques de les proteïnes i així pot prevenir el mal plegament durant la translocació al RE (Naidoo, 2009). A més a més, també està involucrada en la inducció de la quinasa del reticle endoplasmàtic (PERK), de l'enzim 1 requeridor d'inositol (IRE1) i del factor de transcripció activador 6 (ATF6), importants en la selecció de proteïnes per la seva degradació. Totes tres, PERK, IRE1 i ATF6, són les principals activadores de la resposta a proteïnes desplegadas (UPR) després de l'alliberació de GRP78 (Ron & Walter, 2007). S'encarreguen d'augmentar la transcripció de més xaperones per tal d'inhibir la traducció de l'ARNm i per promoure la translocació de proteïnes del RE cap al citosol per la seva eliminació (I. Kim et al., 2008).

L'estrès de reticle té lloc quan hi ha una acumulació de proteïnes mal plegades, fet que passa en algunes malalties (Lindholm et al., 2006). En moltes condicions patològiques relacionades amb l'estrès oxidatiu el sistema proteasomal s'activa per tal de poder eliminar-les i prevenir així més dany a les proteïnes (Jung et al., 2009). Però és en el cas d'un estrès molt elevat o crònic quan es produeix una inhibició de l'activitat del proteasoma, donant com a resultat l'agregació de proteïnes mal plegades que pot ser irreversible i induir la mort cel·lular (Höhn et al., 2014). La UPR persistent provoca una *up-regulació* de la proteïna homòloga del factor de transcripció C/EBP proapoptòtic. S'inicia llavors la via de senyalització de la quinasa c-JUN proapoptòtica i activa la caspasa-12 i tot això desencadena el procés apoptòtic (Nakagawa et al., 2000; Nishitoh et al., 2002).

L'homeòstasi de proteïnes, incloent el plegament, el mal plegament, la degradació i l'agregació són marques de moltes malalties neurodegeneratives associades amb l'edat. L'ELA, tant esporàdica com familiar, és una de les malalties on hi ha agregació proteica com a conseqüència de defectes en el sistema proteasomal. En el casos d'ELA causades per mutacions en SOD1, diferents estudis han detectat agregats de diferents proteïnes en les motoneurons (Kato et al., 2000), i a més a més, també s'ha trobat una disminució en l'activitat de les xaperones i de la degradació proteasòmica en aquestes cèl·lules (Kabashi &

Durham, 2006). Es creu doncs, que aquesta disminució es degut a l'agregació de SOD1 i també per la disminució de la seva activitat, donant lloc a l'acumulació de l'anió superòxid i per tant, modificant altres proteïnes cel·lulars (Karademir et al., 2015).

### **1.6.2. Disfunció mitocondrial**

Els mitocondris tenen un paper central en la supervivència i el metabolisme de les cèl·lules. A més a més del seva funció en la producció d'adenosina trifosfat (ATP) via fosforilació oxidativa, també són importants en la biogènesi de fosfolípids, l'homeòstasi del calci i l'apoptosi. Els mitocondris són particularment importants en les neurones ja que aquestes tenen uns alts requeriments metabòlics: el cervell humà consumeix aproximadament el 20% de la producció d'ATP en repòs (Engl & Attwell, 2015; Nicholls & Budd, 2000). Per altra banda, els mitocondris són essencials per regular les concentracions de calci en les neurones, important per l'alliberació de certs neurotransmissors (Rizzuto et al., 2012). Les neurones són cèl·lules amb una llarga vida que persisteixen en el individu i per tant, són més susceptibles a acumular danys (Payne & Chinnery, 2015).

Per aquest motiu, no és d'estranyar que la disfunció mitocondrial s'hagi relacionat amb un gran nombre de malalties degeneratives, com és l'ELA. Aquesta disfunció mitocondrial en l'ELA pot venir donada de diferents formes, incloent defectes en la fosforilació oxidativa, en la producció de ROS o problemes en regular els nivells de calci. Per altra banda, un transport mitocondrial defectuós pot ser responsable de l'acumulació de mitocondris anormals en els axons de les MN i com a conseqüència, provocar la mort d'aquestes (E. F. Smith et al., 2019). Els primers estudis amb teixits postmòrtem de pacients amb ELA van identificar, a nivell microscòpic, anomalies estructurals i morfològiques als mitocondris del múscul esquelètic, fetge, neurones de la medul·la espinal i al còrtex motor (Menzies et al., 2002; Sasaki & Iwata, 1999).

Per altra banda, estudis realitzats en medul·les espinals de ratolins SOD1-G93A van trobar defectes en la capacitat de regular el calci i en l'activitat del complex de proteïnes transportadores d'electrons (Kirkinezos et al., 2005; Mattiazzi et al., 2002). A més a més, es van detectar uns mitocondris amb crestes dilatades i desorganitzades, tant en els axons com en les dendrites de les motoneurones al inici de la malaltia. En aquests

ratolins, l'inici de la malaltia va precedida immediatament per un ràpid augment de la degeneració dels mitocondris (Kong & Xu, 1998). SOD1 mutant, tal i com s'ha explicat anteriorment, forma agregats insolubles als mitocondris en la superfície de la membrana externa, per tant, es planteja la possibilitat d'un mecanisme directe causa-efecte pel qual SOD1 mutada impacta directament en la funció mitocondrial i en última instància, condueix a la mort cel·lular (Liu et al., 2004; Pasinelli et al., 2004; Pickles et al., 2013). De fet, els mitocondris aïllats exposats *in vitro* a SOD1 mutant van mostrar més susceptibilitat a l'estrès oxidatiu i al dany estructural (Pedrini et al., 2010; Pickles et al., 2013). Donat que aquestes anomalies morfològiques apareixen en ratolins abans de l'inici dels símptomes i de la degeneració de les motoneurones, es va concloure que el deteriorament mitocondrial juga un paper clau a l'inici de la degeneració de les MN en l'ELA (Sasaki & Iwata, 2007). Per altra banda, la sobreexpressió de SOD1 en els ratolins G93A genera mitocondris menys allargats i més esfèrics en les motoneurones (De Vos et al., 2007; C. M. J. Higgins et al., 2003).

També s'ha identificat una petita fragmentació de la xarxa mitocondrial en pacients d'ELA que presenten expansió de C9orf72 (Onesto et al., 2016) i mitocondris inflamats en un model de cèl·lules mare associades a aquesta mateixa mutació (Dafinca et al., 2016). A més a més, diferents estudis han pogut comprovar que la sobreexpressió de FUS en cultius de motoneurones també genera uns mitocondris més curts (Tradewell et al., 2012).

Per altra banda, estudis amb cultius cel·lulars i en animals transgènics han demostrat anormalitats en el metabolisme oxidatiu que estan associats a canvis en l'activitat de la cadena de transport d'electrons (ETC) i en una producció deficient d'ATP (Keep et al., 2001; Mattiazzi et al., 2002). Els mitocondris dels pacients d'ELA tenen una homeòstasi del calci alterada i una major producció de ROS, fet associat als danys relacionats amb l'oxidació. Per tant, els estudis demostren que els canvis en la funció mitocondrial és una característica central i comú de la fisiopatologia de l'ELA. Tot i així, no es sap si la disfunció mitocondrial és un esdeveniment primari o secundari (Carriedo et al., 2000).

Es pot concloure doncs que els mitocondris juguen un paper molt important en la malaltia ja que disfuncions en ells seria una de les causes de la mort de les motoneurones (E. F. Smith et al., 2019).

### 1.6.3. Excitotoxicitat per glutamat

El glutamat és el principal neurotransmissor excitador del sistema nerviós central. És un aminoàcid no essencial que es converteix en  $\alpha$ -cetoglutarat a través de la desaminació per la glutamat deshidrogenasa o per transaminació per una de les transaminases. Es metabolitza a través del cicle de l'àcid tricarboxílic a succinat, fumarat i malat successivament (Foran & Trotti, 2009).

Pel que fa al SNC, el glutamat també és el producte de la desaminació de la glutamina per la glutaminasa que és activada per un enzim mitocondrial i possiblement específica de les neurones (Kvamme et al., 1991). El glutamat alliberat sinàpticament activa una família de canals iònics activats per lligands (receptors ionotròpics) i receptors acoblats a proteïnes G (receptors metabotròpics). La seva acció finalitza mitjançant sistemes de recaptació específics que es troben principalment als astròcits que estan rodejant la sinapsis. En els astròcits, el glutamat es converteix després en glutamina, que aquesta no té propietats neurotransmissores i pot alliberar-se i posar-se a disposició de les neurones per convertir-lo novament a glutamat a través d'un sistema de recaptació de glutamina. Per acabar, els transportadors vesiculars de glutamat emmagatzemen el glutamat en vesícules sinàptiques per tal de tornar-lo a alliberar (Danbolt, 2001; Takamori, 2006).

Es coneixen tres classes principals de receptors metabotròpics i tres de ionotròpics pel glutamat. Ambdues famílies de receptors es localitzen en diferents estructures de la sinapsis excitadora, incloent el terminal presinàptic i el postsinàptic i també els astròcits que envolten la sinapsis (Newpher & Ehlers, 2008). Els receptors ionotròpics es classifiquen segons la seva capacitat de resposta i afinitat als agonistes exògens: àcids N-metil-d-aspartic (NMDA), àcid  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropioníc (AMPA) y kainat. Els AMPA sense la subunitat GluR2 són permeables al calci i aquests s'expressen en les neurones motores i estan implicats en la degeneració excitotòxica (Juan Carlos Corona & Tapia, 2007; Isaac et al., 2007; Kawahara et al., 2003).

Els nivells de glutamat al SNC dels mamífers són molt alts en comparació als altres neurotransmissors. L'excitotoxicitat és causada per l'activació excessiva i desregulada dels receptors del glutamat. L'exposició perllongada d'aquests receptors a concentracions altes de glutamat pot portar a la mort de la cèl·lula la qual expressa aquests receptors. En

condicions fisiològiques, els nivells extracel·lulars de glutamat es mantenen més baixos i per aquest motiu no es provoca l'activació dels receptors (Choi, 1994).

L'excitotoxicitat es propaga principalment a través dels receptors permeables al calci. L'entrada de calci és controlada pel RE i els mitocondris, però en presència d'una entrada excessiva d'aquest, ja sigui per disfuncions al RE o disfuncions mitocondrials presents també en l'ELA, poden activar els mecanismes que provoquen la mort cel·lular. Per tant, un desequilibri entre l'entrada i la sortida de calci de les cèl·lules és la senyal inicial que condueix a la sobrecàrrega de glutamat i en conseqüència a la mort neuronal (Clapham, 2007).

S'han descrit canvis en l'expressió de l'activitat dels transportadors del glutamat en diverses malalties neurodegeneratives com és el cas de l'ELA. Per tant, s'ha establert que hi ha una relació entre la desregulació de l'homeòstasi del glutamat i la neurodegeneració. Gràcies a diferents estudis *in vitro* es va poder observar que les MN mostraven una elevada vulnerabilitat a nivells elevats de glutamat (Rothstein et al., 1993). De manera similar, la inducció de la mort d'aquestes MN també es va aconseguir mitjançant l'activació dels receptors AMPA permeables al calci tant *in vitro* (Van Den Bosch & Robberecht, 2000) com també amb estudis *in vivo* en la medul·la espinal de ratolins (Tovar-Y-Romo et al., 2007).

En pacients amb la malaltia s'han documentat nivells augmentats de glutamat en plasma (Andreadou et al., 2008a), disminució de la captació de glutamat, disminució dels nivells d'expressió del transportador glutamat de la glia (EAAT2) (Ferrarese et al., 2001) i la glutamina sintetasa alterada (Bos et al., 2006). A més a més, també s'ha demostrat que el LCR de pacients amb ELA, però no controls, genera excitotoxicitat en cultius neuronals que pot ser bloquejada afegint de nou antagonistes del receptor de glutamat (Cid et al., 2003).

Com s'ha explicat anteriorment, el Riluzole i l'Edaravone són els únics tractaments eficaços que existeixen avui dia per aquesta malaltia i precisament el Riluzole actua en aquesta via regulant l'alliberació de glutamat, i per tant, l'activació del receptor postsinàptic (Andreadou et al., 2008b). També es va descobrir que augmenta significativament la captació del glutamat en ratolins de manera que facilita el control de l'excés del glutamat extracel·lular suggerint doncs que l'acció neuroprotectora del Riluzole podria ser deguda al seu efecte sobre la captació de glutamat (Fumagalli et al., 2008).

#### 1.6.4. Estrès oxidatiu

Les espècies reactives d'oxigen, com l'anió superòxid, el peròxid d'hidrogen i el radical hidroxil (HO) es formen per la reducció parcial de l'oxigen. Així doncs, les ROS es generen de forma endògena com a conseqüència del procés de fosforilació oxidativa mitocondrial, per tant, són productes de l'activitat aeròbica del metabolisme (Cunha-Oliveira et al., 2020).

Els mitocondris és un dels llocs més importants de producció intracel·lular de les ROS degut al seu paper fonamental en la producció d'ATP on l'oxigen molecular es redueix a aigua en la cadena de transport d'electrons (Brand, 2010; Kausar et al., 2018) i la fuga d'electrons afavoreix la formació de les ROS. Fora dels mitocondris també s'han identificat diferents enzims que poden produir ROS (Barber & Shaw, 2010).

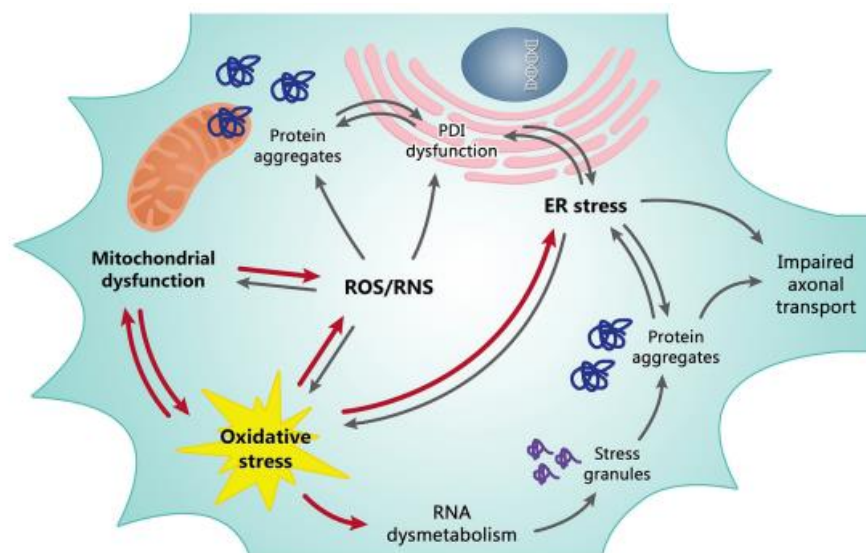
Ni el superòxid ni el  $H_2O_2$  són altament reactius, però cada un d'ells pateix una reacció addicional per produir altres oxidants més potents. El superòxid reacciona ràpidament amb l'òxid nítric, un oxidant dèbil produït per l'òxid nítric sintasa (NOS), per produir peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>). Per altra banda, el peròxid d'hidrogen es descompon lentament en radical hidroxil en un procés que pot ser catalitzat per ions metàl·lics com el ferro en la reacció de Fenton (Koppenol & Koppenol, 2018; Pryor & Squadrito, 1995).

Tant el radical peroxinitrit com el hidroxil són altament reactius capaços de danyar: proteïnes (canviant la seva conformació), lípids (alterant la membrana cel·lular oxidant els àcids grassos insaturats), l'ADN i l'ARN (Barber & Shaw, 2010). L'estrès oxidatiu apareix quan hi ha un desequilibri entre la producció de les ROS i la capacitat del sistema per eliminar-les o reparar el dany que han causat, és a dir, per una defensa antioxidant defectuosa. Es pot manifestar modificant l'estat redox de proteïnes essencials i per tant, de la seva activitat i funció que duen a terme (Barber & Shaw, 2010; Bodega et al., 2019). La defensa antioxidant cel·lular es compon d'antioxidants, tant enzimàtics com no enzimàtics (Phaniendra et al., 2015). Els principals antioxidants enzimàtics són: la superòxid dismutasa, la catalasa, la glutatió peroxidasa, la glutatió reductasa i la tioredoxina, totes amb un paper essencial en l'eliminació catalítica de les ROS. Per altra banda, els antioxidants no enzimàtics inclouen compostos de baix pes molecular com el glutatió, vitamines A, C i E, flavonoides i algunes proteïnes com l'albumina, ceruloplasmina i metalotioneïna (Niedzielska et al., 2016). Una

producció excessiva de ROS associada amb una defensa antioxidant ineficient representa una característica patològica de l'ELA (Tam et al., 2019).

Diversos estudis han demostrat un augment de l'estrès oxidatiu en teixits postmòrtem de pacients amb ELA en comparació amb les mostres de controls sans. S'han trobat nivells elevats de carbonils a la medul·la espinal i al còrtex motor (Ferrante et al., 1997; Shaw et al., 1995) així com també s'han detectat marcadors d'oxidació lipídica a la medul·la espinal, tots ells no es van trobar en mostres de pacients control sense la malaltia (Shibata et al., 2001). També s'ha detectat un augment d'un marcador de dany al DNA, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), al LCR dels pacients amb ELA (Bogdanov et al., 2000; Ihara et al., 2005) i de 4-hidroxinonenal, marcador de peroxidació lipídica (Simpson et al., 2004; R. G. Smith et al., 1998).

Per tant, gràcies a la identificació de les mutacions en SOD1 com a causants de la malaltia, es va poder associar l'estrès oxidatiu amb l'ELA, ja que sota una absència funcional de SOD1 no es pot fer front a l'augment de les ROS que estan provocant aquest estrès cel·lular (Barber & Shaw, 2010). A la Figura 7 es mostra l'associació entre l'estrès oxidatiu i l'ELA.



**Figura 7. Esquema representatiu de la relació entre la disfunció mitocondrial i l'estrès oxidatiu.** La disfunció mitocondrial i l'estrès oxidatiu són dos mecanismes dependents l'un de l'altre i són la base de la desregulació del balanç redox en l'ELA. L'augment de la producció de ROS, l'estrès de reticle i la desregulació transcripcional anormal de l'ARN són tot conseqüències de la disfunció mitocondrial i del sistema operatiu que contribueix a la mort de les motoneurones. A la vegada, aquests esdeveniments patològics provoquen altres efectes perjudicials correlacionats amb la formació de proteïnes mal



plegades que condueixen a la formació d'agregats citosòlics i mitocondrials insolubles i transport axonal alterat (Carrì et al., 2015).

#### 1.6.4.1. Compostos inductors d'estrès

Els grànuls d'estrès es formen en resposta a diversos tipus de factors estressants, per aquest motiu, en aquest treball s'ha volgut analitzar aquesta resposta a l'estrès a les motoneurons en cultiu sota tres tipus d'estressos: peròxid d'hidrogen (estrès oxidatiu), sorbitol (estrès osmòtic) i *polyinosinic:polycytidylic acid potassium salt* (poly-IC) (estrès per ARN forà).

El peròxid d'hidrogen és un líquid covalent miscible amb l'aigua i capaç de travessar fàcilment les membranes cel·lulars tot i que les vies que utilitza per fer-ho no s'han acabat de determinar (Halliwell et al., 2000). Múltiples articles han descrit nivells alts (generalment majors a 50µM) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com citotòxics per una ampla gamma de cèl·lules animals, vegetals i bacterianes en cultiu, tot i que la mort cel·lular induïda ja sigui per apoptosi o necrosis depèn del tipus de cèl·lula, del seu estat fisiològic, la concentració de l'estressor o de la duració del tractament (Hampton & Orrenius, 1997; Imlay & Linn, 1987). Per tant, es pensa que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és altament tòxic *in vivo* i s'ha d'eliminar ràpidament utilitzant enzims com catalases o peroxidases per tal d'evitar l'estrès oxidatiu (Bai et al., 1999; Halliwell et al., 2000; A. Matsumoto et al., 1999). Com s'ha comentat anteriorment, en termes químics el peròxid és poc reactiu, no oxida fàcilment la majoria de molècules biològiques, ja sigui lípids, ADN o proteïnes (Halliwell et al., 2000; Hampton & Orrenius, 1997). El perill del peròxid rau en gran mesura de la seva ràpida conversió a radical hidroxil sent aquest molt reactiu amb qualsevol tipus de molècula (Ueda et al., 1996).

El sorbitol és un dels sucres intermediaris en la via dels poliols. L'aldosa reductasa (AR) és el primer enzim de la via que converteix la glucosa en sorbitol. Aquest sorbitol generat seguidament es converteix en fructosa mitjançant la sorbitol deshidrogenasa (SDH). Així doncs, aquests enzims, tant la AR com la SDH formen part de la via dels poliols, la qual és una ruta alternativa del metabolisme de la glucosa que funciona en paral·lel amb la glucòlisis (Mahavir Singh et al., 2021). Diversos estudis han demostrat el paper de la hiperglucèmia en la patogènia de les complicacions microvasculars com la diabetis, la

retinopatia, la nefropatia, la neuropatia i trastorns cognitius (Umegaki et al., 2013). Encara que no s'acaba de conèixer amb exactitud la base molecular de com la hiperglucèmia genera dany tissular, el mecanisme s'ha relacionat amb l'estrès oxidatiu i osmòtic degut al gran impacte de l'acumulació de sorbitol i productes finals de glicació avançada (AGEs) (Akileshwari et al., 2012). La glucosa que entra a les cèl·lules es metabolitza com s'ha comentat anteriorment per l'AR tot i que aquest enzim té una afinitat molt baixa per la glucosa, menys del 3% de la glucosa que entra es metabolitza per aquesta via en condicions fisiològiques normals. Tot i així, la conversió de glucosa a sorbitol és més pronunciada en condicions de hiperglucèmia crònica i això comporta una acumulació de sorbitol dins de les cèl·lules fet que condueix a un augment de l'osmolalitat cel·lular i un esgotament del mioinositol (derivat del inositol necessari per regular l'acció de la insulina). Tot aquests canvis, podrien disminuir l'activitat de la bomba de sodi i potassi (Na-K-ATPasa) i possiblement canviar el potencial redox dins de la cèl·lula. Per tant, si es manté en el temps aquesta cadena de successos, podria induir a un estrès osmòtic (Flier et al., 1987).

Pel que fa a poly-IC, és un anàleg sintètic d'ARN de doble cadena (ARNbc) i un agonista del receptor tipus toll 3 (TLR-3). Activa el sistema immunitari innat humà amb la conseqüent regulació de la immunitat adaptativa (Chin et al., 2010; M. Matsumoto & Seya, 2008). L'evidència acumulada suggereix que poly-IC podria utilitzar-se com adjuvant de vacunes per tal de millorar la resposta immunitària innata i adaptativa. Estudis recents també han demostrat que l'activació de la senyalització de TLR-3 per poly-IC pot desencadenar directament l'apoptosi en algunes cèl·lules tumorals (Cheng & Xu, 2010). Degut a que la majoria dels virus produeixen ARN de doble cadena en algun moment durant la seva replicació i per tant activen el TLR-3 (Jacobs & Langland, 1996), s'ha utilitzat el poly-IC per tal d'imitar les infeccions causades per virus ja que també estimularà les activitats antivirals, com és l'activació del sistema immunitari innat. Les avantatges d'utilitzar poly-IC sobre els virus vius inclouen la seguretat, reproductibilitat de l'experiment i sobretot el control de les dosis i els temps (Cooper et al., 1988; Homan et al., 1972; Kimura et al., 1994). Com s'ha explicat anteriorment, un dels factors de risc per l'ELA descoberts recentment són les infeccions virals, i per aquest motiu, en aquest treball s'ha utilitzat poly-IC per tal d'imitar aquestes infeccions i veure'n els seus efectes sobre l'agregació de certes proteïnes.

### 1.6.5. Alteració en el transport axonal

El tràfic intracel·lular és un procés essencial per mantenir l'estructura i la funció de tots els tipus cel·lulars, però especialment el de les neurones degut a la seva extrema polarització axó/dendrita. El transport axonal s'encarrega del moviment de proteïnes, ARNm, lípids, vesícules i orgànuls que es sintetitzen especialment al cos cel·lular o soma, i per tant, el transport és necessari per la seva correcta distribució cap a l'axó. A més a més, el transport axonal manté la comunicació essencial entre el cos cel·lular i les terminals sinàptiques que permet a les neurones que reaccionin al seu entorn a través per exemple, d'endosomes de senyalització (De Vos & Hafezparast, 2017).

Es distingeixen dos tipus de transport axonal en funció de la velocitat del moviment: el transport axonal ràpid (50-400mm/dia o 0.6-5 $\mu$ m/s) i el transport axonal lent (0,2–10mm/dia o 0,0002 –0,1 $\mu$ m/s). Tant el ràpid com el lent estan regulats pels mateixos mecanismes moleculars que van movent les cargues pel llarg dels microtúbuls amb l'única diferència en la velocitat que ve pauta segons les pauses que fan entre les diferents fases del transport (Black, 2016). Per altra banda, existeixen dos tipus de transport segons la direcció en la que es transporta els diferents components: el transport axonal anterògrad i el retrògrad. El transport anterògrad és el que s'encarrega del transport des del soma cap a la sinapsis i per contra, el retrògrad va en direcció contrària, és a dir, des del terminal de l'axó cap al cos cel·lular (Vallee et al., 1989).

Les dues proteïnes motores associades als microtúbuls més importants són la dineïna i la quinesina. La dineïna citoplasmàtica consta de dos cadenes homodimeritzades i múltiples proteïnes accessòries i és un motor important que impulsa el transport retrògrad a les cèl·lules. Participa en una gran varietat de processos mòbils intracel·lulars, inclosa la mitosis, el manteniment de l'aparell de Golgi i el tràfic de vesícules membranoses (Holzbaur & Vallee, 1994; King, 2000). Gràcies a ratolins mutants per la dineïna es va poder observar que aquestes mutacions generaven neurodegeneració degut a un defecte en el transport axonal (Hafezparast et al., 2003; Kieran et al., 2005).

Per altra banda, les proteïnes de la família de les quinesines són principalment les responsables del transport anterògrad a les terminacions nervioses (Hirokawa et al., 2010; Hirokawa & Takemura, 2005; Miki et al., 2001).

Particularment, KIF5A codifica per un membre de la quinesina-1, específica per les neurones i que per tant, es troba implicada en malalties neurodegeneratives (Reid et al., 2002). El mecanisme patològic pel qual actua es basa en la interrupció de la capacitat de KIF5A per unir-se als microtúbuls i per tant, genera problemes en el transport anterògrad (H. Song & Endow, 1998). A més a més, degut a que transporten moltes cargues importants per les neurones, com neurofilaments i mitocondris, la interrupció de la motilitat de la quinesina-1 dóna lloc a una desregulació de l'homeòstasi axonal (Morfini et al., 2006).

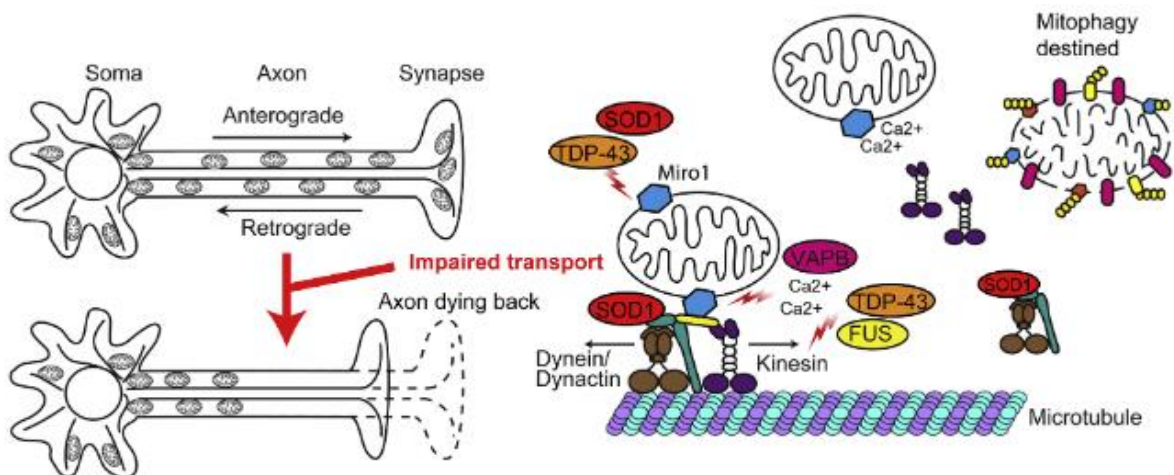
Les mutacions en components encarregats del transport axonal i per tant, els defectes en ell, és un esdeveniment comú que s'observa en diferents malalties neurodegeneratives com és el cas de l'ELA (Millecamps & Julien, 2013). Gràcies a diferents estudis *in vivo* en un model ratolí es van demostrar els defectes en el transport axonal. Es van aïllar motoneurons de ratolins G93A i es va registrar el temps que tarda en ser transportat fins al cos cel·lular un fragment de la toxina tetànica (transportat pel mateix compartiment que les neurotrofines). Els resultats van revelar un transport retrògrad mediat per la dineïna defectuós (Kieran et al., 2005).

Per altra banda, en la malaltia humana, les primeres evidències que es van tenir sobre els defectes en el transport axonal van ser a partir de mostres postmòrtem que van revelar nombroses acumulacions anormals de neurofilaments fosforilats i mitocondris i lisosomes en l'axó proximal de les motoneurons més grans (Okada et al., 1995; Rouleau et al., 1996). Aquest neurofilament és una proteïna axoesquelètica que participa en el manteniment de la forma i estructura de les neurones (S. J. Andrews et al., 2018). S'expressa en gran mesura en els axons mielinitzats i s'allibera en el líquid intersticial del cervell després d'una lesió axonal (Hempel et al., 2018). Recentment, s'ha identificat com un biomarcador de neurodegeneració que es pot obtenir de forma mínimament invasiva a partir de mostres de plasma (Benedet et al., 2019; N. Mattsson et al., 2019). Diferents estudis van observar nivells elevats del neurofilament en pacients amb deteriorament cognitiu lleu i amb demència (N. Mattsson et al., 2019).

Com ja s'ha explicat anteriorment, el dany mitocondrial està involucrat en la degeneració de les motoneurons en l'ELA. La síntesi d'energia que es produeix per part dels mitocondris és essencial per la correcta homeòstasi axonal i per tant, la disfunció en aquest òrganul juga un paper crític en la degeneració axonal. A la Figura 8 es mostra els dos tipus de transport i la

funció de diferents gens en aquest. Degut a que els mitocondris són transportats per la quinesina i el complex dineïna/dinactina (Hirokawa et al., 2010), els defectes en aquest transport donen lloc a una acumulació anormal de mitocondris. S'ha demostrat que aquests s'acumulen en els axons de les motoneurons espinals en models ratolins mutants per SOD1 (Bilsland et al., 2010; Magrané & Manfredi, 2009) i en pacients amb ELAe (Sasaki & Iwata, 1996), suggerint doncs, un deteriorament en el transport axonal en aquesta malaltia. De fet, en models SOD1 mutants es va observar directament un defecte en el transport axonal dels mitocondris en el nervi ciàtic ja durant l'etapa presimptomàtica de la malaltia (Bilsland et al., 2010). Per altra banda, diferents estudis han pogut demostrar que hi ha una disminució de la dinactina-1 en les MN dels pacients amb ELAe (Y. M. Jiang et al., 2005). A més a més, van poder observar que aquest fet passava abans de l'acumulació de neurofilaments fosforilats (Y. M. Jiang et al., 2007). La disminució de la dinactina-1 en els pacients amb ELAe sembla ser que és específic per les neurones motores ja que la seva expressió es manté en la resta de neurones. Per tant, es pot concloure que els baixos nivells d'aquesta proteïna en les MN està fortament associat amb la degeneració present en els pacients amb ELAe (Ikenaka et al., 2012).

Així doncs, la presència de mitocondris amb una morfologia anormal, observada tant en models d'ELA com en pacients amb ELAe, indica que hi ha una degradació deficient d'aquests orgànuls degut a un transport retrògrad alterat (P. C. Wong et al., 1995).



**Figura 8. Representació del transport axonal i els gens implicats.** Les neurones depenen del transport axonal dels mitocondris pel seu requeriment d'ATP i per regular els nivells de calci. El transport axonal dels mitocondris es veu afectat en l'ELA associada a mutacions a SOD1 i TDP-43. La SOD1 mutant s'uneix al complex dineïna/dinactina necessari pel transport retrògrad retenint-lo al citosol. L'augment del calci citosòlic degut a la disminució del contacte entre el reticle i el mitocondri en mutants per SOD1, TDP-43 i FUS també pot contribuir a que els mitocondris deixin d'estar units a la quinesina. La pèrdua dels mitocondris condueix a la mort axonal (Als et al., 2021).

## 1.7. Models experimentals

Per tal d'avançar amb el coneixement de la malaltia existeixen diferents models experimentals per tal d'entendre els mecanismes de mort de les motoneurones i la fisiopatologia de l'ELA. Aquests inclouen models *in vivo* a partir d'animals que presenten degeneració de les MN i per altra banda models *in vitro* ja sigui a partir de diferents preparacions de medul·la espinal, amb models cel·lulars o amb cultius organotípics (Tovar-Y-Romo et al., 2009). D'entre els models animals el més utilitzat és el SOD1-G93A tot i que posteriorment s'han creat molts d'altres amb diferents mutacions en SOD1 així com també en C9orf72 i FUS. També hi ha models en rates, en peixos i en mosques, tot i que són menys utilitzats (Gois et al., 2020). Pel que fa als models *in vitro* per l'estudi de l'ELA d'entre els més utilitzats es troba la línia cel·lular NSC-34 (Tovar-Y-Romo et al., 2009), la línia cel·lular limfoblastoide (Pansarasa, Bordoni, Drufuca, et al., 2018) i les cèl·lules mare pluripotents induïdes (Gois et al., 2020). En aquesta tesi s'ha utilitzat el model SOD1-G93A com a model *in vivo* i les cèl·lules mare pluripotents induïdes com a model *in vitro*.

### 1.7.1. Ratolins transgènics mutants per SOD1

Un gran avenç en la investigació de l'ELA va estar el descobriment de que aproximadament el 20% dels casos de la malaltia eren deguts a la mutació en SOD1 (Rosen et al., 1993). Quasi immediatament després es van desenvolupar ratolins transgènics que expressen la SOD1 humana mutada. La mutació més coneguda consisteix en la substitució de la glicina per l'alanina en la posició 93 (G93A), tot i que s'han produït d'altres com la substitució de l'alanina per valina en la posició 4 (A4V) (Mark E. Gurney et al., 1994) i també el glutamat per arginina en la posició 37 (G37R) (P. C. Wong et al., 1995) i 85 (G85R) (Bruijn et al., 1997). El fenotip expressat per aquests ratolins, respecte l'edat d'inici dels símptomes i gravetat, és

directament proporcional a la quantitat de proteïna mutant expressada en el teixit, fet que assenta encara més la hipòtesi de la funció tòxica adquirida de SOD1 mutant (M E Gurney, 2000).

La malaltia en aquests ratolins transgènics comença amb debilitat a les potes del darrera i seguidament continua fins la paràlisi completa de les extremitats (Mark E. Gurney et al., 1994). Les alteracions cel·lulars es caracteritzen principalment per la degeneració de les motoneurons i dels seus processos en les primeres etapes, seguit de la pèrdua neuronal i atròfia de la medul·la espinal en les últimes etapes (Dal Canto & Gurney, 1995).

Al voltant dels 90 dies, apareixen els primers signes caracteritzats per tremolors d'una o més extremitats. Aproximadament una setmana més tard, els ratolins estenen les potes del darrera menys del normal quan són aixecats per la base de la cua. A mesura que avança la malaltia, aproximadament als 120 dies d'edat, apareix la debilitat muscular amb una marcada atròfia i els ratolins comencen a caminar de puntes. Dies més tard, els ratolins es troben rígids, arrastrant les potes del darrera. L'esperança de vida d'aquests ratolins és aproximadament de 150 dies, quan la paràlisi ja és total. Pel que fa al pes dels ratolins, arriben al seu màxim als 77 dies d'edat i a partir d'aquí comencen a perdre pes fins aproximadament un 20% quan arriben a l'etapa final. En l'avaluació histològica de la medul·la espinal lumbar s'observa que el nombre de motoneurons disminueix gradualment a mesura que avança la malaltia. Aproximadament als 60 dies d'edat el nombre de MN és similar als ratolins sans. En canvi, als 90 dies d'edat, la pèrdua de MN és significativa, aproximadament un 20% menys, coincidint en el moment en que els ratolins comencen amb els primers símptomes. Als 120 dies d'edat, la pèrdua de MN és d'un 40% aproximadament respecte a l'inici i ja en les etapes finals, als 150 dies, la pèrdua de motoneurons és de fins al 50% respecte a l'inici (Zhou et al., 2007).

Degut a que no existeixen diferències evidents simptomàtiques o patològiques entre l'ELAf i l'ELAe, s'ha assumit que els mecanismes subjacents a ambdós tipus de malaltia són compartits. Per tant, els animals SOD1 transgènics s'han utilitzat àmpliament en nombrosos estudis relacionats amb l'ELA per tal d'entendre la fisiopatologia però també per tal de provar diferents fàrmacs i teràpies experimentals (Tovar-Y-Romo et al., 2009).

Tot i així, aquest model no estaria englobant tots els casos de la malaltia, ja que existeixen d'altres que no tenen mutacions en SOD1, per tant, no és del tot exacte extrapolar els descobriments realitzats en aquests models als processos que succeeixen en pacients que no tenen la mutació (Juan C Corona et al., 2007).

### **1.7.2. Cèl·lules mare pluripotents induïdes**

Els models animals ens proporcionen models econòmics per estudis de dany neuronal però existeixen diverses limitacions a l'hora de traduir el valor dels resultats al que realment passa en condicions humanes (Xiong et al., 2013). Per exemple, alguns fàrmacs candidats per la neuroprotecció han fallat durant els assajos clínics en humans després de donar resultats positius en els models animals (Marklund et al., 2006).

Per aquest motiu, l'ús de les cèl·lules mare pluripotents induïdes són de gran interès. Les iPSC són cèl·lules derivades de la sang o de la pell que han estat reprogramades a un estat pluripotent semblant a l'embrionari, fet que permet el desenvolupament d'una font il·limitada de qualsevol tipus de cèl·lula humana amb una finalitat de recerca. Les iPSC ens proporcionen informació fisiològicament rellevant sobre la mecànica de la lesió neuronal humana i la pèrdua de funció motora. Són una tecnologia innovadora que ens permet generar, per exemple, cèl·lules neuronals a partir de cèl·lules de pacients, eliminant així el problema de l'especificitat d'espècie inherent a l'ús de models animals (C. Y. Chang et al., 2018b).

Les iPSC humanes es van establir per primera vegada al 2007 al laboratori de Shinya Yamanaka (Takahashi et al., 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006). En general, les iPSC són semblants a les cèl·lules mare embrionàries (ESC) (Thomson et al., 1998) ja que són pluripotents i són capaces d'autorenovar-se *in vitro*. Per aquest motiu, la tecnologia de les iPSC pot evitar els problemes socials i ètics relacionats amb l'ús de les ESC (sol es poden obtenir d'embrions) (Takahashi et al., 2007).

A partir de l'estudi de les ESC es van identificar quatre factors indispensables per la inducció de la pluripotència i també pel manteniment d'aquesta. Els quatre factors de transcripció són: Oct-3/4, Sox2, c-Myc i KLF4. Un cop obtingudes aquestes cèl·lules pluripotents, es



podran diferenciar al tipus cel·lular d'interès mitjançant diferents factors segons el tipus de cèl·lula (S. Yamanaka, 2007).

La generació de iPSC és un procés lent, en el cas de cèl·lules de ratolins es tarda entre 1 i 2 setmanes i per les cèl·lules humanes es tarda entre 3 i 4 setmanes (Ghaedi & Niklason, 2020). Tot i així, recentment s'han fet diversos avenços per tal de millorar el temps que es tarda en generar les iPSC. Els protocols tradicionals pel cultius d'aquestes cèl·lules utilitzaven capes alimentadores de fibroblasts humans o de ratolins (Takahashi et al., 2007; J. Yu et al., 2009), són cultius que necessiten molt temps de preparació. Per aquest motiu, per tal d'avançar cap a sistemes de cultiu sense necessitat de capes alimentadores, s'han desenvolupat mètodes que inclouen Matrigel o altres proteïnes de la matriu extracel·lular (Ludwig et al., 2006) i també medis com el MTeSR que és el medi de cultiu més àmpliament publicat per les iPSC que ajuda a mantenir la pluripotencialitat (M. Shi et al., 2011).

Entre les condicions més complexes i variades de la tecnologia de les iPSC s'han utilitzat per a transplantaments, per tractar la degeneració muscular, per transplantaments de còrnia, per insuficiència cardíaca, per la diabetis i la immunoteràpia (C.-Y. Chang et al., 2018a). Com a model de malalties *in vitro*, les iPSC derivades de pacients s'han utilitzat àmpliament per l'estudi de tots els aspectes de la biologia cel·lular de la malaltia, per estudis de fenotips i per la detecció continua de fàrmacs. Mitjançant l'ús de les iPSC derivades de cèl·lules somàtiques dels pacients, els investigadors poden obtenir diferents tipus de cèl·lules patogèniques directament dels pacients que potencialment poden compartir els mateixos mecanismes de malaltia per al descobriment de fàrmacs. Per a l'estudi de malalties neurodegeneratives, les iPSC es diferencien a diferents tipus de neurones i glia per tal d'imitar el procés de desenvolupament del SNC. Les neurones diferenciades derivades de les iPSC i la glia tenen una gran capacitat per modelar diferents malalties neurodegeneratives entre elles l'Alzheimer, l'ELA i l'atròfia muscular (C. Y. Chang et al., 2018b).

## 1.8. Processos cel·lulars afectats en l'ELA

### 1.8.1. Tràfic endosomal

La família de les proteïnes Rab és una classe de GTPases on s'han identificat aproximadament 70 membres en els mamífers, entre elles Rab5 i Rab7.

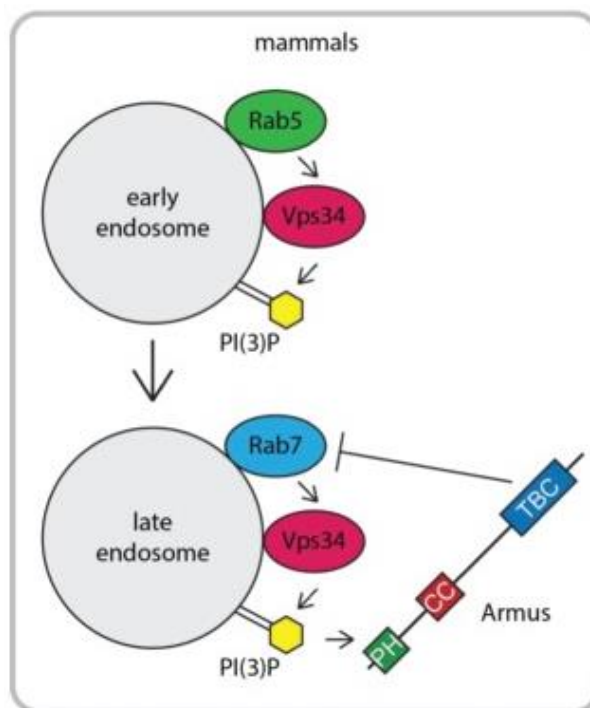
Rab5 és una petita GTPasa que alterna entre una forma inactiva unida a GDP i una forma activa unida a GTP per tal de fer les seves funcions biològiques (Barbieri et al., 1994; Bucci et al., 1992). L'activació de Rab5 necessita GEF, per contra, la inactivació està regulada per les proteïnes activadores de la hidròlisis de GTP (GAP) (Haas et al., 2005). Per tant, Rab5 està sota el control dual tant de les GEFs com de les GAP (W. Xu et al., 2018).

Rab5 és el regulador principal de la biogènesi i tràfic de l'endosoma (Gorvel et al., 1991; Zerial & McBride, 2001) i juga un paper clau en la maduració de l'endosoma primerenc a l'endosoma tardà (Rink et al., 2005; Russell et al., 2012). Aquest procés està regulat per un canvi seqüencial d'activitat des de l'endosoma primerenc Rab5+ a l'endosoma tardà Rab7+, procés anomenat conversió de Rab (Poteryaev et al., 2010). L'activació sostinguda de Rab5 resultarà amb la interacció amb un complex on es troba una altra proteïna, Rab7, present als endosomes tardans i com a conseqüència, es converteix d'endosomes primerencs Rab5+ a endosomes tardans Rab7+ (W. Xu et al., 2018). Així doncs, Rab5 regula els primers passos de l'endocitosi. Diversos efectors com les fosfatidilinositol 3 quinases (Horiuchi et al., 1997; Simonsen et al., 1998), s'uneixen específicament a la forma activa de Rab5, és a dir, a la forma unida a GTP, regulant l'ancoratge i la fusió dels endosomes primerencs (Mu et al., 1995; Stenmark et al., 1994).

Per altra banda, Rab7 ocupa un nexa crític en la via endocítica ja que s'encarrega del canvi d'endosomes primerencs a tardans i després en el seu tràfic i fusió a lisosomes (Agola et al., 2012). Tot i així, diverses opinions contradictòries s'han posat de manifest sobre el paper exacte de Rab7 ja que alguns investigadors informen que Rab7 solament participa en el pas de conversió d'endosomes primerencs a tardans (Schwartz et al., 2008) i d'altres informen d'un únic paper en el tràfic entre els endosomes tardans i els lisosomes (Ceresa & Bahr, 2006). Amb els anys, diferents investigadors (Vanlandingham & Ceresa, 2009), van realitzar estudis amb ARN d'interferència (ARNi) i van observar que en absència de Rab7 el tràfic

entre endosomes primerencs i tardans no va canviar però si es va bloquejar la sortida dels endosomes tardans. A més, va provocar una acumulació d'endosomes tardans i una disminució del nombre i mida dels lisosomes.

Així doncs, com s'ha comentat anteriorment, algunes de les proteïnes Rab es localitzen en els compartiments endocítics dels endosomes primerencs com Rab5 (Bucci et al., 1992; Van Der Sluijs et al., 1991) i altres, com Rab7, en els endosomes tardans (Lombardi et al., 1993; Soldati et al., 1995). Per tant, tant Rab5 com Rab7, són dues proteïnes molt importants en la via endocítica. A la Figura 9 es mostra un esquema de la funció tant de Rab5 com de Rab7 en la via endocítica. Aquesta via és la responsable de mantenir l'homeòstasi cel·lular al internalitzar, classificar, reciclar i/o degradar diferents tipus de molècules (Huotari & Helenius, 2011). Les Rab serveixen com signatures moleculars als endosomes, regulant la seva biogènesi i les seves funcions (Pfeffer, 2017; Zerial & McBride, 2001; Zhen & Stenmark, 2015).



**Figura 9. Representació de l'associació de les proteïnes Rab en la formació dels endosomes.** La maduració endosomal depèn de l'activació de la GTPasa Rab5 a la membrana dels endosomes primerencs. En última instància s'uneix Rab7, desplaçant Rab5, per tal d'acabar formant l'endosoma tardà (Law & Rocheleau, 2017).

Hsu i els seus companys (Hsu et al., 2018) en els seus estudis van poder observar que Rab5 es trasloca des de la membrana dels endosomes primerencs als mitocondris sota una situació d'estrès oxidatiu. Aquest procés és reversible i va acompanyat d'un augment d'endosomes Rab5+ en contacte amb els mitocondris. Curiosament, l'activació de Rab5 als mitocondris depèn d'Alsina, proteïna codificada pel gen ALS2, gen mutat en l'ELA. Van demostrar en cultius de motoneurons derivades de cèl·lules mare pluripotents induïdes i deficientes en Alsina que eren defectuoses en la re-localització de Rab5 als mitocondris i mostren una major susceptibilitat a l'estrès oxidatiu. Per tant, gràcies a aquests descobriments, es defineix una via mitjançant la qual Alsina catalitza l'assemblatge de la maquinària endocítica de Rab5 als mitocondris. Els defectes en la detecció d'estrès per part dels endosomes podrien ser crucials pel control de la qualitat mitocondrial durant les primeres etapes de l'ELA. Si els endosomes no són capaços de detectar l'estrès, no inicien la via endocítica i en conseqüència, no es podran eliminar les diverses partícules que estan generant aquest estrès, posant en risc als mitocondris.

### **1.8.2. Comunicació entre orgànuls**

Les proteïnes associades a VAMP (VAP) tenen la capacitat d'associar-se amb les proteïnes de membrana associades a vesícules (VAMP) (Skehel et al., 1995). Són proteïnes localitzades al reticle endoplasmàtic i funcionen com adaptadores, reclutant una gran varietat de proteïnes a la superfície del RE (Dudás et al., 2021; Lev et al., 2008; S. E. Murphy & Levine, 2016). Els vertebrats expressen dos isoformes d'aquesta proteïna, VAPA i VAPB, que comparteixen gran part de la seva seqüència. Les proteïnes VAP poden formar homodímers o també dímers VAPA-VAPB (Kanekura et al., 2006; Y. Nishimura et al., 1999).

Un conjunt important de proteïnes que interactuen amb VAP serveixen de pont que connecten el RE amb pràcticament tots els demés orgànuls de la cèl·lula. Alguns dels orgànuls amb els quals interactuen són els mitocondris, l'aparell de Golgi, peroxisomes i també endosomes (James & Kehlenbach, 2021). D'aquesta forma es localitzen molt a prop regions del RE amb altres membranes dels orgànuls, formant estructures conegudes com llocs de contacte de membrana (MCS). Aquestes estructures són importants ja que permeten la comunicació entre els orgànuls en absència de fusió entre les dues membranes.

Són llocs on es produeixen molts canvis de lípids i de calci (Cockcroft & Raghu, 2018; Marchi et al., 2014; Phillips & Voeltz, 2016; Prinz et al., 2020).

No es diferencia les funcions entre la isoforma VAPA i VAPB ja que el grau de superposició entre les funcions de ambdues encara no està del tot clar. De fet, investigacions sistemàtiques del interactoma VAP no han aconseguit revelar cap diferència important entre les dues (Cabukusta et al., 2020). Poder comprendre amb claredat la funció de cada una d'elles ajudaria a entendre el mecanisme patogènic de les mutacions en aquesta proteïna (Borgese et al., 2021).

Degut a que VAPA i VAPB són proteïnes integrals del RE, i que tenen un paper destacat en la unió del RE a la superfície citosòlica de la resta dels orgànuls, són importants en la comunicació interorgànica i per aquest motiu, mutacions en elles són causants de diferents malalties neurodegeneratives com per exemple la demència frontotemporal, l'Alzheimer, el Parkinson, l'atròfia muscular espinal i l'ELA. (Dudás et al., 2021; Phillips & Voeltz, 2016; Prinz et al., 2020).

S'ha observat que en la majoria dels teixits analitzats, incloent la medulla espinal, VAPA s'expressa en nivells més alts que VAPB, tant a nivell d'ARNm com de proteïna (Cabukusta et al., 2020). Per altra banda, en ratolins es va observar que la desactivació de VAPA era letal per l'embrió (McCune et al., 2017), mentre que l'eliminació de VAPB era compatible amb la supervivència fins l'edat adulta (Kabashi et al., 2013). Aquesta diferència podria ser degut a la major abundància de VAPA i per tant, la seva absència dóna lloc a una major reducció del conjunt total de VAP que no pas la depleció de VAPB. Alternativament, també podria ser degut a l'existència d'una funció essencial que desenvolupa VAPA i no VAPB (Borgese et al., 2021).

Al 2004 es va descobrir una mutació *missense* al gen VAPB que era la causa d'una forma de ELAf, coneguda com ELA8 (Y. min Sun et al., 2017; van Blitterswijk et al., 2012). Com s'ha explicat anteriorment, l'agregació de proteïnes és una característica de molts trastorns neurodegeneratius, entre ells, l'ELA. En models cel·lulars d'ELA8 s'ha trobat una inclusió peculiar caracteritzada estructuralment per la presència de perfils membranosos derivats del RE (Papiani et al., 2012; Teuling et al., 2007). S'han identificat diverses mutacions en VAPB que causen ELA8 però fins al moment solament s'ha estudiat la mutació P56S (Kabashi

et al., 2013; A. L. Nishimura et al., 2004). Aquesta mutació provoca una ràpida oligomerització i agregació de VAPB mutant, i s'acumula en múltiples inclusions (L. Qiu et al., 2013; Tudor et al., 2010). S'han proposat diferents mecanismes pels quals VAPB mutant causa ELA, incloent pèrdua de funció, guany de funció tòxica o inclús que la VAPB mutada recluta VAPA i VAPB de tipus salvatge, reduint doncs la funció d'ambdues proteïnes (Han et al., 2012; Kanekura et al., 2006; Papianni et al., 2012). Degut a les múltiples funcions en les que es troben implicades les VAP, és impossible assignar el gen VAPB a cap de les categories funcionals en les que s'han classificat els gens lligats a l'ELA, ja que de fet, encaixaria en molt d'ells (Borgese et al., 2021).

### **1.8.3. Síntesi lipídica**

Són molts els estudis publicats que demostren que una desregulació del metabolisme dels lípids constitueix una part important en la patogènesi de l'ELA i que els lípids podrien ser útils com a biomarcadors i dianes terapèutiques (Agrawal et al., 2022).

A partir de diferents estudis s'ha pogut demostrar que els lípids poden jugar un paper clau en la toxicitat, ja que la desregulació dels lípids al SNC i la seva circulació en pacients amb ELA s'ha associat clínicament amb la gravetat de la malaltia, al deteriorament funcional i a la supervivència d'aquests (Desport et al., 2006; Steyn et al., 2018; Van den Bergh et al., 1978). En un estudi van poder observar que la medul·la espinal dels pacients amb ELA presentaven una disminució significativa en el contingut d'àcids grassos poliinsaturats (PUFA) de la família n-3, mentre que en el còrtex frontal es trobaven augmentats. Els canvis en el perfil lipídic comporten canvis significatius en l'índex de doble cadena i en el rati n6/n3. Així doncs, aquests índexs podrien indicar la potencial vulnerabilitat de les membranes al dany peroxidatiu (E. V. Ilieva et al., 2007). Anys més tard, en un altre estudi, es va observar que nivells elevats d'àcid araquidònic contribueixen a la disfunció i a la mort de les motoneurons en l'ELA (H. Lee et al., 2021).

A més a més, recentment, s'han associat mutacions causals al gen serina palmitoiltransferasa subunitat bàsica 1 de cadena llarga (SPTLC1) als mecanismes patològics de l'ELA. El gen SPTLC1 codifica per una proteïna important per la biosíntesi d'esfingolípid. Així doncs, s'han trobat casos d'ELA amb mutacions en aquest gen donant lloc a una síntesi sense restriccions d'esfingolípid. Aquests resultats suggereixen que alteracions en el

metabolisme dels lípids podrien impulsar la patogènesi de l'ELA (Johnson et al., 2021; Mohassel et al., 2021).

Diferents estudis també han pogut comprovar els beneficis d'una dieta rica en lípids per tal d'augmentar la supervivència en un model de ratolí amb ELA (Dupuis et al., 2004) i alentir la progressió de la malaltia (Ahmed et al., 2017; Johannes Dorst et al., 2013). Per altra banda, també s'ha pogut observar que els pacients amb nivells sèrics elevats de triglicèrids (J. Dorst et al., 2011) i una correcta proporció de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL)/lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) tenen una supervivència perllongada de quasi un any (Meininger et al., 2009).

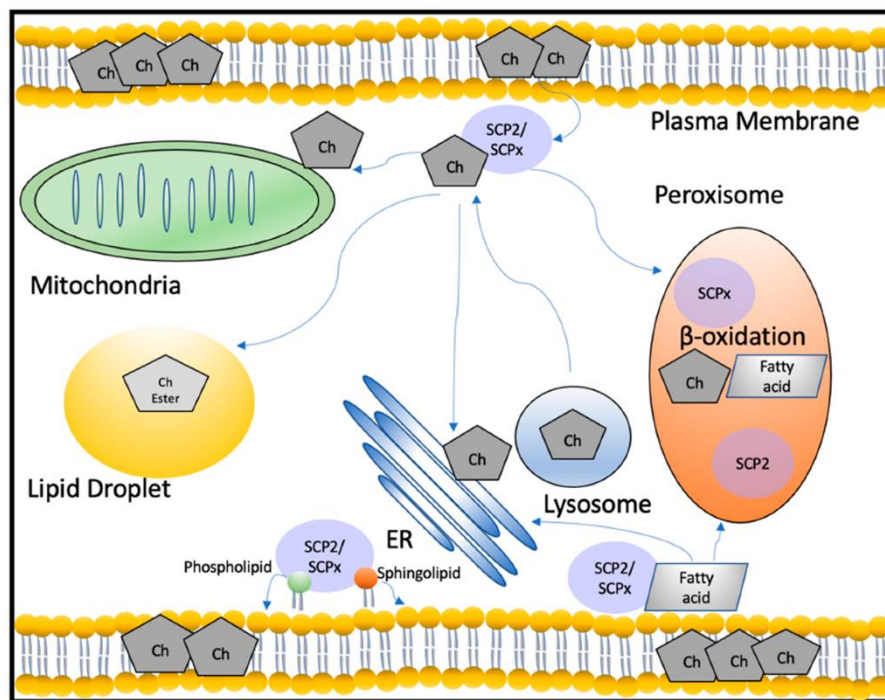
Per tant, totes aquestes observacions indiquen la importància d'un correcte metabolisme dels lípids per tal de prevenir certes malalties, entre elles, l'ELA. Per aquest motiu en aquesta tesi, s'han volgut analitzar quatre proteïnes implicades: la proteïna transportadora d'esterols (SCP2), l'àcid gras desaturasa 2 (FADS2), la proteïna quinasa C  $\beta$ II (PKC $\beta$ II) i la fosfolipasa C  $\beta$ 1 (PLC $\beta$ 1).

### **1.8.3.1. SCP2**

SCP2 codifica per una proteïna pro-SCP2 de 15kDa que després d'un processament acaba donant lloc a la proteïna SCP2 madura de 13kDa (Ohba et al., 1995). Es pot trobar tant en els peroxisomes, degut a una seqüència que va dirigida a ells, però també en el citosol (Keller et al., 1989; T. Mori et al., 1991).

És una proteïna que s'expressa en gran mesura a les glàndules suprarenals, testicles, ovaris, fetge i intestí, és a dir, en tots els teixits que necessiten una alta taxa del metabolisme del colesterol (Scallen et al., 1985). S'ha demostrat que SCP2 juga un paper important en la transferència i metabolisme de lípids (Galano et al., 2022), particularment del colesterol (Colles et al., 1995; Stollowich et al., 1999) i els hidroperòxids de colesterol (Kriska et al., 2010). Es suggereix que SCP2 és efectiu per millorar el tràfic d'esterols, tant des de les membranes plasmàtiques a les membranes microsomals com des de les membranes plasmàtiques als mitocondris (Frolov et al., 1996). També participa en la distribució del colesterol fora de la membrana plasmàtica a altres localitzacions cel·lulars com en les gotes lipídiques (B P Atshaves et al., 2000; Clark, 2012).

La regulació del tràfic del colesterol és una de les seves funcions més importants, tot i que, tal i com s'ha comentat anteriorment, també es troba involucrada en el transport i metabolisme d'altres lípids, incloent els àcids grassos, els acetil-CoA i alguns fosfolípids (N. C. Li et al., 2016). SCP2 és important també pel transport d'àcids grassos als peroxisomes per la seva oxidació i cap al RE per la incorporació de fosfolípids (Barbara P Atshaves et al., 2003; E. J. Murphy et al., 2000). A la Figura 10 es mostra la funció de SCP2 i la seva importància en el metabolisme del colesterol i altres lípids.



**Figura 10. Funció de SCP2 en el transport i metabolisme del colesterol i altres lípids.** SCP2 pot transportar el colesterol entre diverses membranes cel·lulars i orgànuls, com la membrana plasmàtica, els mitocondris, les gotes lipídiques, el RE, els lisosomes i els peroxisomes. Els intermediaris del colesterol també s'oxiden als peroxisomes per la síntesis d'àcids biliars. A més a més del transport del colesterol, SCP2 juga un paper important en el transport d'àcids grassos, fosfolípids i esfingolípids. És clau també per la  $\beta$ -oxidació peroxisomal (Galano et al., 2022).

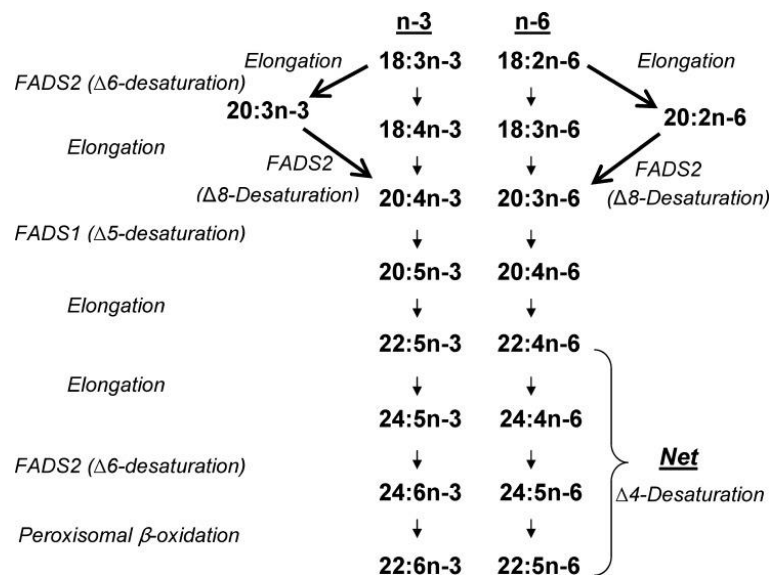
Estudis recents han demostrat un augment de fins a sis vegades els nivells d'èsters de colesterol en ratolins G93A (Chaves-Filho et al., 2019), fet que podria estar relacionat amb un augment de la funció de SCP2 en aquest model.



### 1.8.3.2. FADS2

L'àcid gras desaturasa 2 és un membre de la família de gens d'àcids grassos desaturasa. Els enzims desaturasa regulen la insaturació dels àcids grassos de cadena llarga mitjançant la introducció de dobles enllaços entre carbonis de la cadena d'acil-gras. Degut al *splicing* alternatiu que pateix aquest gen, existeixen diferents isoformes. En concret, FADS2, es troba unida a la membrana del reticle endoplasmàtic (Bláhová et al., 2020).

FADS2 actua com un acil-coenzim A (CoA) desaturasa que introdueix un doble enllaç cis en la cadena d'acil (L. Ge et al., 2003). L'àcid  $\alpha$ -linolènic (ALA, 18:3n-3) i l'àcid linoleic (LA, 18:2n-6) i serveixen com substrats per altres àcids grassos importants. A la Figura 11 es mostra la via en la que es troba implicat el gen FADS2. Per inserció de dobles enllaços en la cadena d'acil i per elongació els PUFA es sintetitzen a partir de l'ALA i del LA. Aquests es poden convertir per la FADS2 en àcid estearidònic (18:4n-3) i àcid  $\gamma$ -linolènic (GLA, 18:3n-6) respectivament. El cicle consisteix en successives elongacions i dessaturacions, per acabar sintetitzant àcid docosahexaenoic (DHA, 22:6n-3) i àcid docosapentaenoic (DPA, 22:5n-6) (Glaser et al., 2010).



**Figura 11. Via convencional dels PUFA n-3 i n-6.** La via convencional consisteix en l'alternança d'elongació i dessaturació. FADS2 actua tant en l'àcid  $\alpha$ -linolènic (18:3n-3) com en l'àcid linoleic (18:2n-6). Primer es produeix una elongació d'ambdós amb una posterior dessaturació, donant lloc a l'àcid estearidònic (18:4n-3) i àcid  $\gamma$ -linolènic (18:3n-6) respectivament. A partir de successives elongacions i dessaturacions s'acaba formant DHA (22:6n-3) i DPA (22:5n-6) (W. J. Park et al., 2009).

El DHA és un àcid gras poliinsaturat que generalment es localitza a les membranes cel·lulars com un component de fosfolípids. El SNC és especialment ric en DHA (Meharban Singh, 2005) i en aquest sistema regula processos inflamatoris (Serhan et al., 2008), la formació de components de membrana pre i postsinàptics (Chytrova et al., 2010; Jackson et al., 2012) i també promou processos de desenvolupament i memòria (Guesnet & Alessandri, 2011; L. K. Lee et al., 2013). En un estudi es va poder observar una disminució dels nivells de DHA en mostres postmòrtem de medul·la espinal de pacients amb ELA, suggerint una contribució dels canvis en el metabolisme dels àcids grassos en la patogènia de la malalta (E. V. Ilieva et al., 2007). En un altre estudi realitzat amb el model de ratolí G93A, van poder comprovar com la suplementació dietètica amb DHA allargava la supervivència d'aquest ratolí, prevenia la pèrdua de pes i millorava la funció motora, suggerint un efecte neuroprotector d'aquest àcid gras (Torres et al., 2020).

Els PUFA, és a dir, els precursors del DHA, molt sovint es denominen nutrients condicionalment essencials, això significa que, independentment de com l'organisme sigui capaç de produir-los, aquesta producció endògena no és suficient per satisfer la demanda i per tant les biomolècules de PUFA s'han d'obtenir de través de la dieta. Es suposa que la producció endògena serveix com un mecanisme de compensació que ajuda als organismes a mantenir l'homeòstasi en condicions ambientals de poca disponibilitat de PUFA (Bláhová et al., 2020).

Així doncs, alteracions en el gen FADS2 contribuiran de manera directa en la síntesi de DHA. Degut al coneixement que es té sobre la disminució dels nivells d'aquest àcid gras, podria ser que la funció d'aquest gen estigui sent alterada en la malaltia, contribuint doncs en la patogènesi.

### **1.8.3.3. PKC $\beta$ II**

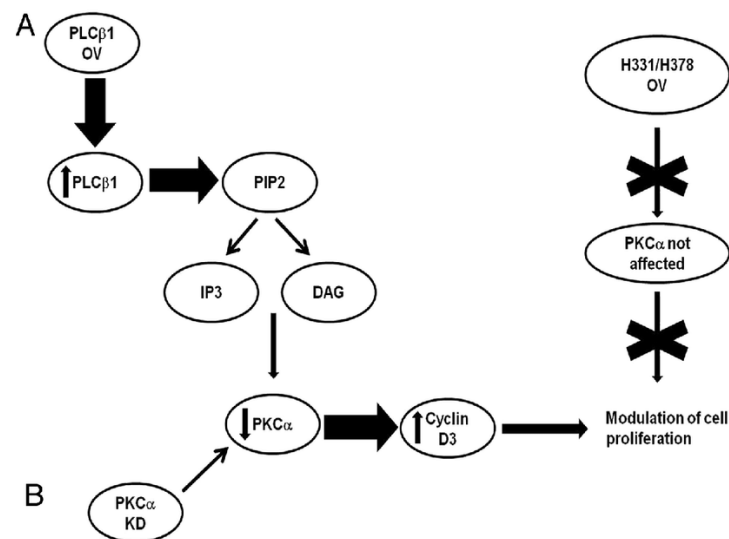
La proteïna quinasa C (PKC) és una família de proteïnes quinases que inclou 8 isoformes: PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, PKC $\gamma$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\theta$  y PKC $\eta$  i controlen l'activitat de proteïnes mitjançant la fosforilació dels seus residus serina/treonina (Lei et al., 2022). Tradicionalment, les PKC s'han descrit com enzims sensibles a lípids que s'activen per receptors de factors de creixement. A la Figura 12 es mostra les diferents vies en la que està



### 1.8.3.4. PLC $\beta$ 1

PLC $\beta$ 1 és un membre de la família de proteïnes de les fosfolipases. Les fosfolipases són un grup d'enzims que hidrolitzen els fosfolípids en àcids grassos i altres molècules lipofíliques. Hi ha quatre classes principals: fosfolipasa A, fosfolipasa B, fosfolipasa C i fosfolipasa D (Liang et al., 2021).

La seva funció principal és catalitzar la síntesi de IP3 i DAG a partir de PIP2 (Ngoh et al., 2014; Spyridakis et al., 2010). A la Figura 13 es mostra la via en la que està implicat PLC $\beta$ 1. IP3 és un missatger intracel·lular soluble important en la regulació de la proliferació cel·lular (TAYLOR & RICHARDSON, 1993). Per altra banda, DAG és un component bàsic de les membranes cel·lulars, un intermediari en el metabolisme dels lípids i un element clau en la senyalització mitjançada per lípids. La generació i/o el consum deficient d'aquests, tenen efectes greus en el desenvolupament d'òrgans i en el creixement cel·lular (Carrasco & Mérida, 2007) i per això mutacions en aquest gen s'han associat a diferents tipus de càncer (Human et al., 1995; Sengelaub et al., 2016).



**Figura 13. Diagrama de la via en la que participa PLC $\beta$ 1.** PLC $\beta$ 1 és una fosfolipasa encarregada de catalitzar la formació de inositol trifosfat i diacilglicerol a partir de fosfatidilinositol bifosfat (Poli et al., 2013).

Gràcies a la informació que es té sobre aquesta proteïna es sap que està associada amb diverses malalties, com l'esquizofrènia (Poduri et al., 2012), l'encefalopatia epilèptica (McTague et al., 2013) i la distròfia miotònica (Faenza et al., 2012). A més a més, degut a la

seva importància com a intermediari en el metabolisme dels lípids també es troba involucrada en diferents malalties on aquest procés es troba alterat.

#### **1.8.4. Alteració en proteïnes peroxisomals**

Els peroxisomes són uns compartiments en forma de sac dins de les cèl·lules amb múltiples funcions, entre elles la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos, la biosíntesi de fosfolípids d'èter i el metabolisme de les ROS (Delille et al., 2006). Degut a les importants funcions que desenvolupen i que totes elles poden estar alterades en l'ELA, s'han volgut analitzar diferents proteïnes presents en aquests orgànuls.

##### **1.8.4.1. AGPS**

El gen alquilglicerona fosfat sintasa (AGPS) codifica per un enzim que es troba als peroxisomes i és el responsable d'un pas crític en la producció d'unes molècules lipídiques anomenades plasmalògens (Stazi et al., 2019). Aquestes molècules es troben en les membranes cel·lulars de tot el cos. També són abundants en la mielina. Els plasmalògens són importants ja que ajuden a protegir les cèl·lules de l'estrès oxidatiu quan s'acumulen radicals lliures, o també perquè ajuden a les interaccions entre lípids i proteïnes, amb la transmissió de senyals químiques entre les cèl·lules i amb la fusió de membranes cel·lulars (Braverman & Moser, 2012).

Mutacions en el gen AGPS s'han associat a una malaltia hereditària, la condroplàsia punctata rizomèlica (RCDP). És un trastorn peroxisomal autosòmic recessiu que intervé en el desenvolupament normal de moltes parts del cos. Els pacients amb aquesta malaltia tenen moltes anomalies esquelètiques i també discapacitat intel·lectual (Phadke et al., 2010; Stoll et al., 1989). A més a més, degut a la funció que desenvolupa AGPS, tenen deficiències en els nivells de plasmalògens (Duker et al., 2017).

Pel que fa a l'ELA, s'han identificat alteracions en els nivells de plasmalògens en fibroblasts de pacients amb la malaltia (Veyrat-Durebex et al., 2019). Per aquest motiu, AGPS podria estar jugant un paper important en la malaltia i mutacions en aquest gen podrien estar contribuint en les alteracions dels nivells de plasmalògens.

### 1.8.4.2. PMP70

La proteïna de membrana peroxisomal (PMP70) de 70kDa de massa molecular, és la proteïna codificada pel gen ABCD3 que va ser el primer transportador ABC peroxisomal que es va identificar i a més és la proteïna peroxisomal més abundant (Imanaka et al., 1999; Kamijo et al., 1990). Els transportadors ABC són una superfamília de proteïnes unides a la membrana on la seva estructura i funció han estat molt conservades al llarg de l'evolució.

PMP70 participa en el transport de diversos lípids a través de la membrana peroxisomal (Braiterman et al., 1998). ABCD3, a diferència de la resta de gens de la família ABC, mostra especificitat de substrat més àmplia ja que està involucrat en el transport d'àcids grassos de cadena llarga, però també en el transport d'àcids dicarboxílics, àcids grassos de cadena ramificada i alguns intermediaris d'àcids biliars (Van Roermund et al., 2014). En alguns estudis s'ha pogut demostrar que ratolins *knock-out* per ABCD3 presentaven una acumulació de intermediaris d'aquests àcids biliars (Ferdinandusse et al., 2015). A més, estudis més recents també han demostrat que es necessita ABCD3 pel transport d'àcids grassos de cadena mitja a través de la membrana peroxisomal (Violante et al., 2019).

En un estudi van observar una disminució de PMP70 en les neurones motores de ratolins G93A i a més, aquesta disminució era dependent de l'edat, suggerint que els peroxisomes es troben sota una situació d'estrès crònic (H. S. Ilieva et al., 2003).

### 1.8.5. Formació de grànuls d'estrès

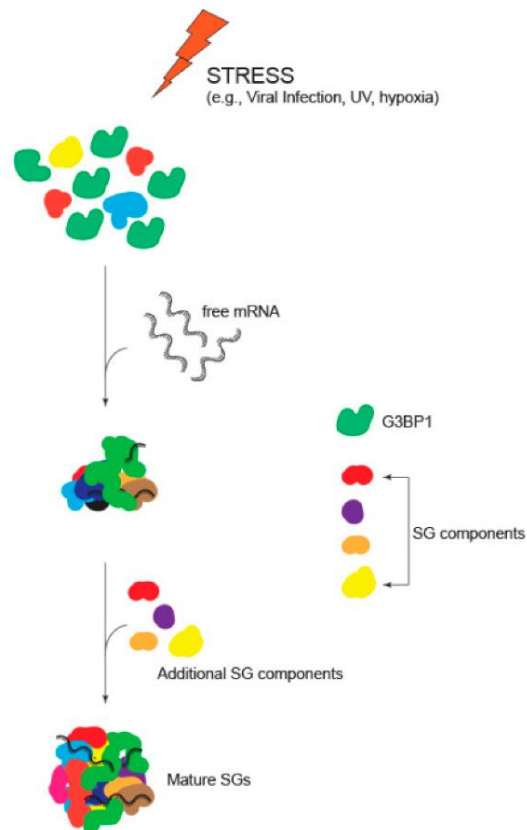
La condensació biomolecular és una estratègia vital de l'organització cel·lular que regula una gran varietat de funcions biològiques (Banani et al., 2017). Una d'aquestes funcions és la regulació del metabolisme de l'ARN, que es produeix en grànul de RNP (Buchan, 2014; Gomes & Shorter, 2019). Els grànuls de RNP són assemblatges dinàmics d'ARN i proteïnes que es troben tant en el nucli (per exemple: nuclèols, cossos de Cajal) com en el citoplasma (per exemple: grànuls d'estrès). Cada tipus de grànul RNP té una identitat diferent definida per la seva estructura i les seves propietats com la viscositat o l'elasticitat, i també segons la seva localització subcel·lular i les seves funcions (P. Yang et al., 2020).

Els grànuls de RNP es formen per separació de fases líquid-líquid, que succeeix quan els ARN carregats de proteïnes dispersos pel citoplasma o nucleoplasma s'uneixen a un estat concentrat (fase condensada). En aquesta fase, els ARN altament conservats i les proteïnes d'unió a l'ARN es comporten com un sol orgànul amb propietats similars a les d'un líquid (Buchan et al., 2013).

La dinàmica deteriorada dels grànuls de RNP est troba implicada en certes condicions patològiques i en certes situacions d'estrès, on es troben per tant, incloses les malalties neurodegeneratives (Mathieu et al., 2020). Un tipus important de grànul RNP, com s'ha comentat anteriorment, són els grànuls d'estrès, compartiments cel·lulars sense membrana que es formen en resposta a una gran varietat de factors estressants (Ivanov et al., 2019). L'assemblatge dels GS és crucial per la supervivència cel·lular ja que aquests grànuls estan implicats en la regulació de la traducció, l'emmagatzematge i l'estabilització d'ARNm i en la senyalització cel·lular durant l'estrès (Marcelo et al., 2021). L'assemblatge d'aquests GS es correlaciona amb la detenció del inici de la traducció, que s'acompanya amb un augment de la concentració citoplasmàtica d'ARNm sense recobriment (Panas et al., 2016). El mecanisme implicat en la formació d'aquests GS no està ben definit, tot i que es tenen coneixements de l'anàlisi proteòmic dels nuclis dels GS (Jain et al., 2016) que han permès saber part del contingut proteic d'aquests grànuls (Jain et al., 2016; Khong et al., 2017). Aquests estudis impliquen a cents de proteïnes diferents i milers d'ARN diferents com a constituents dels grànuls d'estrès, però no rebel·len el mecanisme d'assemblatge (P. Yang et al., 2020).

#### **1.8.5.1. G3BP1**

Diversos estudis han implicat a diverses RBP com a essencials per a la formació dels GS, incloent entre d'altres a G3BP1 (Kedersha et al., 2016). G3BP1 és fonamental per la formació de grànuls d'estrès, ja que funciona com un interruptor que regula la separació de fases líquid-líquid necessària per la formació d'aquests grànuls (Taylor & Cleveland, 2017). A la Figura 14 es mostra la funció de G3BP1 en la formació dels GS. Tot i així, falta informació per saber la importància relativa d'aquestes proteïnes i com es relacionen entre si per controlar l'assemblatge (P. Yang et al., 2020).



**Figura 14. G3BP1 forma part del nucli dels grànuls d'estrès.** G3BP1 durant els estímuls d'estrès participa en l'assemblatge dels grànuls d'estrès. Degut als diferents estímuls d'estrès, s'acumulen al citoplasma ARNm lliures no traduïts i proteïnes d'unió a ARNm. Aquests ARNm no traduïts s'uneixen a ribonucleoproteïnes que a la vegada s'agruparan amb la G3BP1 per formar els grànuls d'estrès (Jayabalan et al., 2023).

G3BP1 tot i contenir dominis d'unió a ARN no està clar si s'uneix directament a ARNm específics (Solomon et al., 2007). És important destacar que la fosforilació de G3BP1 en la S149 afecta tant a la seva capacitat per nuclear GS com per autoagregar-se (Tourrière et al., 2003), suggerint doncs que l'assemblatge dels grànuls mitjançat per G3BP1 és regulada per fosforilació, sent la forma fosforilada a la S149 quan s'inhibeix la formació dels GS (Kedersha et al., 2016). G3BP1 es coexpressa amb G3BP2 en la majoria de les cèl·lules com homodímers i heterodímers (Matsuki et al., 2013) interactuant amb moltes altres proteïnes, algunes de les quals presents en els GS (Solomon et al., 2007).



### 1.8.5.2. TDP-43

Tal i com s'ha explicat anteriorment, els agregats de TDP-43 representen una característica patològica de l'ELA (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Les proteinopaties per TDP-43 es refereixen a un grup de desordres neurològics caracteritzats per l'acumulació patològica de TDP-43 al citoplasma de les neurones afectades i en conseqüència es produeix una depleció nuclear de la proteïna (Neumann et al., 2006; Prasad et al., 2019).

Diferents estudis han pogut demostrar que TDP-43 regula les proteïnes encarregades de la formació dels grànuls d'estrès, entre elles, G3BP1 (Kedersha & Anderson, 2007). Aquesta regulació la pot dur a terme ja sigui a nivell de proteïna o a nivell d'ARNm. A partir de diferents anàlisis van poder observar que en models cel·lulars on estava silenciada l'ARNm de TDP-43, els nivells de la proteïna G3BP1 havien disminuït. Amb aquesta informació, van voler investigar la capacitat de les cèl·lules de formar GS marcades amb G3BP1 després d'un tractament per tal d'induir estrès oxidatiu. Van observar que aquelles cèl·lules amb TDP-43 reduït, el marcatge de G3BP1 era més difús i es reduïa el nombre de cèl·lules amb GS. A més, aquelles cèl·lules que si tenien GS, aquests eren més petits i amb menor marcatge per G3BP1 comparats amb les control. Així doncs, TDP-43 endogen es recluta als grànuls d'estrès que es consideren claus en la resposta protectora a l'estrès cel·lular. Per tant, la disminució dels nivells de TDP-43 alenteix la formació dels GS i redueix el nombre i mida d'aquests (McDonald et al., 2011).

### 1.8.6. Infeccions virals en l'ELA

Les infeccions virals han estat implicades com factors de risc en l'ELA en diferents estudis (B. Yu & Pamphlett, 2017). Els enterovirus (EV) són un grup de virus de cadena simple que generalment causen infeccions asimptomàtiques, però a vegades s'associen amb malalties greus, incloent complicacions neurològiques ja que tenen un alt tropisme pel SNC. Són causants de diferents malalties com la poliomielitís, meningitis asèptica i encefalitis (H. I. Huang & Shih, 2015; Rhoades et al., 2011).

Les evidències disponibles fins al moment suggereixen que els EV poden envair el SNC per tres mecanismes principals. El primer d'ells, per transport axonal retrògrad, infecten el nervi perifèric i així obtenen accés al SNC a través d'aquest tipus de transport (C.-S. Chen et al.,

2007; Gromeier & Wimmer, 1998). El segon d'ells, travessant la barrera hematoencefàlica (W. X. Yang et al., 1997). I el tercer, utilitzant cèl·lules immunitàries infectades pel virus, com macròfags, cèl·lules dendrítiques o limfòcits, que actuen com a portadores per transportar el virus fins al SNC (Freistadt & Eberle, 1996). Un cop dins del SNC, els EV poden tenir com a objectiu la invasió de molts tipus de cèl·lules, entre elles, les motoneurons de la medul·la espinal i tronc encefàlic. Per aquest motiu, s'han estat estudiant les infeccions virals com a factor de risc en l'ELA (Ong & Wong, 2015; Too et al., 2016).

Els àcids nucleics d'aquests EV han estat identificats en la medul·la espinal d'alguns casos d'ELAE (Giraud et al., 2001; Woodall et al., 1994). Estudis *in vitro* suggereixen que la infecció per EV a les neurones motores humanes pot tornar-se persistent (Beaulieux et al., 2005; Destombes et al., 1997). Això podria tenir un impacte significatiu per les MN donant lloc a un transport del glutamat alterat, a una disminució de l'activitat mitocondrial i a un deteriorament de la resposta davant l'estrès oxidatiu (Berger et al., 2004; Legay et al., 2003). Altres estudis van poder corroborar la presència d'aquests EV demostrant un increment de l'activitat de la transcriptasa inversa, proteïna present a aquests virus (W. D. Andrews et al., 2000; Steele et al., 2005; Viola et al., 1975).

Posteriorment, es va observar que els casos de poliomielitis crònica tenien certes semblances fenotípicament amb l'ELA, suggerint que la infecció pel poliovirus podria estar relacionada amb la patologia de l'ELA (Ravits, 2005). El receptor del poliovirus és el primer pas per la replicació del virus i una activació persistent d'aquest receptor possiblement dona lloc a una infecció crònica i que en última instància donaria lloc a l'ELA (Frisk, 2001; Pavo et al., 2000). Per altra banda, s'han reportat també diversos casos de VIH amb un fenotip semblant a l'ELA i on el tractament amb medicaments antivirals milloraven els símptomes motors (Alfahad & Nath, 2013). Un altre grup d'investigadors van poder observar que el virus d'herpes humà augmentava el risc de desenvolupar ELA (Cermelli et al., 2003).

Per tant, es pot concloure que les infeccions virals probablement representen un factor de risc ambiental en la patogènesi de l'ELA. Una de les hipòtesis podria ser que les infeccions virals agreugen la patogènesi dels factors de risc genètics que s'han heretat ja que diferents vies cel·lulars són compartides entre l'ELA i la patogènesi viral, incloent per exemple, la disfunció mitocondrial (Bellmann et al., 2019).

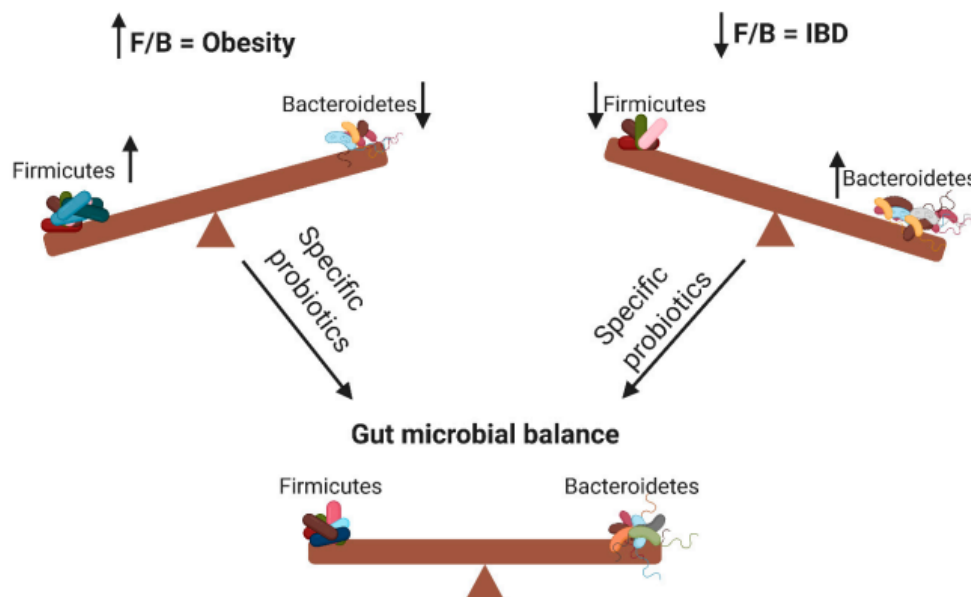
## 1.8.7. Disbiosi intestinal en l'ELA

### 1.8.7.1. Microbiota intestinal

El tracte gastrointestinal d'un humà adult és la superfície de l'organisme més densament poblada per diferents microorganismes, especialment al còlon, on poden viure d'entre 1.000 i 100.000 milions de microorganismes per cm<sup>2</sup> (Tremlett et al., 2017). Conté fins a 10<sup>14</sup> microorganismes, havent més de 1.000 espècies diferents, trobant-se dins d'aquest grup virus, bacteris, protozous, arquees i fongs, tot i així els bacteris són els que formen la gran majoria de la microbiota intestinal (Gill et al., 2006). Per tant, la microbiota intestinal és la comunitat de microorganismes vius residents al llarg del tub digestiu que viuen de forma simbiòtica amb l'organisme humà (Arumugam et al., 2011).

Les espècies de bacteris que formen part del tracte gastrointestinal es classifiquen taxonòmicament en fílums, famílies, gèneres i espècies. D'entre els fílums més predominants es troben *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Fusobacteria* (Rinninella et al., 2019). *Firmicutes* compren microorganismes gram positius amb parets cel·lulars que contenen peptidoglicans (Gibbons & Murray, 1978). És un fílum que inclou molts bacteris productors d'àcids grassos de cadena curta (Magne et al., 2020; Murugesan et al., 2018) encara que hi ha d'altres espècies que no tenen aquesta capacitat (Houtman et al., 2022). *Bacteroidetes* és un fílum bacterià amb molta diversitat d'organismes. Comprèn milers d'espècies diferents, totes elles gram negatives, algunes anaeròbiques i d'altres aeròbiques estrictes (Woese, 1987). El fílum *Firmicutes* i *Bacteroidetes* representa més del 98% del total dels fílums presents en la microbiota del tracte gastrointestinal humà, per aquest motiu, en diferents estudis d'anàlisi metagenòmic, es valora el rati *Firmicutes/Bacteroidetes* (Ley et al., 2006). El rati entre aquests dos fílums de bacteris s'ha associat amb un manteniment de l'homeòstasi i canvis en aquest poden estar relacionats amb diverses patologies. Per exemple, l'augment d'aquest rati per un augment de certes espècies de *Firmicutes* i disminució de *Bacteroidetes* s'ha vist en obesitat, mentre que una disminució del rati per una disminució de *Firmicutes* i un augment

de *Bacteroidetes* s'ha associat a inflamació (Abenavoli et al., 2019; Shen et al., 2018). A la Figura 15 es mostra les malalties associades als canvis en el rati *Firmicutes/Bacteroidetes*.



**Figura 15. Associació de les alteracions en el rati Firmicutes/Bacteroidetes amb diferents malalties.** Els canvis en el rati Firmicutes/Bacteroidetes poden estar associats amb l'obesitat o la inflamació. Específics probiòtics (microorganismes vius que al ser administrats proporcionen beneficis per la salut) poden restaurar el balanç influenciant en aquest rati (Stojanov et al., 2020).

*Proteobacteria* és un dels altres fílums més prevalent en el tracte gastrointestinal. Els bacteris que en formen part són molt diversos i una característica comuna que tenen tots és la presència de lipopolisacàrids a la membrana externa (Stackebrandt et al., 1988). Molts patògens humans ben coneguts formen part d'aquest fílum, com *Helicobacter* o *Escherichia* (Rizzatti et al., 2017). A més de trobar-se a l'intestí també es troben a la pell, cavitat oral i llengua (Human Microbiome Project Consortium, 2012). *Actinobacteria* és una de les unitats taxonòmiques en quan a fílum més grans (Barka et al., 2016). Els bacteris que en formen part són gram positius, la majoria aeròbiques, tot i que hi ha excepcions, i poden utilitzar una àmplia varietat de fonts nutricionals, incloent diversos polisacàrids complexos (Lechevalier & Lechevalier, 1965). Per últim, el fílum *Fusobacteria* està format per una gran varietat de bacteris gram negatius, anaeròbics i oportunistes, els quals se'ls ha implicat amb diferents malalties, com el càncer colorectal (Umaña et al., 2019).

A nivell de família d'entre les més predominants es troba *Bacteroidaceae* i *Ruminococcaceae* entre d'altres (Rinninella et al., 2019). *Bacteroidaceae* són els patògens anaeròbics més

comunament aïllats en humans, la gran majoria productors d'àcid acètic i alguns d'ells patògens (Chaudhry et al., 1999). *Ruminococcaceae* és una família de bacteris estrictament anaeròbiques que estan presents en la mucosa del còlon d'individus sans (De Weirdt & Van De Wiele, 2015). Alteracions en la seva abundància s'han relacionat amb diverses malalties (Xiaoqiong Gu et al., 2022) ja que *Ruminococcaceae* juga un paper important en el manteniment de la salut intestinal a partir de la seva capacitat de produir àcid butíric i altres àcids grassos de cadena curta (J. M. W. Wong et al., 2006).

A nivell de gènere d'entre els més predominants es troben *Bacteroides*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Veillonella* i *Butyrivibrio* (Rinninella et al., 2019). *Bacteroides* és un dels gèneres que es troba dins del filum *Bacteroidetes*, són gram negatives anaeròbiques i amb forma de bacil. Constitueixen un dels principals components de la microbiota intestinal, vaginal i bucal dels mamífers. Processen molècules complexes en d'altres de més simples (Karlsson et al., 2011). *Prevotella* inclou més de 50 espècies i en el microbioma humà tenen un paper molt important per mantenir una bona salut. Factors com la dieta, l'estil de vida o geografia poden afectar a la prevalença d'aquests (Tett et al., 2021). *Clostridium* representa un gènere de bacteris anaeròbics que formen part del filum *Firmicutes*. La majoria són gram positius i s'inclouen importants patògens humans, causants de malalties potencialment mortals com el tètanus i el botulisme (Cruz-Morales et al., 2019). *Veillonella* consisteix en un grup de bacteris anaeròbics i gram negatius (Delwiche et al., 1985). Són abundants en la microbiota intestinal humana però també en l'oral, en la respiratòria i la genitourinària. La seva importància en les infeccions humanes és incerta però es creu que són de baixa virulència (Vesth et al., 2013). *Butyrivibrio* està format per bacteris anaeròbics i gram negatius que codifiquen per una gran varietat d'enzims que utilitzen la glucosa per produir grans quantitats d'àcid butíric (Bryant & Small, 1956; Seshadri et al., 2018).

Per últim, a nivell d'espècie se'n poden trobar milers de diferents al llarg del tracte gastrointestinal humà, algunes d'elles són: *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* i *Blautia wexlerae*. *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* és similar a d'altres espècies de *Butyrivibrio*, anaeròbics i gram negatius, amb la capacitat de metabolitzar una gran quantitat de carbohidrats per produir butirac (Kopečný et al., 2003; Pidcock et al., 2021). *Blautia Wexlerae* és una espècie de bacteri anaeròbic i gram positiva que es correlaciona

inversament amb l'obesitat i la diabetis mellitus tipus 2. S'ha demostrat que la seva administració té efectes antiinflamatoris que disminueixen l'obesitat gràcies al metabolisme dels carbohidrats i una modificació simultània de la composició bacteriana intestinal (Hosomi et al., 2022).

Tot i així, la composició de la microbiota varia entre els diferents individus de la població (S. Gu et al., 2013). S'ha demostrat que els canvis també ocorren amb l'edat, amb un alt grau de variabilitat en els extrems de la infància i vellesa i més estable en l'edat adulta. L'envelliment s'ha associat amb una disminució de la diversitat dels microorganismes presents en la microbiota (Saraswati & Sitaraman, 2015). Els factors ambientals com ara el clima o els diferents tipus de dieta poden influir també en la composició bacteriana (Maurice et al., 2015).

La microbiota, que s'ha de mantenir sota control, millora les capacitats metabòliques de l'hoste hidrolitzant polisacàrids complexos mal digerits pel sistema digestiu humà produint àcids grassos de cadena curta. També és la responsable de la producció d'alguns aminoàcids i vitamines essencials (Hooper et al., 2002). Altres beneficis proporcionats per la microbiota intestinal estan involucrats en el desenvolupament i manteniment de l'homeòstasi del SNC a partir de vies circulatòries, immunitàries i neuronals (Tremlett et al., 2017). Per altra banda, evita també que altres microorganismes patògens envaeixin l'intestí ja que la microbiota forma una barrera que protegeix la paret intestinal fent-la més impermeable (Round & Mazmanian, 2009).

A causa de la important funció reguladora en moltes funcions fisiològiques que exerceix la microbiota, s'ha demostrat que alteracions en ella estan associades al desenvolupament de malalties cròniques i també de malalties neurodegeneratives (Saraswati & Sitaraman, 2015). Algunes de les malalties neurodegeneratives, malgrat poden estar associades a diferents factors com poden ser els traumatismes, toxines, malformacions del cervell o l'edat, estudis més recents demostren que l'homeòstasi intestinal i la microbiota tenen un paper essencial en el desenvolupament i progressió d'algunes d'aquestes malalties com pot ser l'ELA, el Parkinson i la malaltia d'Alzheimer (Hsiao et al., 2013).

Així doncs, amb tot això, la microbiota té un paper molt important en moltes funcions metabòliques, incloent la modulació de la glucosa i l'homeòstasi lipídica (Pascale et al.,

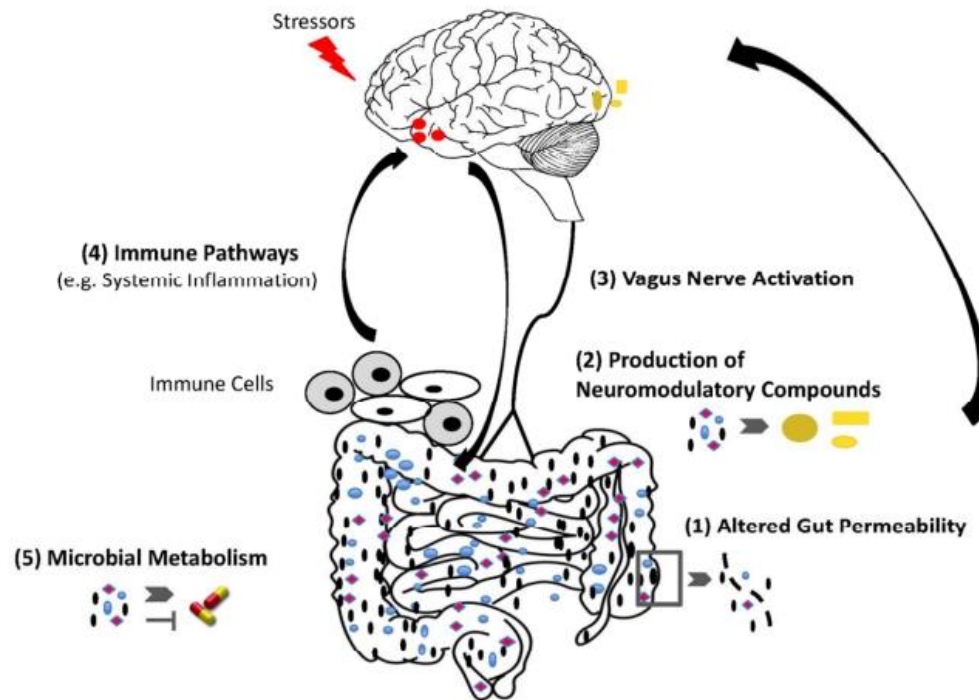
2018). Per aquest motiu, en aquest treball s'ha pogut analitzar en l'ELA l'homeòstasi lipídica *in vivo* en models de ratolí, *in vitro* en les motoneurons derivades de pacients i per últim en mostres de femta de pacients.

### 1.8.7.2. L'eix intestí-cervell

El intestí es considera el “segon cervell” ja que conté aproximadament el mateix nombre de neurones que la medul·la espinal (Wu et al., 2015a). Estudis recents suggereixen que la microbiota entèrica té un impacte en la funció del cervell i per tant, podria estar relacionada amb la fisiopatologia d'algunes malalties neurodegeneratives (Gill et al., 2006).

Els microorganismes intestinals tenen la capacitat de comunicar-se amb el cervell. S'ha descrit que la microbiota interactua amb l'hoste per formar relacions essencials que regulen l'homeòstasi. Per aquest motiu, una disminució dels microorganismes gastrointestinals condueixen a un deteriorament de les relacions entre els diferents sistemes (J F Cryan & O'Mahony, 2011).

Degut a les evidències descrites de la capacitat de la microbiota intestinal per comunicar-se amb el cervell, recentment ha emergit el terme d'eix intestí-cervell, de l'anglès *gut-brain axis*. Aquest concepte involucra la comunicació neuronal bidireccional entre el SNC (cervell) i el sistema nerviós entèric (tracte gastrointestinal) a través del nervi vague. A la Figura 16 es mostra una representació de la comunicació entre el cervell i el tracte gastrointestinal. Aquesta senyalització és essencial per mantenir l'homeòstasi. Aquest eix és regulat a diferents nivells: la microbiota intestinal, SNC i entèric, sistema neuroendocrí, sistema neuroimmunològic i parts del sistema nerviós simpàtic i parasimpàtic del sistema nerviós autònom. L'alteració de qualsevol d'aquests sistemes resultaran en alteracions en la comunicació entre el SNC i el sistema nerviós entèric, jugant un paper en el desenvolupament de diferents malalties (J F Cryan & O'Mahony, 2011).



**Figura 16. Interacció entre el cervell i el intestí.** Comunicació neuronal bidireccional entre el cervell i el tracte gastrointestinal a través del nervi vague. La microbiota intestinal modula l'homeòstasi del SNC a partir del sistema immunitari, circulatori i per vies neuronals (Tremlett et al., 2017).

### 1.8.7.3. Microbiota i ELA

Com s'ha comentat anteriorment, l'ELA és una malaltia multifactorial i diferents factors de risc, com els factors ambientals, poden jugar un paper important en el desenvolupament de la malaltia. Curiosament, tots aquests factors ambientals podrien afectar potencialment a la microbiota intestinal i a les seves funcions. Per tant, el microbioma intestinal podria representar una important contribució en la neurodegeneració (Boddy et al., 2021).

Pel que fa als estudis en ratolins, el primer estudi al 2015 va identificar danys específics de la malaltia a les unions estretes intestinals, un augment de la permeabilitat intestinal i nivells reduïts del bacteri productor de butirac, *Butyrivibrio fibrisolvens*. El butirac està implicat en la modulació de la resposta immunitària, per tant, aquests ratolins tindran afectacions en ella (Wu et al., 2015b). Al 2017, el mateix grup va realitzar un estudi amb una intervenció amb butirac per tal de tractar els símptomes que produeix la disminució d'aquest àcid gras. Els ratolins que van rebre butirac van mostrar una millora a nivell de barrera intestinal i tant la pèrdua de pes, com en última instància, la mort, es produïa més tard en el



temps comparat amb aquells ratolins que no van ser suplementats amb butirat (Y.-G. Zhang et al., 2017). Al 2021 es va realitzar un altre estudi en el que van tractar 10 ratolins G93A amb butirat al 2% en aigua als 63 dies d'edat. Els ratolins tractats presentaven un pes corporal més elevat en comparació als no tractats. A més, presentaven una latència més llarga en caure del *rotarod* (test de coordinació motora) i una reducció dels agregats de SOD1. També van analitzar el paper del microbioma, a partir de la seva manipulació, administrant dos antibiòtics, Metronidazol i Clindamycin. De la mateixa forma, van observar també que la pèrdua de pes era menor en els ratolins tractats amb antibiòtics i tardaven més temps en caure del *rotarod* (Y. Zhang et al., 2021).

Al 2019 es va realitzar el primer estudi (Blacher et al., 2019) tant en ratolins com en pacients, que va investigar el paper del microbioma intestinal en l'ELA utilitzant seqüenciació de escopeta (*shotgun sequencing*) que consisteix en determinar la seqüència d'ADN del genoma d'un organisme dividint aleatòriament el genoma en petits fragments d'ADN que es seqüencien individualment (Green, 2023). Aquest estudi va identificar canvis en el microbioma intestinal que es correlacionen amb l'activitat biològica d'un metabòlit microbià, la nicotinamida. Aquest, possiblement modula l'expressió de gens mitocondrials en la medul·la espinal. En particular, els canvis detectats es van correlacionar amb la gravetat de la malaltia tant en ratolins transgènics com en pacients humans (Blacher et al., 2019).

Els estudis més recents en models ratolins de SOD1 i C9orf72 han demostrat un paper modificador de la microbiota intestinal en l'ELA, on la gravetat de la malaltia es correlaciona amb comunitats particulars de bacteris intestinals (Blacher et al., 2019; Burberry et al., 2020). A més a més de modificar el risc de desenvolupar ELA, també és possible que la microbiota d'un pacient pugui jugar un paper dual, oferint efectes protectors o per contra, efectes nocius, ja sigui alentint o accelerant la progressió de la malaltia (Boddy et al., 2021).

Pel que fa als estudis en humans encara no està del tot clar el paper de la microbiota intestinal ja que dos estudis van identificar una proporció reduïda de *Firmicutes/Bacteroidetes* (X. Fang et al., 2016; Rowin et al., 2017) mentre que un tercer estudi va informar de totalment el contrari (Zhai et al., 2019). Tot i les contradiccions d'aquests tres estudis en quant al rati *Firmicutes/Bacteroidetes*, tots ells van detectar una

disbiosi en la malaltia, tot i que van utilitzar una cohort petita de pacients i un d'ells (Rowin et al., 2017) es va limitar a l'estudi en pacients que tenien símptomes gastrointestinals.

En l'estudi més gran fins al moment, es van comparar 50 pacients d'ELA i 50 controls coincidents per edat i per sexe. Van observar que l'abundància de diversos gèneres microbians estava alterada significativament en l'ELA en comparació amb els controls i que la progressió de la malaltia coincidia amb una reducció de la diversitat microbiana, possiblement secundària a canvis en la dieta per la disfàgia. Això també posa de manifest la importància d'un seguiment de la dieta en el disseny de l'estudi, sent una de les limitacions d'aquests treballs (Di Gioia et al., 2020).

Per altra banda, els antibiòtics modifiquen significativament l'equilibri de les espècies microbianes intestinals, sent interessants les correlacions entre l'ús d'antibiòtics i malalties aparentment no relacionades (Willing et al., 2011). Un estudi al 2019 va demostrar que l'ús d'antibiòtics, especialment de forma reiterada, s'associava a un major risc de desenvolupar ELA (J. Sun et al., 2019). De la mateixa manera, els experiments amb el model de ratolí G93A van demostrar que l'exposició repetida als antibiòtics s'associava amb el desenvolupament d'un fenotip motor més sever i l'augment de la pèrdua neuronal. Aquest efecte era específic dels ratolins malalts i no es va observar cap efecte motor en els ratolins no transgènics (Blacher et al., 2019).

#### **1.8.7.4. Àcids grassos de cadena curta**

Els àcids grassos de cadena curta (AGCC) són àcids grassos de 2 a 6 àtoms de carboni amb una cadena alifàtica. Representen el grup més gran de nutrients metabòlics, obtinguts principalment al còlon, a partir de la fermentació de carbohidrats difícils de degradar durant la digestió humana. Són produïts a partir d'una gran varietat de microorganismes residents al llarg de l'intestí humà, és a dir, a partir de la microbiota intestinal (Torii et al., 2010).

La fermentació és la principal font de producció dels AGCC tot i que també es poden produir per la descomposició de proteïnes i aminoàcids (Primec et al., 2017). Un cop produïts aquests AGCC, són absorbits per les cèl·lules de la mucosa intestinal, es metabolitzen i s'utilitzen com a font d'energia sobretot pel fetge i pel múscul (Torii et al., 2010).

Tot i així, aquest tipus d'àcids grassos no solament serveixen com a font d'energia, sinó que hi ha evidències sobre la seva importància en mantenir l'homeòstasi. Es poden trobar involucrats en promoure l'absorció d'aigua i minerals incloent el calci, magnesi i ferro, i també inhibint la síntesi de colesterol (Torii et al., 2010).

El 95% dels AGCC estan representats per l'àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric, amb un rati molecular de 60:20:20 respectivament, el qual es manté relativament constant al còlon i també en la femta. A la Figura 17 es mostra la via de fermentació de l'àcid acètic, l'àcid propiònic i l'àcid butíric. Tot i així, el tipus i els nivells dels AGCC depèn de la quantitat de substrat disponible per la microbiota. Per tant, la gran diversitat de microorganismes entre els diferents individus i la diferent alimentació, influeix en les proporcions d'aquests AGCC (Primec et al., 2017). Recentment, s'ha destacat que els AGCC, en concret aquests tres, afecten no solament als processos que es duen a terme a la llum del tracte gastrointestinal, sinó que també a altres sistemes i òrgans com el circulatori o el nerviós, a través de mecanismes associats com la barrera intestinal i el metabolisme dels carbohidrats (Chambers et al., 2018).

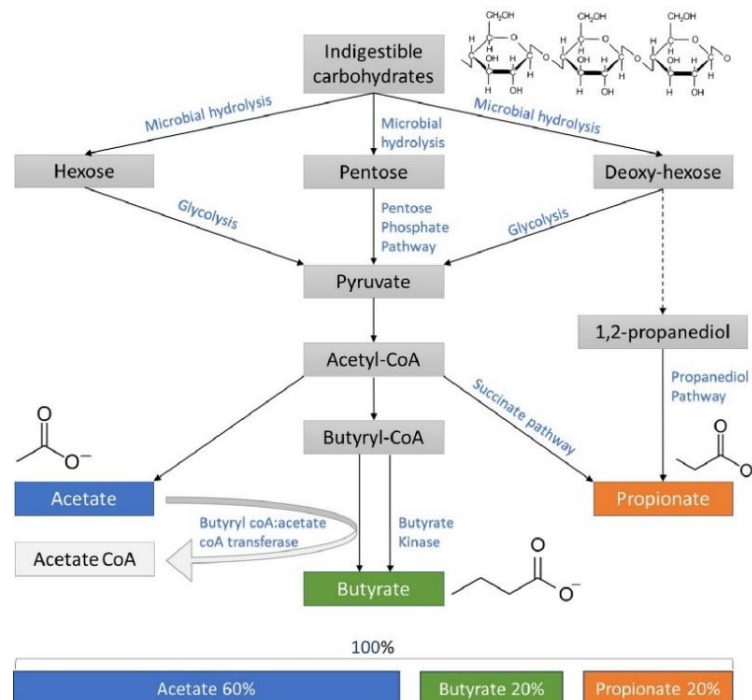
L'àcid acètic, format per la fermentació bacteriana, entra al corrent sanguini i arriba al fetge per la vena porta, on es converteix en acetil coenzim A que s'utilitza com a font d'energia i com a substrat per a la síntesi d'àcids grassos de cadena llarga i colesterol (Bloemen et al., 2009). Entre el 50-70% de l'àcid acètic derivat del còlon arriba al fetge mentre que entre el 30-40% restant s'allibera a la circulació i està disponible per al seu ús pels teixits no hepàtics (Stipanuk, 2018). En models de ratolins s'ha demostrat el seu potencial terapèutic per a la prevenció i/o gestió dels trastorns del metabolisme de la glucosa i lípids. Una ingesta sostinguda d'àcid acètic (trobat sobretot al vinagre) pot tenir diversos efectes positius pel metabolisme ja que disminueix la producció de glucosa hepàtica mentre augmenta l'oxidació lipídica hepàtica (Yamashita et al., 2014). A més a més, millora la funció de les cèl·lules  $\beta$  donant com a resultat un augment de la secreció de la insulina (Xuemei Gu et al., 2012), un augment de l'ús de glucosa hepàtica i muscular esquelètica (Fushimi et al., 2001), una reducció de pes i una millora del perfil lipídic (Beh et al., 2017; X. Li et al., 2013).

L'àcid propiònic es produeix al còlon per la fermentació de polisacàrids, oligosacàrids, proteïnes i àcids grassos de cadena llarga per la via anaeròbica tot i que en termes quantitativs, la principal font de producció ve dels carbohidrats no digerits com la fibra

dietètica i el midó resistent (Macfarlane & Macfarlane, 2003). Aquests substrats són fermentats per la microbiota a través de diferents vies sent el piruvat el principal metabòlit d'aquestes reaccions. Tot i així, es troba molt poc piruvat al còlon ja que aquest és convertit a diferents productes finals, un d'ells l'àcid propiònic (Al-Lahham et al., 2010). El 90% de la quantitat de l'àcid propiònic és metabolitzat pel fetge i la resta transportat a la sang perifèrica (J. M. W. Wong et al., 2006). Diferents estudis van demostrar en models animals que les dietes suplementades amb àcid propiònic tenen efectes hipocolesterolèmics (W. ju L. Chen et al., 1984; THACKER et al., 1981), mentre que en humans els resultats sobre els nivells de colesterol no van ser del tot concloents (J. M. W. Wong et al., 2006). Recentment, s'ha anat acumulant evidència que l'àcid propiònic té efectes reductors sobre els àcids grassos. En models animals, es va observar que disminuïa la producció d'àcids grassos en el fetge (Demigné et al., 1995) igual que en els estudis en humans (H. Ge et al., 2008; Hong et al., 2005).

Per últim, l'àcid butíric, present a la llum del tracte gastrointestinal, és indispensable pel manteniment de l'homeòstasi normal de les cèl·lules de la mucosa. Regula el seu metabolisme i la proliferació i és responsable dels processos de regeneració i reparació. Per altra banda, estimula la resposta cel·lular, manté la integritat de la barrera intestinal i inhibeix la proliferació de les cèl·lules tumorals (Hague et al., 1996; Kuczyńska et al., 2011). També té un efecte favorable sobre el microbioma intestinal (Tan et al., 2014) ja que estimula el creixement de la flora sapròfita per un efecte inhibitori del creixement d'altres patògens, com *Escherichia coli*, *Campylobacter* o *Salmonella* (Roediger, 1980). S'utilitza cada vegada més pel tractament i prevenció d'algunes malalties i trastorns del tracte digestiu, com la diarrea, afeccions inflamatòries, trastorns funcionals (síndrome intestí irritable) i la disbiosi (Chambers et al., 2018). Estudis en ratolins mostren efectes antiinflamatoris beneficiosos amb el seu tractament (Goverse et al., 2017) i estudis en aus mostren una disminució dels nivells de interleuquina 6 (IL-6) i del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i un augment de l'activitat de la peroxid dismutasa i de la catalasa (W. H. Zhang et al., 2011). Pel que fa als estudis en humans, es va observar que l'administració també tenia un efecte antiinflamatori i disminuïa la producció d'àcid úric (Hamer et al., 2009). També van observar que podia tenir un efecte metabòlic favorable en pacients amb la malaltia de Crohn els quals presentaven una reemissió de les lesions i una disminució de l'activitat del factor nuclear  $\kappa$ B

(NF- $\kappa$ B) i la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Di Sabatino et al., 2005). Tots aquests resultats demostren el paper antiinflamatori que aporta el tractament amb l'àcid butíric (Banasiewicz et al., 2020).



**Figura 17. Descripció general de les vies de fermentació bacteriana per la producció d'àcids grassos de cadena curta.** A partir de la fermentació de carbohidrats difícils de digerir es produeix àcid acètic, àcid butíric i àcid propiònic a una proporció de 60:20:20 respectivament (Deleu et al., 2021).







## **HIPÒTESIS**





## 2.

# HIPÒTESIS

El manteniment de l'homeòstasi lipídica intracel·lular és fonamental per la salut i la supervivència de les cèl·lules, en particular en una cèl·lula amb les característiques morfològiques úniques com la motoneurona. Les alteracions dels sistemes d'homeòstasi dels lípids remodelen la composició del lipidoma i poden contribuir a una menor resistència a l'estrès a través d'alteracions a les membranes cel·lulars, contribuint a la mort. Per altra banda, canvis en el lipidoma també poden afectar als sistemes d'homeòstasi de proteïnes a través de fenòmens d'agregació de proteïnes. Així doncs, la hipòtesi global d'aquesta tesi és que a l'etiopatogenia de l'ELA es produeix un deteriorament del sistema d'homeòstasi dels lípids generant alteracions lipídiques membranals, associades a canvis en els sistemes d'homeòstasi de les proteïnes, finalment promovent la proteotoxicitat, contribuint ambdós mecanismes a una major susceptibilitat a la neurodegeneració. Entre els factors que poden modular aquesta susceptibilitat a la neurodegeneració hi comptarien factors ambientals com ara les infeccions víriques o paràmetres com la microbiota intestinal, que recentment s'ha determinat com un possible nou participant rellevant en el desenvolupament de la malaltia.

Aquesta hipòtesi es desglossa en un seguit de postulats:

1. Hipotetitzem que existeix una relació directa entre alteracions en l'homeòstasi lipídica membranals amb una agregació de proteïnes patològica.
2. Proposem que les pertorbacions en l'homeòstasi lipídica juntament amb situacions d'estrès cel·lular contribuïrien a la neurodegeneració de les motoneurons típiques de l'ELA.
3. Plantegem que les motoneurons davant d'una situació d'estrès respondrien de forma adaptativa modificant l'expressió de diversos gens per tal d'intentar mantenir l'homeòstasi lipídica.

4. Formulem que les alteracions en la diversitat de la microbiota intestinal, a través d'alteracions en els àcids grassos de cadena curta que produeixen, podrien contribuir a una major susceptibilitat motoneuronal en el context de l'ELA.







**OBJECTIUS**



## 3. OBJECTIUS

Per tal de contrastar la hipòtesi i els seus postulats, l'objectiu general de la tesi és avaluar els diferents mecanismes d'estrès cel·lular que contribueixen a la neurodegeneració en l'ELA, en particular a través de l'estudi de determinants moleculars del lipidoma neuronal i la resposta a estímuls relacionats amb la neurodegeneració típica de l'ELA i avaluar el microbioma dels pacients com a possible factor modificador del fenotip de la malaltia. Aquest objectiu es subdivideix en:

1. Caracteritzar la distribució subcel·lular de factors implicats en el metabolisme lipídic i estrès cel·lular en models de malaltia de neurona motora.
2. Obtenir motoneurons humanes a partir de la diferenciació de iPSC mitjançant la utilització d'un conjunt d'inhibidors i agonistes farmacològics de les vies de senyalització del factor de creixement transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Wnt, sonic hedgehog (SHH) i àcid retinoic, amb posterior maduració i manteniment d'aquestes motoneurons utilitzant l'activació del factor de creixement de fibroblasts (FGF) i altres factors neurotròfics com el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF) i el factor neurotròfic ciliar (CNTF), molècules implicades en el desenvolupament del sistema nerviós central.
3. Desenvolupar models *in vitro* de neurodegeneració per estrès cel·lular (estrès oxidatiu, estrès osmòtic i estrès per ARN forà) en les motoneurons obtingudes en l'objectiu 2 mitjançant la incubació amb peròxid d'hidrogen, sorbitol i poly-IC respectivament.
4. Determinar el perfil taxonòmic de la microbiota intestinal a partir de l'anàlisi de la seqüència 16S de l'ARNr de femta d'individus amb ELA, en relació a individus sans convivents.



5. Analitzar el perfil d'àcids grassos de cadena curta en mostres de femta d'individus amb ELA, i correlacionar-lo amb la microbiota mitjançant l'anàlisi bioinformàtic i estadístic dels resultats obtinguts en l'objectiu anterior.





The background of the page is a marbled pattern in shades of light blue and white, with some darker blue accents. The pattern is organic and resembles watercolor or stone. A thin black vertical line runs down the right side of the page, separating the marbled area from a white area on the right.

# **MATERIALS I MÈTODES**



## 4.

## MATERIALS I MÈTODES

## 4.1. Mostres de ratolí

Es va adquirir una colònia de la soca B6.Cg-Tg (SOD1\*G93A)1Gur/J (JAX stock #004435; denominada hSOD1-G93A o G93A d'ara endavant) de *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, MN, EE.UU). El genotipat es va realitzar seguint les instruccions de *The Jackson Laboratory*. Després del genotipat i del deslletament, els animals es van col·locar en un cicle de llum/fosc de 12:12h, a 22±2°C de temperatura, 50±10% de humitat relativa, en gàbies individuals (als 21 dies). Els animals van ser anestesiats pentobarbital i ketamina, 20mg/kg i 60mg/kg respectivament en PBS pel seu sacrifici. Aquest estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica i Investigació Animal de la Universitat de Lleida, d'acord amb les lleis locals i amb la directiva 2010/63/UE del Parlament Europeu. El nombre d'animals va ajustar-se al mínim per tal de complir amb les premisses de l'esmentada normativa.

Es van valorar tres edats diferents: 90 dies, 120 dies i 150 dies (aquesta última definida com etapa final, caracteritzada per paràlisi bilateral de les extremitats posteriors). A la Taula 1 es mostra la llista de ratolins utilitzats amb les edats corresponents.

**Taula 1.** Ratolins G93A i ratolins no transgènics amb les seves edats corresponents.

Ratolí	Gènere	hSOD1	Edat (dies)
F7.8	Femella	-	90
F6.3	Femella	+	90
F6.2	Femella	-	120
M29.0	Masclle	+	120
F3.5	Femella	+	120
F16.4	Femella	-	150
86	Femella	-	150
97	Masclle	-	150
M2.2	Masclle	-	150
M24.1	Masclle	-	150
M25.0	Masclle	+	150
96	Femella	+	150
F1.2	Femella	+	150
M2.1	Masclle	+	150

#### 4.1.1. Extracció de la medul·la espinal dels ratolins

Tal i com s'ha explicat anteriorment, els animals van ser anestesiats mitjançant una injecció intraperitoneal de pentobarbital i ketamina, 20mg/kg i 60mg/kg respectivament en PBS. Prèviament a la perfusió dels ratolins amb paraformaldehid (PFA) (Sigma Cat.#252549) al 4% i pH 7.4 es va passar sèrum fisiològic. Es van extreure les medul·les espinals i es van fixar mitjançant la incubació amb PFA al 4% preparat amb tampó fosfat 0.1M i pH 7.4 a durant tota la nit a 4°C. Al dia següent, es van agafar mostres crioconservades en sacarosa al 30% durant 48h. Després d'aquest temps, el teixit es va posar en un recipient cúbic (Peel-A-Way desechable Embeding Molds- S-22, Polysciences Inc., Warrington, PA) i incrustat en medi de congelació de teixit (Triangle Biomedical Sciences Inc., Newcastle, United Kingdom) i posteriorment congelat a -80°C. Després es va tallar la medul·la espinal lumbar a una profunditat de secció de 16µm i la secció obtinguda es va posar en un portaobjectes recobert de gelatina per tal que les seccions quedin ben adherides i no es desprenguin durant el procés d'immunotinció.

#### 4.1.2. Immunofluorescència en seccions de medul·la espinal lumbar

Les mostres de seccions de medul·la es trobaven en els portaobjectes congelats a -80°C. Es van descongelar i amb el retolador *Advanced Pap Pen* (Sigma Cat.#Z672548) es va dibuixar un cercle hidrofòbic pel costat de la mostra. Es va fer un rentat en 200-300µL de PBS (Sigma Cat.#D8537), es va deixar durant 10 minuts i es va retirar. Seguidament es van permeabilitzar les cèl·lules amb 200µL de tritó X-100 (ThermoFisher Cat.#85111) (0.1% v/v en PBS) durant 30 minuts. Passat el temps, es va procedir a fer el bloqueig amb 250µL de *Blocking Buffer* (BF) al 5% amb *normal goat serum* (NGS) (ThermoFisher Cat.#50197Z), diluït en PBS tritó 0.1%. Es va deixar 1 hora a temperatura ambient.

Es van preparar els anticossos que es necessitaven utilitzar per cada experiment. Els anticossos van ser diluïts en BF preparat anteriorment. A la Taula 2 es mostren els anticossos primaris utilitzats amb la seva dilució corresponent. Passada l'hora del bloqueig, es va retirar i es va posar 200µL de l'anticòs i es va deixar *overnight* a 4°C.

**Taula 2.** Anticossos primaris utilitzats per immunofluorescència en les seccions de medul·la espinal.

<b>Anticòs</b>	<b>Dilució</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referència</b>
SCP-2	1:100	Atlas Antibodies	HPA027135
VAPA	1:100	Abcam	ab96584
VAPB	1:100	Atlas Antibodies	HPA013144
Rab5	1:150	Abcam	ab18211
Rab7	1:150	Atlas Antibodies	HPA006964
FADS2	1:100	Abcam	ab72189
PMP70	1:100	Abcam	ab211533
AGPS	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-374201
PKC $\beta$ II	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-13149
PLC $\beta$ 1	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-5291

A l'endemà, es va procedir fent 3 rentats en PBS de 5 minuts cada un. En acabar l'últim rentat es va posar 200 $\mu$ L de l'anticòs secundari diluït en PBS durant 1 hora, en aquest pas es treballa amb la menor llum possible per evitar la pèrdua de fluorescència de l'anticòs secundari. A la Taula 3 es mostren els anticossos secundaris utilitzats amb la seva dilució corresponent.

**Taula 3.** Anticossos secundaris utilitzats per immunofluorescència en les seccions de medul·la espinal.

<b>Anticòs</b>	<b>Dilució</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referència</b>
Alexa Fluor-488 goat anti-rabbit IgG	1:800	ThermoFisher	A11008
Alexa Fluor-488 goat anti-mouse IgG	1:800	ThermoFisher	A11001
Alexa Fluor-546 goat anti-rabbit IgG	1:800	ThermoFisher	A11035



Passada l'hora, es va aspirar i es va posar 200µL de DAPI (Sigma Cat.#D9542) a una dilució 1:50 en PBS durant 10 minuts. Passat el temps, el DAPI va ser retirat i es van tornar a fer 3 rentats en PBS de 5 minuts cada un. Per finalitzar, es van preparar les mostres per tal de poder ser analitzades en el microscopi. Es van posar en medi de muntatge “*anti-fading*” (Southern Biotech Cat.#0100-0) cobertes amb el cobreobjectes (LabBox Cat.#COVN-018-200). Es van deixar a temperatura ambient durant una estona pel correcte assecat i seguidament es van guardar a 4°C coberts de la llum fins el moment de la seva observació i anàlisi.

#### 4.1.3. Western Blot en mostres de medul·la espinal

Les mostres de medul·la espinal de ratolí es trobaven congelades en nitrogen líquid. Primerament, per tal d'evitar la degradació, es van homogeneïtzar amb el tampó d'homogeneïtzació. A la Taula 4 es mostren els diferents components del tampó i les seves concentracions. Es va posar 200µL del tampó a cada mostra dins de l'ependorf.

**Taula 4.** Medi i concentracions utilitzades pel tampó d'homogeneïtzació.

Component	Casa comercial	Concentració
Tampó		800µL
- HEPES	Sigma Cat.#H3375	10mM
- KCl	Sigma Cat.#P9541	25mM
- Sucrosa	Sigma Cat.#S0389	2M
- Glicerol	Sigma Cat.#G5516	10% v/v
- EDTA	Sigma Cat.#E5134	1mM
Clorur sòdic	Sigma Cat.#16818	1mM
Ortovanadat sòdic	Sigma Cat.#S6508	1mM
BHT	ThermoFisher Cat.#S25212A	0.8µL
Còctel inhibidor de proteases	ThermoFisher Cat.#78429	8 µL

La mostra va ser triturada amb l'ajuda de l'homogeneïtzador *Ultra Turrax* (Sigma Cat.#Z404586-1EA), netejant la punta entre mostres amb aigua, després en etanol i per últim en aigua altre cop. Es va mantenir l'ependorf en gel mentrestant es tritura la mostra per evitar la degradació. Un cop triturades totes les mostres, van ser sonicades tres vegades cada mostra durant 30 segons cada vegada.

Seguidament, es va diluir la mostra en aigua. Diferents dilucions van ser provades per tal de saber quina és l'adequada. Amb plaques de 96 pous (ThermoFisher Cat.#269620) es van fer duplicats per cada mostra i es va posar 155µL d'aigua, 5µL de la mostra diluïda i 40µL de *Quick Start™ Bradford* (BIO-RAD Cat.#500-0006). Per últim, la placa va ser llegida en el lector de plaques per tal d'obtenir els valors de la concentració de proteïna de cada mostra. Es van voler carregar al gel 20µg de proteïna i fent els càlculs pertinents es va obtenir el volum a utilitzar de cada mostra. Es van preparar les mostres en nous eppendorfs amb el volum obtingut anteriorment i els volums pertinents de *Loading Buffer 4x* i 2-β-mercaptoetanol (ThermoFisher Cat.#21985023) segons la quantitat de mostres. El *Loading Buffer 4x* es va preparar amb anterioritat. A la Taula 5 es mostren els diferents components del *Loading Buffer* i les seves concentracions.

**Taula 5.** Components i concentracions utilitzades pel *Loading Buffer*.

<b>Component</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Concentració</b>
Tris-HCl	Sigma Cat.#1185-53-1	62.5mM, pH 6.8
DTT	ThermoFisher Cat.#0861	0.4M
SDS	ThermoFisher Cat.#15875308	2% (p/v)
Blau de bromofenol	Sigma Cat.#B0126	0.02% (p/v)
Glicerol	Sigma Cat.#G5516	10% (v/v)

Es van preparar els gels, el separador al 12% i l'empilador al 5%. A la Taula 6 es mostren els diferents components del gel separador i a la Taula 7 els components del gel empilador.

**Taula 6.** Components i concentracions utilitzades pel gel separador.

<b>Component gel separador</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Concentració</b>
Acrilamida 30%	Sigma Cat.#A3699	2mL
Tris 1.5M	Sigma Cat.#T1503	1.25mL, pH 8.9
SDS 10%	ThermoFisher Cat.#15875308	60µL
Persulfat d'amoni 10%	ThermoFisher Cat.#17874	40µL
Aigua		1.65mL
TEMED	ThermoFisher Cat.#17919	7.5µL

**Taula 7.** Components i concentracions utilitzades pel gel empilador.

Component gel empilador	Casa comercial	Concentració
Acrilamida 30%	Sigma Cat.#A3699	1mL
Tris 0.5M	Sigma Cat.#T1503	1.5mL, pH 6.5
SDS 10%	ThermoFisher Cat.#15875308	60µL
Persulfat d'amoni 10%	ThermoFisher Cat.#17874	40µL
Aigua		3.4mL
TEMED	ThermoFisher Cat.#17919	7.5µL

Primerament es va posar el gel separador entre els vidres afegint després 300µL d'isopropanol i es va deixar 15 minuts. Passat el temps, l'isopropanol va ser retirat i es va posar el gel empilador amb la pinta. Tant en el gel separador com en el gel empilador es va posar el TEMED a últim moment. Es van guardar els gels a 4°C i en un ambient humit fins el seu ús.

Per l'anàlisi de les mostres primerament es van escalfar a 95°C durant 3 minuts. Es van muntar gels i es van col·locar a la cubeta amb *Running Buffer* 10x (800mL aigua destil·lada, 30.3g Tris, 144.4g glicina (Sigma Cat.#67419), 10g SDS i es va afegir aigua destil·lada fins el volum d'1L). Es va carregar el volum adequat de la mostra en els pous. En el primer pou i en l'últim es va posar el marcador de pes molecular (ThermoFisher Cat.#26620). Es va posar a córrer el gel a 15mA constant per gel.

Seguidament es van activar les membranes. Per aquest pas, es van posar en metanol (Sigma Cat.#322415) durant 5 minuts a l'agitador. Passat els 5 minuts, el metanol va ser retirat i es va posar durant 3 minuts *Transfer Buffer* (200mL *Transfer*, 400mL etanol 100% i 1.4L aigua MiliQ).

A continuació es va procedir a la transferència de les proteïnes presents en el gel a la membrana prèviament activada. Per fer-ho, es va col·locar el gel prèviament retirat dels vidres junt amb la membrana en una cubeta amb el *Transfer Buffer*. Es va posar la font a 100V constants durant 1h i 30 minuts damunt l'agitador.

En noves caixetes es va posar 20mL del *Blocking Buffer* (100mL PBS, 0.3g I-Block (ThermoFisher Cat.#T2015), 100µL Tween 20 (Sigma Cat.#P9416)) i es va posar la membrana durant 1 hora a l'agitador, de forma suau. Passada aquesta hora, es va fer un rentat de 5

minuts a l'agitador amb 1x TBST amb Tween 20 0.1% (100mL 10x TBS Stock Solution, 900mL aigua MiliQ i 1mL Tween 20).

Es va dissenyar l'experiment amb els anticossos primaris que es necessitaven. Els anticossos primaris es preparen en un Falcon a la dilució (en TBST) adequada per cada anticòs. Es va deixar la membrana dins del Falcon amb l'anticòs *overnight* a 4°C girant en el rotor. A la Taula 8 es mostren els anticossos primaris utilitzats amb la seva dilució corresponent.

**Taula 8.** Anticossos primaris utilitzats per Western Blot en les mostres de medul·la espinal.

Anticòs	Dilució	Casa comercial	Referència
SCP-2	1:800	Atlas Antibodies	HPA027135
Rab5	1:700	Abcam	ab18211
Rab7	1:700	Atlas Antibodies	HPA006964
FADS2	1:700	Abcam	ab72189
PMP70	1:750	Abcam	ab211533
AGPS	1:800	Santa Cruz Biotechnology	sc-374201
PKC $\beta$ II	1:800	Santa Cruz Biotechnology	sc-13149
PLC $\beta$ 1	1:800	Santa Cruz Biotechnology	sc-5291

Per acabar, es van rebel·lar les membranes, per això es va utilitzar *Immobilon ECL Ultra Western HRP Substrate* (Merck Millipore Cat.#WBULS0500), barrejant 1:1 les dues solucions. Es van posar 3mL de la dilució preparada a sobre de la membrana durant 5 minuts. Finalment, es va tapar amb el plàstic per rebel·lar-ho al *Chemidoc MP Imaging System* (Biorad, Hercules, California, USA).

Després de rebel·lar, es va procedir a fer la tinció amb Coomassie (BioRad Cat.#1610786). Es va fer un rentat amb TBST durant 5 minuts a l'agitador, es va retirar i es va posar el Coomassie durant 5 minuts, es va tornar a retirar i es va posar el decolorant durant 5 minuts més. Es va tornar a analitzar al Chemidoc (Software Bio-Rad ImageLab).

## 4.2. Mostres humanes

### 4.2.1. iPSC

#### 4.2.1.1. Cultiu cel·lular

Les cèl·lules mare pluripotents induïdes es van obtenir de *NINDS Human Genetics DNA and Cell line Repository at Coriell Institute*. A la Taula 9 es mostren les diferents línies utilitzades amb la seva mutació corresponent.

**Taula 9.** Línies de iPSC utilitzades amb la seva mutació corresponent.

Línies	NINDS Human Genetics DNA and Cell line Repository at Coriell Institute
Línia control	Cat.#ND41866
Expansió C9orf72	Cat.#ND43208
Mutació FUS	Cat.#ND35663

Abans de procedir amb la descongelació de les iPSC, es van preparar les plaques (ThermoFisher Cat.#140675) on creixeran les cèl·lules en una capa de Geltrex (ThermoFisher Cat.#A1413201), diluint 250µL en 12mL *DMEM high glucose* (ThermoFisher Cat.#11965092). Es van repartir 2mL de Geltrex per cada pou de la placa i es va deixar un mínim de 30 minuts a l'incubador a 37°C. A la Figura 18 es mostra la representació del protocol d'obtenció de motoneurons a partir de les cèl·lules mare pluripotents induïdes.

Un cop preparada la capa, es van agafar els vials de les iPSC i van ser descongelades al bany de 37°C durant 1 minut, es van passar en un Falcon on es van afegir 3mL de medi de iPSC. A la Taula 10 es mostren els diferents components del medi i les seves concentracions. A continuació, es van centrifugar 4 minuts a 1300rpm, es va aspirar el sobrenedant i el pellet va ser resuspès amb el medi de les iPSC afegint *rock inhibitor* (Y27632 dihidrocloride) (Abcam Cat.#ab120129) a una concentració de 10µM. Es van aspirar els pous on es trobava el Geltrex i es van sembrar les cèl·lules posant 2mL per cada pou.

**Taula 10.** Medi i concentracions utilitzades pel creixement i manteniment de les iPSC.

Component/Medi	Casa comercial	Concentració
Knock out DMEM	ThermoFisher Cat.#10829018	40mL
Knock Out Serum Replacement	ThermoFisher Cat.#10828028	10mL
2-β-Mercaptoetanol	ThermoFisher Cat.#21985023	0.35μL
NEAA	FisherScientific Cat.#11350912	500μL
bFGF	ThermoFisher Cat.#PHG0264	4ng/mL
L-Glutamina	ThermoFisher Cat.#25030081	1:200
Pen/Strep	ThermoFisher Cat.#15140163	100μL

El protocol de diferenciació cap a motoneurons es va dur a terme amb una modificació del protocol de (Du et al., 2015). Els components que s'utilitzen per tal de realitzar la diferenciació són: SB431542 (inhibidor de la via de senyalització activina-nodal), DMH1 (inhibidor de la via de senyalització *bone morphogenetic protein* (BMP)), CHIR (agonista de la via de senyalització Wnt), àcid retinoic i *purmorphamine* (agonista de la via de senyalització SHH). Les modificacions que es van dur a terme, per fi d'optimitzar al màxim el mètode, afecten a les concentracions de CHIR, en el protocol original s'utilitza 1μM en tots els medis, en canvi en el nou protocol establert aquesta concentració solament es va utilitzar en un dels medis i en la resta es va emprar 3μM. Els canvis també afecten a la concentració de l'àcid retinoic, en el protocol original utilitzen 0.1μM en tots els medis mentre que en el que es presenta en aquest treball, en els dos primers medis també s'utilitza aquesta concentració, però en els dos darrers medis s'augmenta la concentració a 0.5μM. L'última modificació afecta a la concentració de *purmorphamine*, en el protocol original utilitza 0.5μM en tots els medis i en aquest treball es redueix la concentració a 0.1μM en els dos últims medis. A la Taula 11 es mostren els diferents components del medi i les seves concentracions utilitzades en aquest treball. Tots aquestes modificacions es van dur a terme al comprovar que el creixement dels progenitors i la diferenciació cap a motoneurons augmentava en el nostre laboratori.

**Taula 11.** Medis i concentracions utilitzades per la diferenciació de les motoneurons a partir de les iPSC.

<b>Component/Medi</b>	<b>NEPM</b>	<b>Medi 1r Progenitor</b>	<b>Medi 2n Progenitor</b>	<b>Medi inducció MN</b>	<b>Medi maduració</b>
DMEM/F12 (ThermoFisher Cat.#11320033)	20mL	20mL			
Neurobasal (ThermoFisher Cat.#21103049)	20mL	20mL			
Neurobasal + (ThermoFisher Cat.#A3582901)			40mL	40mL	40mL
B27+ (ThermoFisher Cat.#A3582801)	800µL	800µL	800µL	800µL	800µL
Àcid ascòrbic (FisherScientific Cat.#352685000)	0.1mM	0.1mM	0.1mM	0.1mM	0.1mM
L-Glutamina (ThermoFisher Cat.#25030081)	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
NEAA (FisherScientific Cat.#11350912)	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
CHIR (Merck Cat.#SML1046)	3µM	1µM	3µM	3µM	
SB431542 (Merck Cat.#S4317)	2µM	2µM	2µM	2µM	
DMH1 (Merck Cat.#D8946)	2µM	2µM	2µM	2µM	
Àcid retinoic (Merck Cat.#R2625)		0.1µM	0.1µM	0.5µM	0.5µM
Purmorphamine (Merck Cat.#SML0868)		0.5µM	0.5µM	0.1µM	0.1µM
Àcid valproic (FisherScientific Cat.#2815100)			0.5mM		
Compound E (StemCell Technologies Cat.#73952)					0.1µM

CNTF (Merck Cat.#C3710)					20ng/mL
IGF1 (Merck Cat.#SRP4121)					20ng/mL
Pen/Strep (ThermoFisher Cat.#15140163)	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400

A les 48 hores posteriors de sembrar les cèl·lules es va canviar el medi afegint 2mL del medi NEPM. Aquestes van estar 6 dies en cultiu, i es va anar canviant el medi cada 48h.

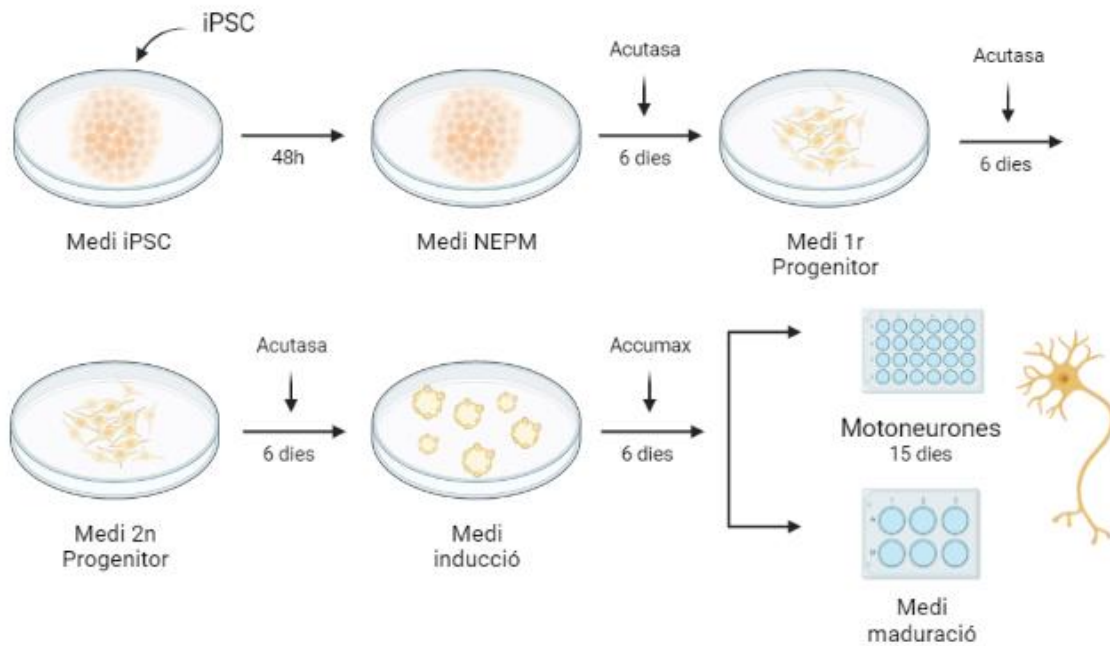
Passat els 6 dies, aquestes cèl·lules es van passar en plaques de 35mm (Corning Cat.#35300) prèviament tractades també amb Geltrex seguint la mateixa metodologia. Per passar les NEPM, es va aspirar el medi i es van afegir 500µL d'Acutasa (Sigma Cat.#A6964) i es va deixar 5min a l'incubador. Passat aquest temps, les cèl·lules van ser recollides de la placa i es van passar en un Falcon afegint 3mL de Neurobasal. Es van centrifugar 4min a 1300rpm, es va aspirar el sobrenedant i es van resuspendre les cèl·lules amb el medi 1r progenitor afegint novament *rock inhibitor*. Les cèl·lules van ser sembrades a la noves plaques (700.000-800.000 cèl·lules/placa). Aquestes, van estar un mínim de 6 dies en aquest medi, i es va anar canviant cada 48h. En aquesta etapa, es poden expandir si és necessari quan arriben a un 70% de confluència per tal de poder generar més plaques o per congelar-ne per poder guardar un *stock* d'elles.

Passats els 6 dies en 1r Progenitors, es van tornar a passar en noves plaques de la mateixa manera explicada prèviament, però en aquest cas es va afegir el medi 2n progenitor. Aquestes també van estar en cultiu un mínim de 6 dies, canviant el medi cada 48h i tenint també la possibilitat de expandir-les i congelar-les.

En acabar els 6 dies, es van induir cap a neuroesferes. Per aquest pas, es van necessitar unes altres plaques (Corning Cat.351008), en aquest cas sense fer cap tipus de capa prèvia ja que les neuroesferes creixen en suspensió i no pas adherides a la placa. Primerament, les cèl·lules es van disgregar amb Acutasa amb la metodologia anterior, i un cop recollides i centrifugades es van resuspendre amb el medi d'inducció, i en aquest cas, sense afegir *rock inhibitor*. Es van sembrar en les noves plaques i es va canviar el medi cada 72h. Al créixer en suspensió, per canviar el medi es van haver de recollir i centrifugar per afegir-ne de nou. En aquest pas, no es poden expandir ni congelar i han d'estar 6 dies en cultiu.



Ja per acabar, passat els 6 dies, aquestes neuroesferes van ser disgregades i diferenciades a motoneurons. Primerament es van preparar les plaques on es van sembrar les motoneurons, que dependrà de l'experiment que es vulgui realitzar a posterior, Western Blot (WB) o immunofluorescència (IF). Per Western Blot es van preparar plaques de 6 pous (Sigma Cat.#SIAL0516) i per la immunofluorescència plaques de 24 pous (Sigma Cat.#CLS3527). En aquestes plaques es va fer una capa amb *poly-L-lysine* (Sigma Cat.#P1274) i laminina (ThermoFisher Cat.#925-933). En la placa de 24 pous es va posar cobreobjectes de vidre (Marienfeld Cat.#0111530) per poder fer la immunofluorescència. Primerament es va posar la *poly-L-lysine* a 5x diluïda en aigua i es va deixar a l'incubador durant mínim 1h i 30 minuts seguidament es va retirar i es va posar la laminina (2.5µg/1mL de medi) dissolta en DMEM/F12 i es va deixar per un mínim de 2h. Un cop es van tenir preparades les plaques es va procedir a la disgregació de les neuroesferes amb Accumax (Chemicon Cat.#SCR006). Es van recollir les neuroesferes, es van centrifugar 4min a 1300rpm, es va aspirar el sobrenedant i es van resuspendre amb el medi de maduració, afegint *rock inhibitor* i en aquest cas també es va afegir *compound E* a 0.1µM (aquest s'afegeix únicament la primera vegada). Per acabar, les cèl·lules van ser sembrades a les plaques preparades prèviament, 30.000-40.000 cèl·lules/pou a la placa de 24 pous i  $1 \cdot 10^6$  cèl·lules/pou a la placa de 6 pous. Aquestes motoneurons es van deixar durant 15 dies, canviant el medi cada 5-6 dies, i al llarg d'aquest temps es van anar neuralitzant.



**Figura 18. Protocol d'obtenció de les motoneurons a partir de les iPSC.** Primerament es descongelen les cèl·lules mare pluripotents induïdes i es sembren en una placa amb Geltrex amb el medi per les iPSC. A les 48h es canvia el medi per medi NEPM i passats 6 dies es disgreguen amb Acutasa per passar-les en noves plaques amb Geltrex i amb medi 1r progenitor. Passats 6 dies més, es tornen a disgregar amb Acutasa, es sembren en noves plaques amb Geltrex amb medi 2n progenitor. Després de 6 dies més, es tornen a disgregar amb Acutasa i es posen en noves plaques sense Geltrex (creixen sense adherir-se) i amb medi d'inducció i es van formant les neuroesferes. Passats 6 dies es recullen, es disgreguen amb Accumax i es sembren en plaques amb medi de maduració per obtenir les motoneurons que estan en cultiu durant 15 dies (Creat amb BioRender, 2023).

#### 4.2.1.2. Tractaments d'inducció d'estrès oxidatiu, osmòtic i per ARN forà

Es van realitzar diversos estressos: estrès oxidatiu, osmòtic i per ARN forà, a les motoneurons en cultiu als 15 dies. Els compostos inductors d'estrès utilitzats van ser: peròxid d'hidrogen (Sigma Cat.#H1009), sorbitol (Sigma Cat.#240850) i poly-IC (Sigma Cat.#P1038). A la Taula 12 es mostren els reactius utilitzats, amb les dosis i temps de tractament corresponents.

**Taula 12.** Tractament d'inducció d'estrès en els cultius de motoneurones.

Tipus d'estrès	Reactiu	Dosis	Temps de tractament
Estrès oxidatiu	Peròxid d'hidrogen	1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M	4h
			24h
Estrès osmòtic	Sorbitol	0.4M	4h
Estrès per ARN forà	Poly-IC	250ng i 1000ng	4h
			24h

Per preparar els agents inductors d'estrès (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i sorbitol) es van diluir amb el medi de maduració de les motoneurones. Es va retirar el medi en el que estan i es va posar 400 $\mu$ L de la dilució. Es va deixar durant 4 hores i/o 24 hores i passat el temps, es va començar la immunofluorescència.

En el cas del poly-IC, es va necessitar lipofectamina 3000 (FisherScientific Cat.#15282465), reactiu amb alta eficiència per transfectar cèl·lules. Es van preparar les dilucions adequades amb opti-MEM (FisherScientific Cat.# 31985047), lipofectamina, p3000 i poly-IC. L'estrès també es va deixar 4 hores i/o 24 hores.

#### 4.2.1.3. Immunofluorescència en cultius de motoneurones

De les plaques de 24 pous on les cèl·lules han crescut damunt dels cobreobjectes es va procedir a fer la immunofluorescència. Es va preparar PFA a 3.7x diluït en PBS. Es van aspirar els pous i es va posar 500 $\mu$ L de PFA durant 15 minuts. Es van permeabilitzar les cèl·lules amb 500 $\mu$ L de tritó X-100 (0.1% v/v en PBS) durant 30 minuts a temperatura ambient. Al pròxim pas, es van bloquejar les cèl·lules amb BF que es va preparar amb una solució al 5% de NGS diluït en PBS tritó 0.1%. Es van aspirar els pous i es va posar 500 $\mu$ L de la solució durant 1 hora també a temperatura ambient. Es van preparar els anticossos primaris diluïts en BF. A la Taula 13 es mostren els anticossos primaris utilitzats amb la seva dilució corresponent. Passat el temps, els cobreobjectes van ser recollits de dins de la placa amb l'ajuda d'unes pinces, es va fer un rentat amb PBS per immersió i es van posar damunt alguna superfície plana recoberta amb paper de film. Es van posar 30 $\mu$ L de l'anticòs primari a cada cobreobjectes i es va deixar tota la nit a 4°C en una cambra humida.

**Taula 13.** Anticossos primaris utilitzats per immunofluorescència en els cultius de motoneurons.

Anticòs	Dilució	Casa comercial	Referència
SCP-2	1:100	Atlas Antibodies	HPA027135
Rab5	1:150	Abcam	ab18211
Rab7	1:150	Atlas Antibodies	HPA006964
FADS2	1:100	Abcam	ab72189
PMP70	1:100	Abcam	ab211533
AGPS	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-374201
PKC $\beta$ II	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-13149
PLC $\beta$ 1	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-5291
TDP-43	1:150	Proteintech	10782-2-APS
VAPA	1:100	Abcam	ab96584
VAPB	1:100	Atlas Antibodies	HPA013144
G3BP1	1:100	Antibodies	A90896

Al dia següent, es va procedir a fer un altre rentat per immersió en PBS i es va posar l'anticòs secundari a una dilució 1/800 diluït en PBS durant 1 hora a temperatura ambient i a les fosques. A la Taula 3 es mostren els anticossos secundaris utilitzats amb la seva dilució corresponent.

Passat el temps, es va fer un altre rentat i es va posar el DAPI a una dilució 1/50 durant 10 minuts. Per acabar, es va fer un nou rentat i es va procedir a fer el muntatge en els portaobjectes (LabBox Cat.#SLIB-F10-050), amb medi de muntatge i coberts pels cobreobjectes de vidre esmentats anteriorment. Es van deixar a temperatura ambient per tal que s'assequin correctament i es van guardar a 4°C cobert de la llum fins el moment del seu anàlisi.

#### 4.2.1.4. Western Blot en cultius de motoneurons

Primerament es van recollir les motoneurons de la placa que van estar en cultiu durant 15 dies. Per recollir-les de la placa, es va utilitzar 1mL de RIPA (ThermoFisher Cat.#8990) per cada pou i amb l'ajuda de la pipeta, sense disgregar-les massa per conservar la seva estructura, es van passar en un Falcon.

La quantificació de proteïnes presents en les MN es va dur a terme mitjançant *Quick Start™ Bradford*. La concentració exacta de proteïnes de la mostra es va determinar per interpolació a partir d'una corba estàndard feta mesurant l'absorbància d'una sèrie de dilucions d'estàndards de proteïnes de concentracions conegudes dins del rang de resposta. Es va utilitzar albúmina de sèrum boví (BSA) (ThermoFisher Cat.#23209) com estàndard. La concentració de la mostra es va igualar amb aigua MiliQ seguit de l'addició del *Loading Buffer* tal i com s'ha explicat anteriorment. La resta de protocol a seguir va ser el mateix que per les mostres de medul·la de ratolí. A la Taula 14 es mostren els anticossos primaris utilitzats amb la seva dilució corresponent.

**Taula 14.** Anticossos primaris utilitzats per Western Blot en els cultius de motoneurons.

Anticòs	Dilució	Casa comercial	Referència
SCP-2	1:800	Atlas Antibodies	HPA027135
Rab5	1:700	Abcam	ab18211
Rab7	1:700	Atlas Antibodies	HPA006964
AGPS	1:800	Santa Cruz Biotechnology	sc-374201
VAPB	1:1000	Atlas Antibodies	HPA013144

## 4.2.2. Mostres de femta humanes

### 4.2.2.1. Extracció de l'ADN

L'extracció de l'ADN es va realitzar amb el kit *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Quiagen Cat.#51540) d'acord amb les instruccions del fabricant. La concentració ideal d'ADN a obtenir és d'entre 20-200ng/ $\mu$ L. Per tal d'aconseguir aquesta concentració es va partir d'alíquotes congelades de la mostra de femta d'entre 180-220mg.

L'extracció es va realitzar amb mostres de femta de pacients amb ELA i controls sans. Es van utilitzar 29 mostres de femta, les quals 12 són controls i 17 són malalts d'ELA (11 espinals i 6 bulbars). Tots ells van estar més de 2 mesos sense prendre antibiòtics. A la Taula 15 es mostren les dades clíniques dels controls i pacients d'on provenen les mostres de femta.

L'estudi va ser supervisat pel comitè d'ètica de l'Hospital Universitari de Bellvitge i pel comitè d'experimentació amb medicaments (CEIM) de l'Hospital Arnau de Vilanova. Tots els

participants havien donat el seu consentiment informat per escrit i tots els mètodes es van realitzar de conformitat amb les directrius aprovades. Es van inscriure 17 pacients diagnosticats clínicament d'una ELA definitiva segons els criteris revisat d'El Escorial en el servei de neurologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge entre el juny del 2012 i març de 2017. Els usuaris que presentaven altres patologies neurològiques es van excloure. A més, els criteris d'exclusió descartaven usuaris amb malalties del tracte gastrointestinal o tractats amb fàrmacs (per exemple amb antibiòtics) que podien alterar l'equilibri nutricional i afectar a la microbiota intestinal. Es van reclutar 12 controls sans que podien ser la parella dels usuaris diagnosticats o familiars pròxims, per tal de minimitzar al màxim els efectes causats pels diferents estils de vida i dieta. La procedència dels participants procedia de diferents ciutats o pobles de Catalunya amb condicions de vida i dieta similars.

**Taula 15.** Dades clíniques dels controls i pacients d'ELA.

Mostra	Edat	Data inici	Pes (kg)	Altura (m)	IMC	Sexe	Èxitus
Control	68					H	
Control	-					H	
Control	74					H	
Control	-					D	
Control	-					D	
Control	-					D	
Control	73					D	
Control	-					H	
Control	-					-	
Control	-					D	
Control	56		51.5	1.64	19.3	-	
Control	67		57	1.67	20.44	D	
ELA espinal	71	feb-15	77.3	1.51	33.9	D	jul-16
ELA espinal	59	ag-16	54.7	1.55	22.76	D	juny-17
ELA espinal	65	oct-13	92.2	1.68	32.29	H	maig-18
ELA espinal	65	jul-13	71.1	1.7	24.6	H	-
ELA espinal	64	jul-15	53.3	1.63	20.18	D	Viu
ELA espinal	81	ag-16	64	1.48	29.22	D	Viu
ELA espinal	73	ag-14	82.6	1.72	28	H	set-17
ELA espinal	69	abr-16	-	-	-	D	set-18
ELA espinal	64	juny-15	-	-	-	H	Viu

ELA espinal	73	març-17	-	-	-	H	des-2019
ELA espinal	39	juny-12	83.85	1.7	29.01	H	jul-22
ELA bulbar	57	maig-14	69.25	1.58	27.74	D	maig-18
ELA bulbar	66	maig-15	72	1.63	22.28	D	juny-17
ELA bulbar	74	nov-14	52.15	1.53	23.6	D	jul-18
ELA bulbar	66	jul-16	71	1.64	24.76	H	gen-19
ELA bulbar	51	març-13	77.5	1.77	22.76	D	jul-19
ELA bulbar	76	ag-16	54.7	1.55	33.9	D	oct-17

Un cop es va obtenir la quantitat de femta adient, es va afegir 1.4mL de buffer ASL, present en el kit, a cada mostra (evitant la descongelació) i es va vortejar fins l'homogeneïtzació. A continuació es van deixar les mostres al bany a 70°C durant 5 minuts i en acabar es van vortejar de nou durant 15 segons. Després, les mostres es van centrifugar a màxima velocitat (14.000rpm) durant 1 minut i es va recollir 1.2mL del sobrenedant que es va depositar en un nou eppendorf de 2mL.

Seguidament es van afegir les *InhibitEX tablets* presents també en el kit. Es van afegir les pastilles directament dins de l'eppendorf evitant tocar-les amb les mans i altres instruments. A continuació, es va vortejar fins la dissolució total de les pastilles i es va deixar 1 minut a temperatura ambient. Després es va centrifugar a màxima velocitat durant 3 minuts, es va recollir el sobrenedant (aproximadament 300-400µL) i es va tornar a centrifugar 3 minuts a màxima velocitat.

En eppendorfs nous d'1mL es van afegir 15µL de proteïnasa K i es van pipetejar 200µL del sobrenedant present en l'última centrifugació i 200µL de buffer AL als eppendorfs que contenen la proteïnasa K. Seguidament es va vortejar durant 15 segons i es van incubar de nou al bany a 70°C durant 10 minuts. Passat els 10 minuts, es van afegir 200µL d'etanol i es va vortejar.

A continuació, es va depositar el lisat obtingut anteriorment (aproximadament 600µL) en una *spin column*, present també en el kit, i es va centrifugar durant 1 minut a màxima velocitat. Es va descartar el que contenia el filtrat i es va col·locar la *spin column* en un nou eppendorf de 2mL. Es va pipetejar 500µL de buffer AW1 i es va tornar a centrifugar durant 1 minut a màxima velocitat. De nou es va descartar el lisat, es va col·locar la *spin column* en un altre eppendorf de 2mL, es va pipetejar 500µL de buffer AW2 i es va centrifugar 3 minuts a màxima velocitat. Finalment es va depositar la *spin column* que conté l'ADN en un nou eppendorf d'1mL i es va pipetejar 200µL de buffer AE directament sobre la membrana. Es va

incubar durant 1 minut a temperatura ambient i per acabar es va centrifugar durant 1 minut a màxima velocitat.

El lisat final és el que conté l'ADN, que es va mesurar la seva concentració al Nanodrop a 260nm (ND-1000 UV/Vis Spectrofotometer, Nanodrop Technologies). Posteriorment es va enviar al Servei de Genòmica i Bioinformàtica de la Universitat Autònoma de Barcelona per la seva seqüenciació. A la Taula 16 es mostren les concentracions d'ADN extretes a partir de les mostres de controls i pacients d'ELA. Per acabar, es va mesurar la

**Taula 16.** Concentracions d'ADN en les mostres de femta de controls i pacients d'ELA mesurades amb el Nanodrop a una longitud d'ona de 260nm.

Mostres	Concentració ADN (ng/ $\mu$ L)
Control	25.6
Control	143.3
Control	52.7
Control	42.6
Control	22.7
Control	39.1
Control	36.2
Control	29.6
Control	24.3
Control	58.1
Control	162
Control	217.8
ELA espinal	88.1
ELA espinal	133.6
ELA espinal	45.8
ELA espinal	96.9
ELA espinal	136.8
ELA espinal	35.9
ELA espinal	25.7
ELA espinal	27.2
ELA espinal	61.9
ELA espinal	30.2
ELA espinal	20.1
ELA bulbar	34.9
ELA bulbar	38.8
ELA bulbar	25.9
ELA bulbar	148.1
ELA bulbar	91
ELA bulbar	83.7



#### 4.2.2.2. Anàlisi d'àcids grassos de cadena curta per cromatografia líquida

Els AGCC es van analitzar en mostres de femta (0.2-0.5 grams) de pacients amb ELA i controls sans per cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) seguint el protocol de (Torii et al., 2010).

Es va analitzar 12 AGCC: succínic, làctic, acètic, propiònic, crotònic, iso-butíric, butíric, 2-metilbutíric, iso-valèric, valèric, iso-caproic i caproic. Per l'anàlisi, primerament es van preparar els estàndards de cada un dels AGCC a una concentració de 200mmol/L en 50% metanol i 50% H<sub>2</sub>O (25mL metanol i 25mL H<sub>2</sub>O). Es va realitzar els càlculs pertinents per cada estàndard segons la seva densitat i pes molecular, i es va posar la quantitat correcta en un *ependorf* diluït en 1mL del metanol+H<sub>2</sub>O. Seguidament es van diluir posant 5µL de cada un en 1mL de metanol+H<sub>2</sub>O.

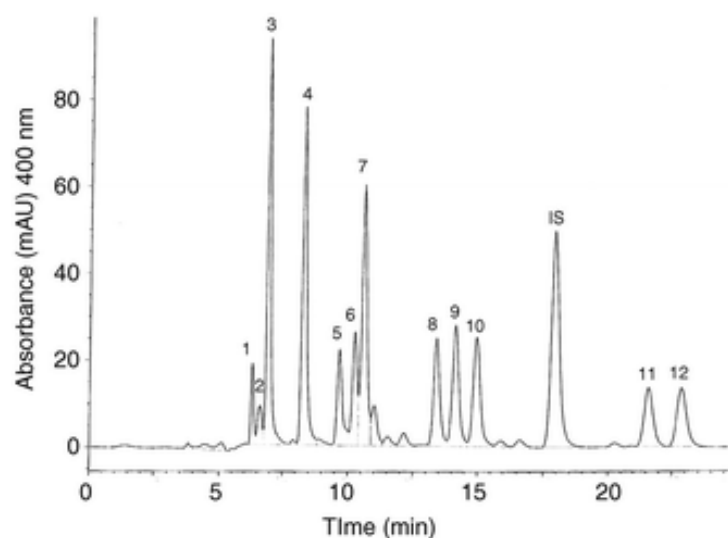
Per altra banda, es van preparar els reactius necessaris per la derivatització, els quals són: àcid fosfòric (Sigma Cat.#345245), piridina (Sigma Cat.#270970), hidròxid de potassi (KOH) (Sigma Cat.#40216), 1-EDC (Sigma Cat.#E176) i 2-NPH-HCl (Sigma Cat.#N21588) tal i com s'explica en el protocol.

Seguidament es va preparar la fase mòbil per la cromatografia líquida, formada per acetonitril (Sigma Cat.#271004), metanol (Sigma Cat.#494291) i aigua MiliQ a una proporció 0:16:54 (1 litre) respectivament. Es va ajustar el pH a 4.5 amb àcid trifluoro acètic 0.1M (Sigma Cat.#91707M). Per acabar, es va filtrar la fase mòbil per evitar col·lapsar la columna de la cromatografia líquida.

Per posar a punt el mètode primerament es va procedir a la derivatització per comprovar que tots els estàndards apareixen en el temps de retenció concret. Es van preparar 11 tubs de vidre (un per cada estàndard) i en cada un d'ells es va afegir: 150µL de l'estàndard, 150µL de piridina, 150µL de 2-NPH-HCl i 150µL de 1-EDC. Seguidament es va deixar 20 minuts al bany a 60°C i en acabar es va afegir 100µL de KOH. Es va tornar a posar durant 20 minuts a 60°C i es va deixar refredar. Un cop refredat, es va afegir 1.500µL d'àcid fosfòric i 2.000µL d'èter (Sigma Cat.#344362). Es va agitar durant 3 minuts i es va centrifugar 5 minuts a 3.000rpm.

Un cop centrifugat, es va agafar tota la fase èter (fase superior) i es va passar a un nou tub de vidre i es va afegir 2mL d'aigua. Es va tornar a agitar bé durant 3 minuts i es va centrifugar durant 5 minuts a 3.000rpm. Novament, es torna a agafar tota la fase èter i es va passar en un eppendorf i es va evaporar amb nitrogen gas. Per acabar, un cop tot evaporat, es van afegir 100µL de metanol, es va vortejar i es va passar tot el volum a un vial petit de vidre preparat per analitzar-ho al HPLC.

Seguidament es van realitzar les corbes de cal·libració a partir d'una sèrie de dilucions seriadades de cada un dels estàndards (125mmol/L, 250mmol/L 500mmol/L, 1000mmol/L, 2000mmol/L, 4000mmol/L) a partir de la dilució mare (200mmol/L). Per acabar, es van derivatitzar amb els diferents reactius i es va analitzar amb el HPLC per realitzar les corbes de cal·libració a partir de l'àrea dels pics de cada un dels estàndard. Les R obtingudes en cada corba de cal·libració va ser de 0.99 aproximadament. A la Figura 19 es mostra l'aparició de cada estàndard en el seu temps de retenció.



**Figura 19. Aparició de cada estàndard en el seu temps de retenció.** 1 = succínic, 2 = làctic, 3 = acètic, 4 = propiònic, 5 = crotònic, 6 = iso-butíric, 7 = butíric, 8 = 2-metilbutíric, 9 = iso-valèric, 10 = valèric, 11 = iso-caproic, 12 = caproic (Torii et al., 2010).

Un cop posat a punt el mètode, es va començar a analitzar els AGCC de les mostres de femta. L'aliquota de la mostra de femta es va diluir en 5mL etanol 70% i es va centrifugar durant 10 minuts a 2.500rpm. Per cada mostra, es va preparar un tub de vidre i en cada un es va posar 150µL de la mostra de femta diluïda en etanol i es va procedir a la derivatització

amb els diferents reactius, tal i com s'ha explicat anteriorment, per poder-ho analitzar per cromatografia líquida.

Per cada mostra, es va calcular els  $\mu\text{M}$  a partir de la fórmula de la pendent donada en cada corba de cal·libració. Un cop calculats els  $\mu\text{M}$ , es va procedir a la normalització tenint en compte el pes de femta utilitzat en cada cas.

Tot i analitzar 12 AGCC, ens vam centrar amb la informació donada per l'àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric ja que representen el 95% de tots els àcids grassos de cadena curta a una proporció 60:20:20 respectivament.

#### **4.2.2.3. Cromatografia líquida d'alta eficàcia**

L'anàlisi dels AGCC es va realitzar mitjançant HPLC, Agilent 1100 HEWLETT PACKARD (Santa Clara, CA, USA), amb una columna C18. El material utilitzat per la columna és de sílice modificat amb un grup funcional, l'octa decil, el qual és una cadena recta de 18 carbonis, d'aquí el nom de columna C18. Milers de cadenes d'hidrocarburs s'adjunten en la superfície del gel de sílice per poder fer la separació.

La temperatura de la columna es va ajustar a 50°C i el flux a 1.1 mL/min. La detecció es realitza per UV, així doncs, el detector es va ajustar a una longitud d'ona de 400 nm.

### **4.3. Microscòpia**

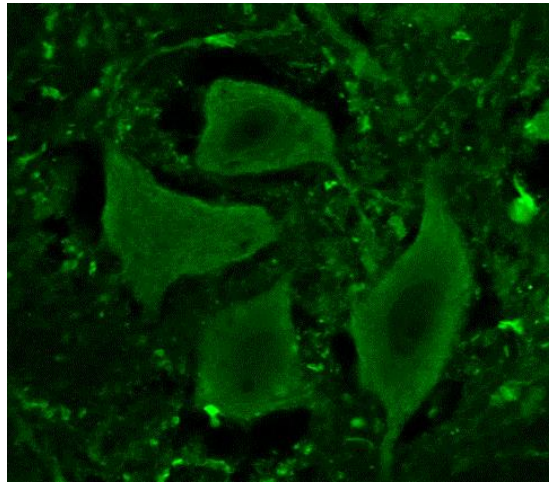
#### **4.3.1. Microscòpia de fluorescència**

En aquest estudi, es van realitzar diferents immunofluorescències per tal de determinar la localització i els nivells d'expressió de les proteïnes d'interès. Per això s'utilitza un anticòs secundari que es conjuguarà de forma específica a l'anticòs primari per visualitzar l'estructura d'interès.

#### **4.3.2. Microscòpia de fluorescència confocal**

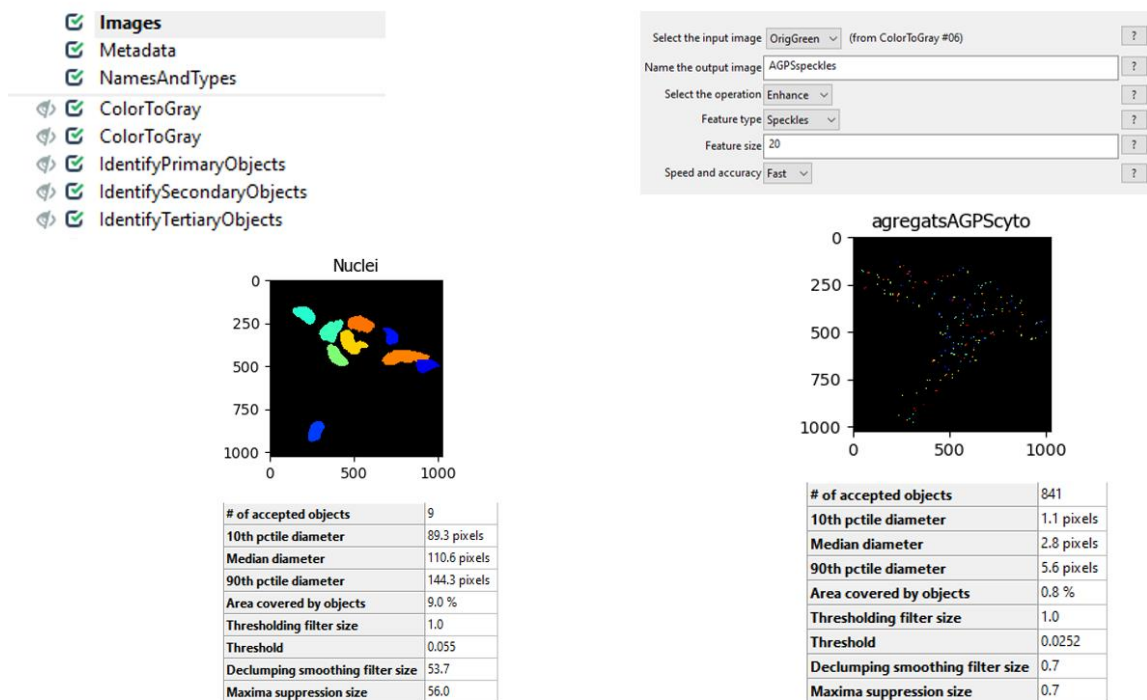
Les imatges amb el microscopi confocal es van adquirir amb el microscopi confocal Olympus FV10i a un augment de 60x. Les motoneurons són identificades per mida, morfologia

nuclear i per immunoreactivitat per tubulina  $\beta$ III. A la Figura 20 es mostra diverses motoneurons marcades per tubulina  $\beta$ III.



**Figura 20. Motoneurons marcades per tubulina  $\beta$ III.** El nucli de les motoneurons és d'aproximadament  $10\mu\text{M}$ .

Per l'anàlisi de la intensitat de les proteïnes nuclears i citosòliques, així com també la seva quantificació, es va utilitzar el software CellProfiler versió 4.2.1 per Windows (Kamentsky et al., 2011). A la Figura 21 es mostra algunes imatges representatives generades per l'algoritme del CellProfiler. Les *pipelines* utilitzades es poden descarregar del Mendeley (Fontdevila, Laia (2023), "Agregats citosol/nucli", Mendeley Data, V1, doi: 10.17632/zsxnsp4r5d.1) i (Fontdevila, Laia (2023), "Intensitat agregats citosol/nucli", Mendeley Data, V1, doi: 10.17632/ftv9mt6x5w.1). Aquestes *pipelines* han estat creades amb el software CellProfiler versió 4.2.1 i són adequades per l'anàlisi automatitzat d'imatges de microscopia confocal i permet la quantificació del nombre d'agregats i de la seva intensitat respectivament en compartiments subcel·lulars (citosol i nucli). Aquestes *pipelines* a l'hora de quantificar els agregats proteics no diferencien les motoneurons de la resta de cèl·lules i per aquest motiu, aquests han estat quantificats en tots els tipus cel·lulars.



**Figura 21. Flux de treball de la pipeline creada pel CellProfiler.** Els components de les cèl·lules s'identifiquen com objectes primaris a partir dels nuclis tenyits amb DAPI per tal d'identificar tot el cos cel·lular (objectes secundaris) i el citoplasma (objecte terciari) mitjançant propagació i segmentació. Una vegada que els components cel·lulars s'han representat correctament, el software pot realitzar una sèrie de mesures, en aquest cas, el nombre d'agregats proteics (*speckles*) tant en el citosol com en el nucli, i la intensitat d'aquests agregats.

#### 4.4. Anàlisi estadístic

Tota l'estadística i les gràfiques s'han realitzat utilitzant el GraphPad Prism versió 9.1.2 per Windows (GraphPad SoftWare, San Diego, CA, USA). Les diferències entre grups s'han analitzat per Student's t-test i one-way ANOVA, amb els anàlisis post-hoc adients, una vegada provada la normalitat de les variables mitjançant la prova de *Kolmogorov-Smirnov*. També es van realitzar correlacions entre variables i anàlisis de regressió lineal utilitzant el mateix software. El nivell de 0.05 es va correlacionar com el punt de significació mínima estadística en cada comparació.

A més a més, per l'anàlisi estadístic de la diversitat bacteriana es va emprar el programa MicrobiomeAnalyst v2.0. Es va calcular la diversitat bacteriana a partir de diferents índexs (Chao1 i Shannon) els quals utilitzen valors d'abundància relativa, però en cada un les

operacions matemàtiques s'organitzen diferent. Chao1 es basa en l'abundància d'una determinada espècie dins la mostra i Shannon mesura la probabilitat de seleccionar totes les espècies en la proporció a la qual es troben.

Per acabar, es va utilitzar el programa MetaboAnalyst v5.0 per l'anàlisi estadístic del fílum, família, gènere i espècie dels bacteris presents en les mostres de femta. Els resultats presentats en aquest treball es mostren en *counts*, recompte de variants de la seqüència 16S de l'ARNr ampliades durant la PCR. D'aquesta manera s'estima les proporcions de tàxons bacterians de les comunitats bacterianes presents en les mostres. Es tenen en compte tots els fílums, famílies, gèneres i espècies de bacteris. A la Figura 22 es mostra un exemple per gènere, ordenats de major a menor abundància, obtingut de la seqüenciació del 16S ARNr. Posteriorment, aquestes dades són analitzades pel programa. Les mostres prèviament van ser normalitzades. Es van emprar tests one-way ANOVA, anàlisi de correlació i anàlisi multivariants (ortho-PLSDA). Aquest últim serveix per tal d'explicar la variabilitat de la mostra, utilitza un model de predicció que s'anomena anàlisi de discriminants, on s'intenta predir on es situarà la mostra segons el seu microbioma, si serà control, ELA espinal o ELA bulbar. El llindar  $p < 0.05$  va ser seleccionat com el punt mínim de significança estadística en totes les comparacions.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1		M6a	M5a	M4a	M3a	M2a	M1a	F9a	F8a	F7a	F6a
2		S. ALS	Control	Control	S. ALS	S. ALS	Control	Control	B. ALS	S. ALS	B. ALS
3	Bacteroides	29247	45429	71697	332924	66174	29898	30330	63531	40292	61075
4	Blautia	19829	4889	24715	70121	38551	16481	22064	20806	57015	6144
5	Ruminococcus	3749	4484	15239	89285	13860	4556	18165	14515	25596	20684
6	Prevotella	377	30	26	162767	9944	30190	29698	7957	16826	15554
7	Faecalibacterium	3184	4175	23785	79359	9890	10440	10290	5127	34196	13093
8	Clostridium	2658	1210	5286	29658	5176	2770	14264	7961	14059	22843
9	Roseburia	1576	673	9872	55414	1720	2577	5903	2397	5352	11296
10	Oscillospira	4287	8642	9722	18461	6147	7552	16763	14116	12348	3359
11	Flavobacterium	3551	24135	6069	10027	5096	1048	8828	10156	12968	8914
12	Phascolarctobact	2167	9873	9454	21964	5113	1464	8441	7746	24	149
13	Lachnospira	3092	1549	5677	29453	3576	1271	5981	4602	11525	1170
14	Parabacteroides	5436	10172	4079	10600	5234	3307	5438	10011	8182	13363

**Figura 22. Exemple dels resultats obtinguts de la seqüenciació.** Gènere d'alguns dels bacteris expressats en *counts* (recompte de variants de la seqüència 16S de l'ARNr ampliades durant la PCR), ordenades de major a menor abundància en les mostres de femta analitzades. Dades a partir de les quals el programa MetaboAnalyst genera l'estadística.



The background of the page is a blue marbled pattern with various shades of light and dark blue, creating a textured, watercolor-like effect. A white rectangular box with a thin black border is positioned in the center-right of the page, containing the word 'RESULTATS' in bold black capital letters.

## **RESULTATS**





# 5.

# RESULTATS

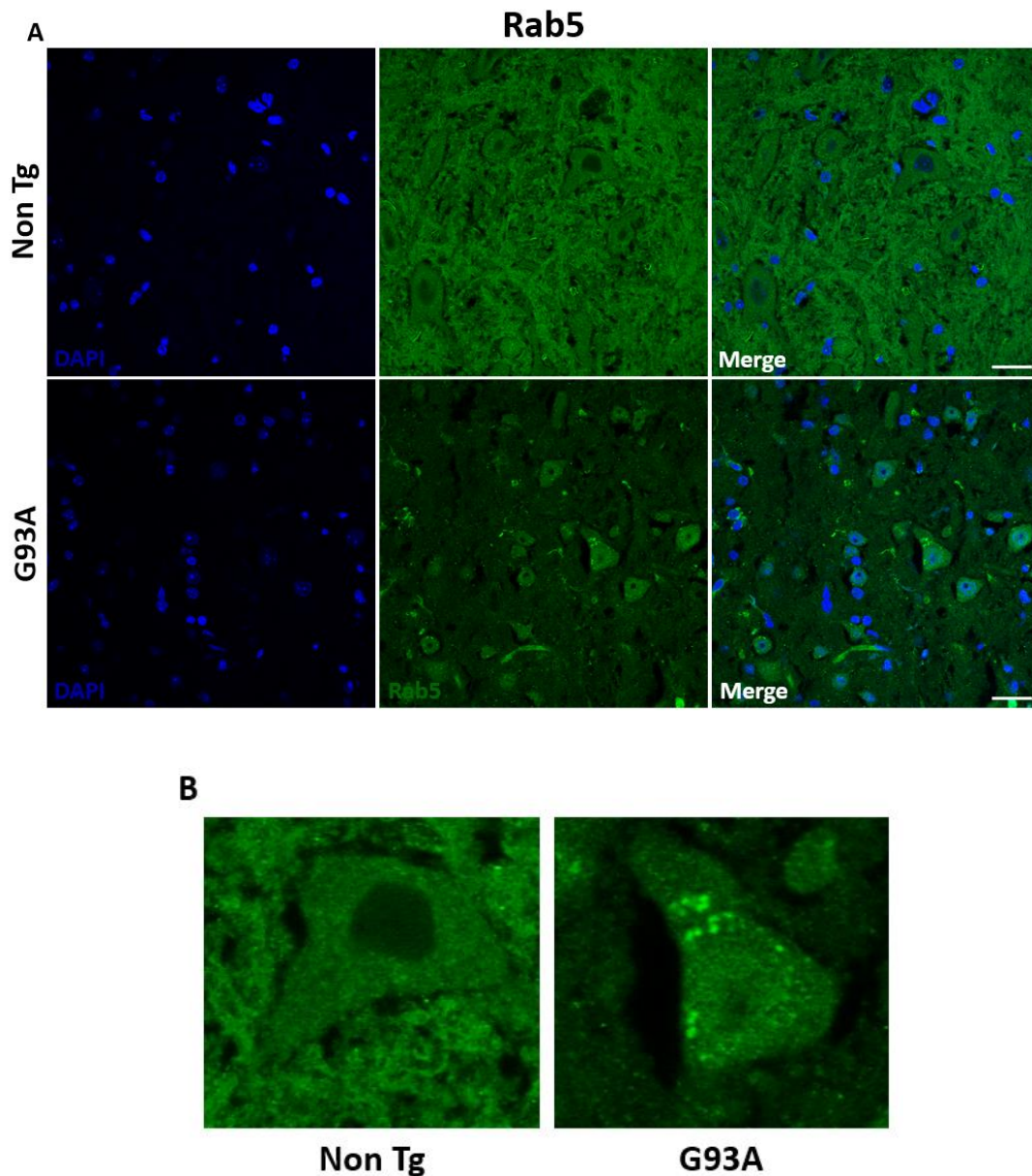
## 5.1. Alteració en proteïnes implicades en el tràfic endosomal

S'ha analitzat el nombre d'agregats i la intensitat de Rab5 i Rab7, proteïnes implicades en el tràfic endosomal, en seccions de medul·la espinal lumbar de ratolí, G93A i no transgènics, i en línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients. Les seccions de medul·la es van extreure als 150 dies d'edat del ratolí ja que és el punt final de la malaltia amb major pèrdua de motoneurons. Per altra banda, els experiments en motoneurons s'han realitzat en la línia control, en la línia C9orf72 i en la línia FUS. Aquestes cèl·lules deriven dels fibroblasts de pacients d'ELA i controls sans que han estat reprogramades i posteriorment diferenciades a motoneurons.

### 5.1.1. Anàlisi en seccions de medul·la espinal lumbar de ratolins G93A

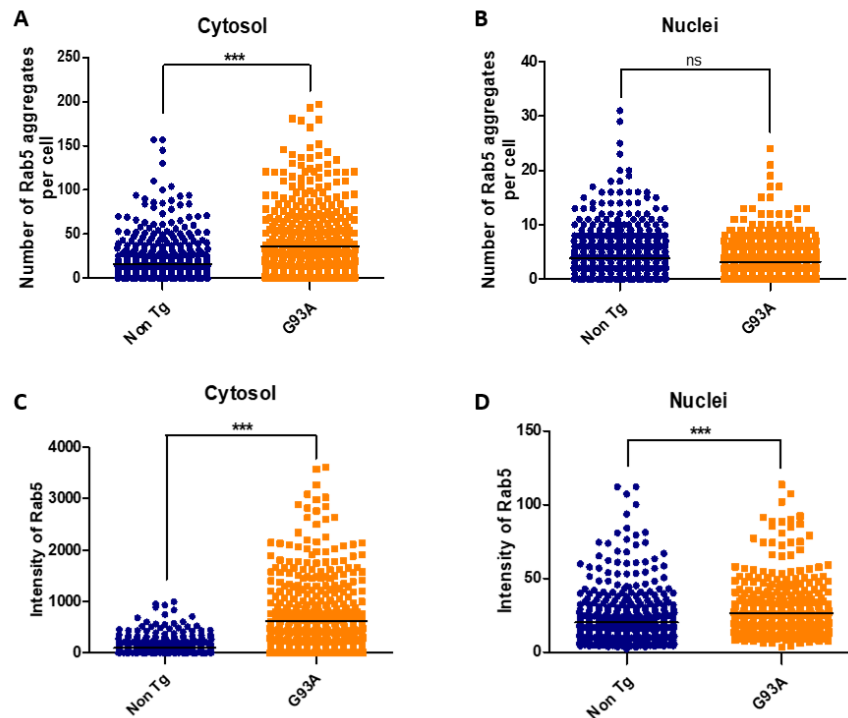
S'ha analitzat el nombre d'agregats de Rab5 i Rab7 tant en el citosol com en el nucli de les motoneurons presents en la regió ventral de la medul·la espinal lumbar dels ratolins.

Les imatges obtingudes per microscopia confocal de Rab5 mostren un augment del nombre d'agregats d'aquesta proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 23A). A més a més, es pot observar com en els ratolins no transgènics les motoneurons estan preservades i el marcatge respecta el nucli a diferència dels ratolins G93A on la immunoreactivitat és nuclear (Figura 23B).



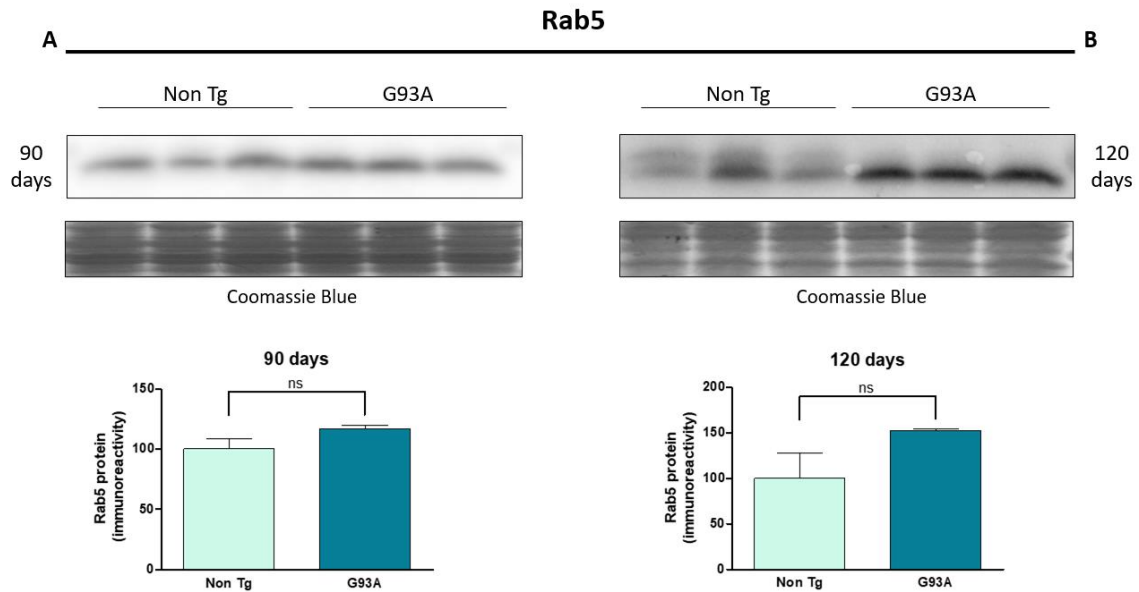
**Figura 23. Agregació de Rab5 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de Rab5 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. Barres amb una longitud de 20 $\mu$ m. (n=2 ratolins no transgènics i n=3 ratolins G93A).

De forma quantitativa els resultats obtinguts mostren un augment del nombre d'agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 24A), en canvi, en el nucli no s'observen diferències significatives (Figura 24B). En la intensitat d'aquests agregats també es produeix un augment en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics tant en el citosol com en el nucli (Figura 24C i 24D).



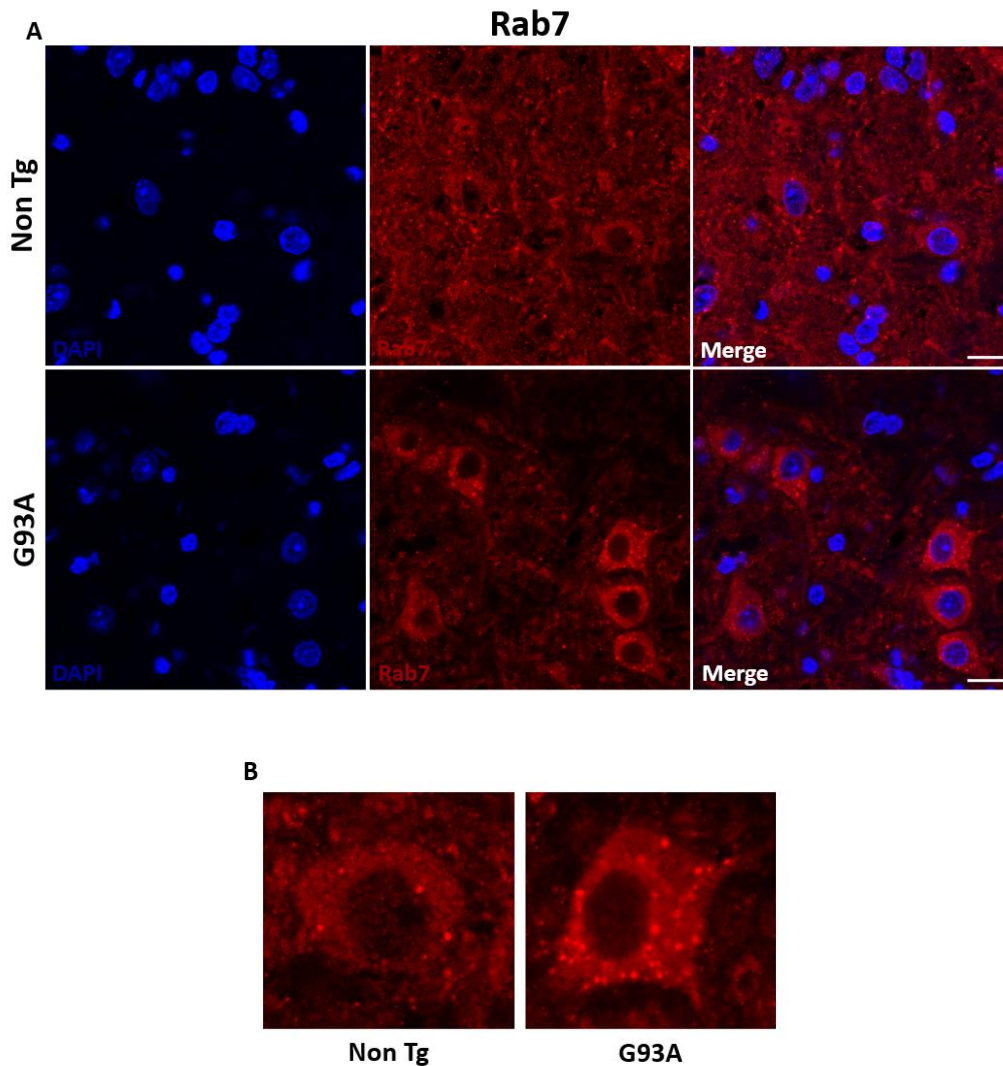
**Figura 24.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de Rab5 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. Analtitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de Rab5 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de la regió ventral de la medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de Rab5 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de Rab5 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=1 ratolí per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per Student's t-test.

Per tal d'acabar de corroborar els resultats obtinguts anteriorment, es va realitzar també un Western Blot per Rab5. En aquest cas es va realitzar en mostres de medul·la espinal lumbar als 90 dies i 120 dies d'edat per comprovar si els canvis trobats als 150 dies succeïen en edats anteriors. Els resultats obtinguts, tot i observar un petit augment de la proteïna en els ratolins G93A d'ambdues edats, les diferències no són significatives tal i com es mostra en la quantificació per microscopia confocal (Figura 25A i 25B).



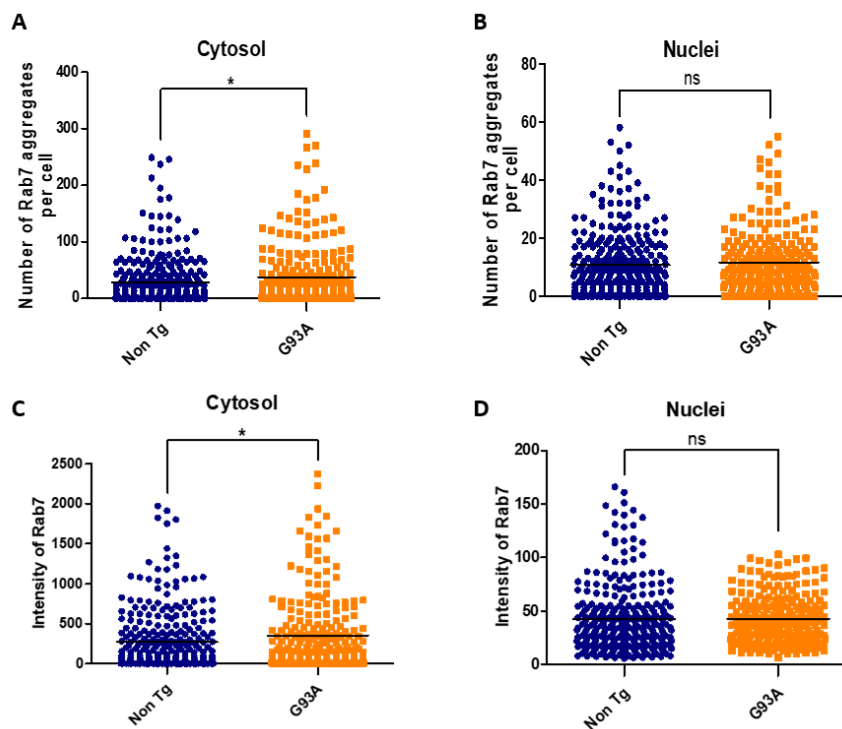
**Figura 25.** Els nivells de Rab5 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies ni als 120 dies d'edat. Analitzat per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A als 90 dies i 120 dies d'edat. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. **(A)** Als 90 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de Rab5 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** Als 120 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de Rab5 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip i per cada edat). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test.

Per Rab7 les imatges obtingudes per microscopia confocal també mostren un augment dels agregats en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 26A i 26B).



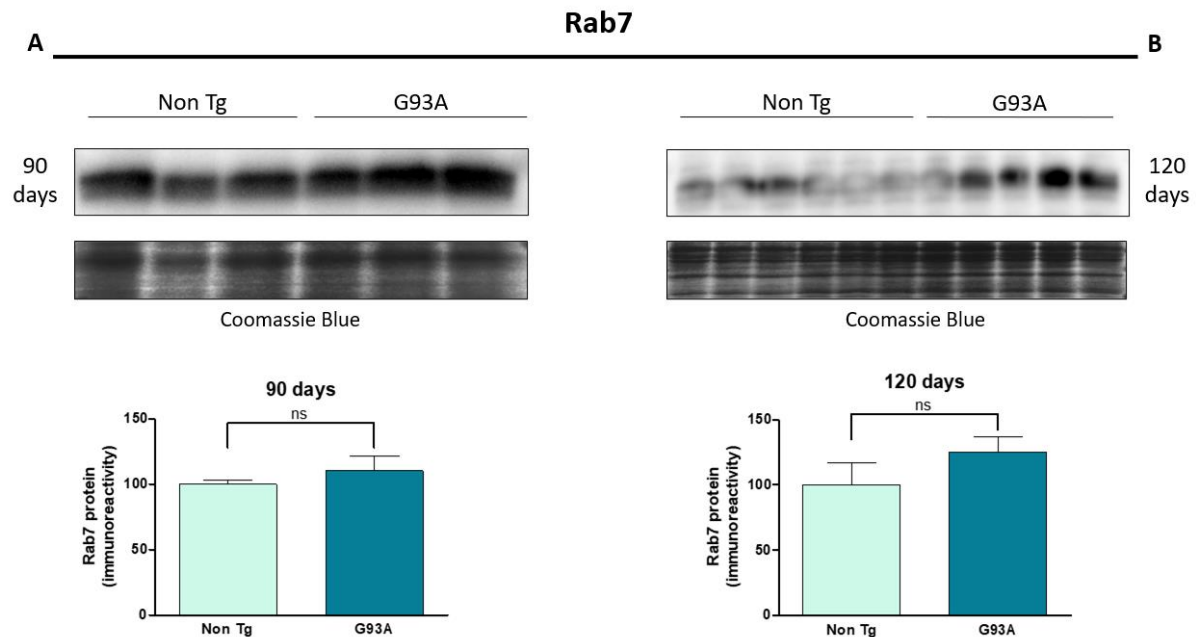
**Figura 26. Agregació de Rab7 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de Rab7 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. Barres amb una longitud de 20 $\mu$ M. (n=3 ratolins per cada genotip).

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors s'observa un augment significatiu del nombre d'agregats de la proteïna Rab7 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 27A), en canvi, en el nucli no es detecten canvis (Figura 27B). Pel que fa a la intensitat dels agregats, es produeix també un augment en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 27C) i en el nucli tampoc es produeixen canvis (Figura 27D).



**Figura 27. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de Rab7 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de Rab7 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de Rab7 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de Rab7 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$  per Student's t-test.

Seguint la mateixa línia, també es va realitzar un anàlisi per Western Blot en mostres de medul·la espinal als 90 dies i 120 dies d'edat. Els resultats obtinguts, tot i observar un petit augment en els ratolins G93A, majoritàriament als 120 dies, no mostren canvis significatius en els nivells de Rab7 en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 28A i 28B).



**Figura 28.** Els nivells de Rab7 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies ni als 120 dies d'edat. Analitzat per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A als 90 dies i 120 dies d'edat. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. **(A)** Als 90 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de Rab7 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip). **(B)** Als 120 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de Rab7 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=6 ratolins no transgènics i n=5 ratolins G93A). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test.

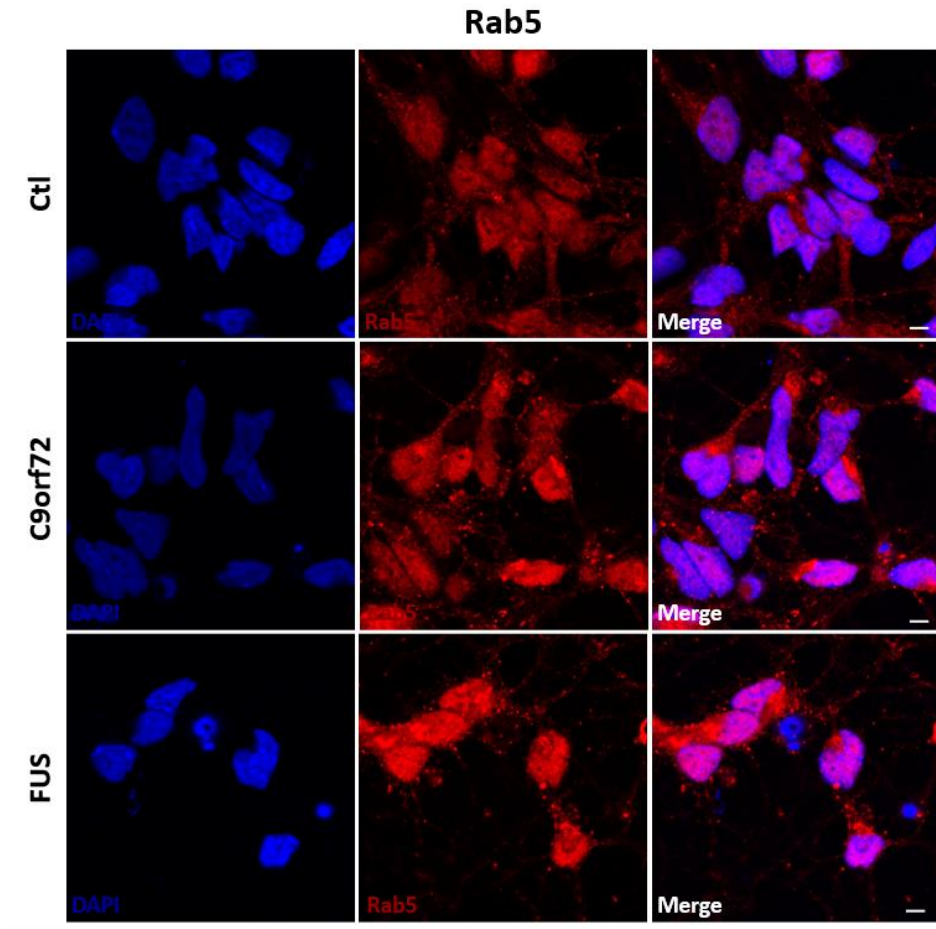
### 5.1.2. Anàlisi en el model cel·lular de motoneurons derivades de pacients

S'ha analitzat el nombre d'agregats i la intensitat de Rab5 i Rab7, en tres línies de motoneurons derivades de pacients: línia control, línia C9orf72 i línia FUS. A més a més, s'ha analitzat també el nombre d'agregats sota una situació d'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen i sota estrès osmòtic induït amb sorbitol.

#### 5.1.2.1. Rab5

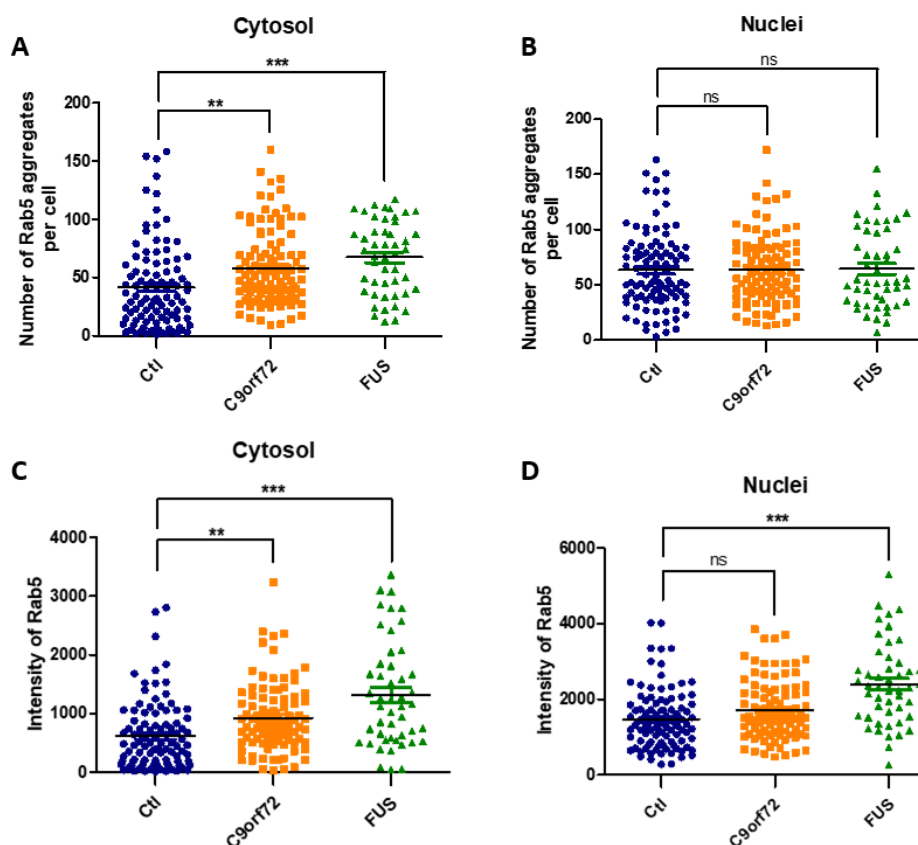
Les imatges obtingudes per microscopia confocal de Rab5 mostren un augment del nombre d'agregats de la proteïna en ambdues línies cel·lulars, C9orf72 i FUS, respecte la control (Figura 29).





**Figura 29. Agregació de Rab5 en les cèl·lules de línia control, C9orf72 i FUS.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de Rab5 en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

Els resultats obtinguts en la quantificació de Rab5, tal i com s'ha observat anteriorment, mostren un augment significatiu del nombre d'agregats en el citosol de les cèl·lules tant de la línia C9orf72 com de la línia FUS respecte la control (Figura 30A), en el nucli en canvi, no es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de Rab5 en cap de les línies analitzades respecte la control (Figura 30B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats, en el citosol s'observa també un augment significatiu tant en la línia C9orf72 com en la línia FUS respecte la control (Figura 30C). En el nucli, solament es produeix aquest augment en les cèl·lules de la línia FUS respecte la control (Figura 30D).

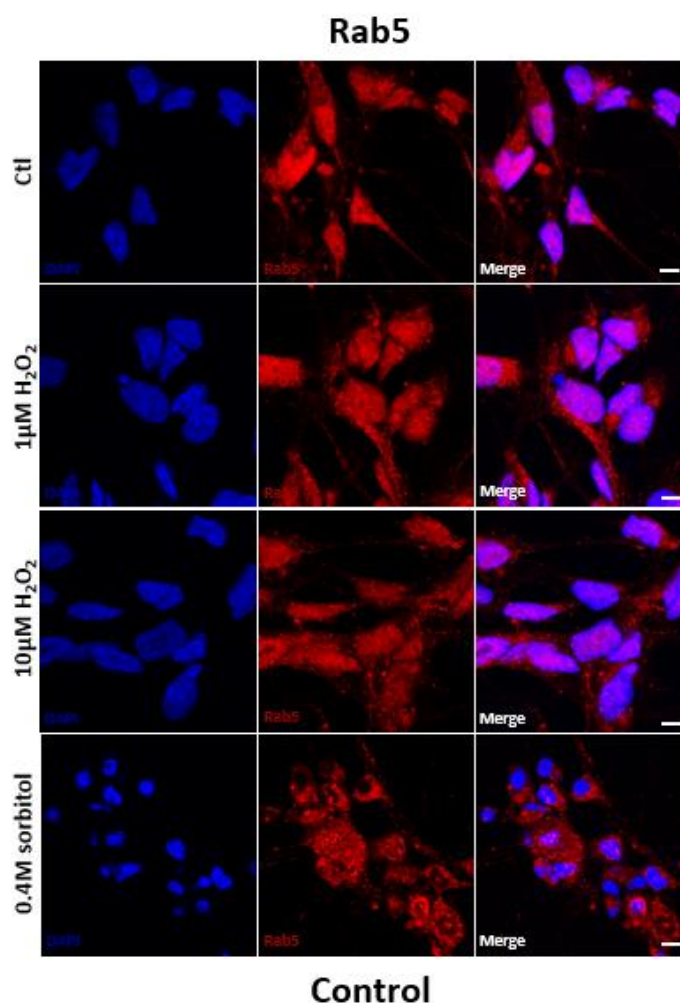


**Figura 30. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de Rab5 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de Rab5 en el nucli de les cèl·lules en cap de les línies analitzades respecte la control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(D)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de Rab5 en el nucli de les cèl·lules de la línia FUS respecte la control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

Per altra banda s'ha analitzat l'efecte de dos estressors per quantificar els nivells d'agregació proteica de Rab5. Les cèl·lules de les tres línies van ser tractades amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  durant 4h de tractament (estrès oxidatiu) i sorbitol a  $0.4\text{M}$  també durant 4h (estrès osmòtic).

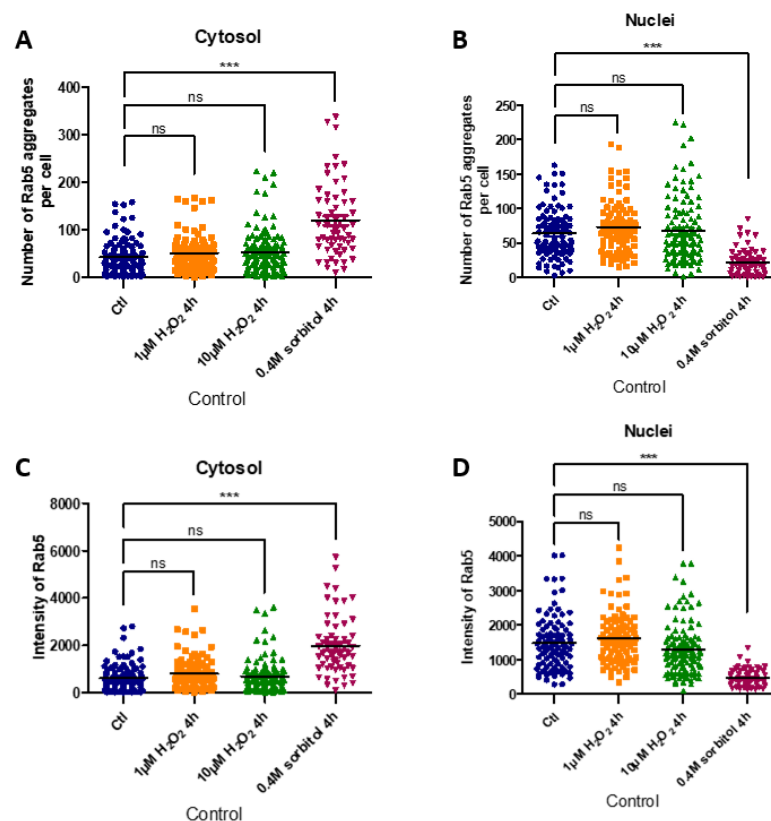
### 5.1.2.1.1. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab5 en les cèl·lules de la línia control

Tal i com mostren les imatges obtingudes per microscopia confocal, sota el tractament amb peròxid d'hidrogen no es detecten canvis en el nombre d'agregats de Rab5, en canvi, sota el tractament a 0.4M de sorbitol durant 4h a més a més de produir-se un augment dels agregats de Rab5 respecte les control, es pot observar també com amb aquest tractament les motoneurons estan més deteriorades en comparació amb el tractament amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Els nuclis són més petits i més picnòtics (Figura 31).



**Figura 31. Agregació de Rab5 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia control.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de Rab5 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1µM, 10µM) i sorbitol (0.4M) durant 4h. Barres amb una longitud de 5µM.

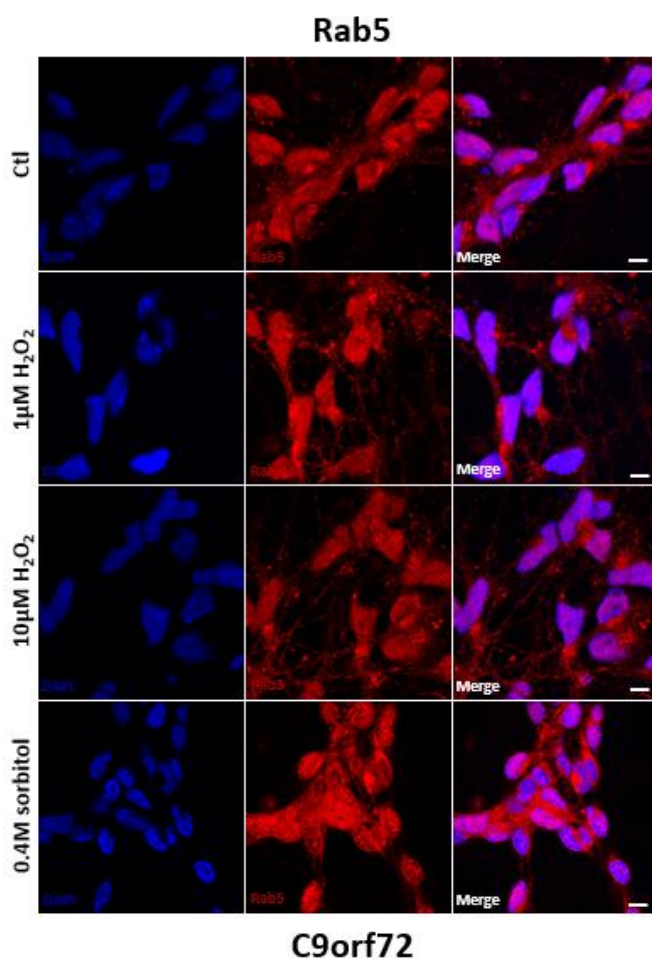
Els resultats obtinguts en la quantificació mostren un augment significatiu del nombre d'agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 32A). En canvi, en el nucli disminueixen el nombre d'aquests agregats a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 32B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats, els resultats obtinguts mostren un augment amb sorbitol en el citosol respecte les control (Figura 32C) i una disminució en el nucli també sota el tractament amb sorbitol respecte les control (Figura 32D).



**Figura 32. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab5 sota l'estrès osmòtic induït amb sorbitol en les cèl·lules de la línia control.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de Rab5 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de Rab5 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de Rab5 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

### 5.1.2.1.2. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab5 en les cèl·lules de la línia C9orf72

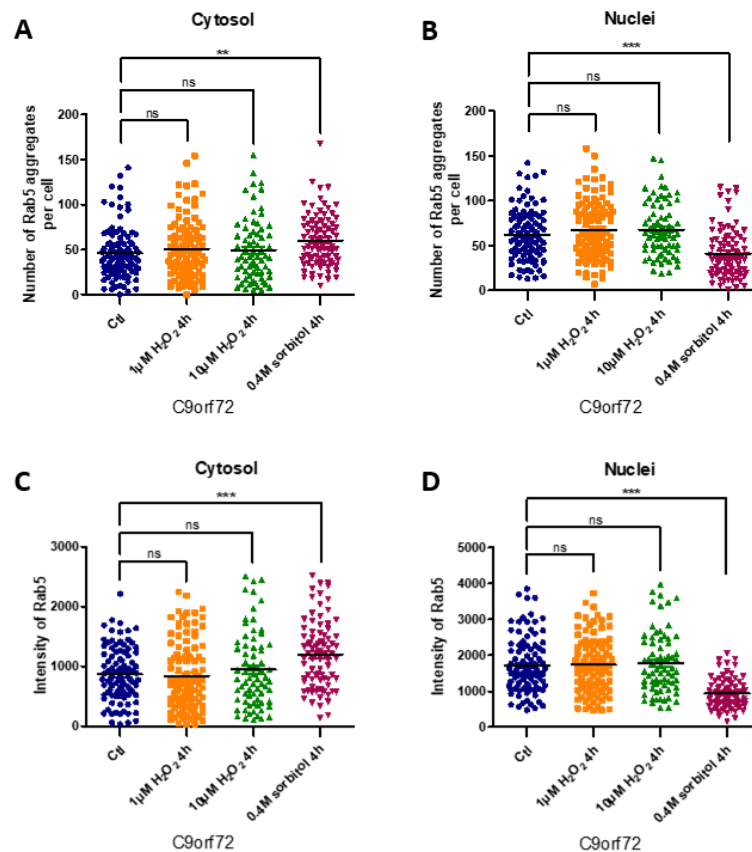
Tal i com mostren les imatges obtingudes per microscopia confocal, sota el tractament amb peròxid d'hidrogen no es detecten canvis en el nombre d'agregats de Rab5, en canvi, sota el tractament a 0.4M de sorbitol durant 4h s'observa un augment respecte les control. A més a més, sota el tractament amb sorbitol les motoneurons estan més deteriorades que no pas amb el tractament amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Els nuclis són més petits i més picnòtics (Figura 33).



**Figura 33. Agregació de Rab5 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de Rab5 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1µM, 10µM) i sorbitol (0.4M) durant 4h. Barres amb una longitud de 5µM.

En la quantificació, tal i com s'ha observat anteriorment, es mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 34A). En canvi, en el nucli, disminueixen aquests

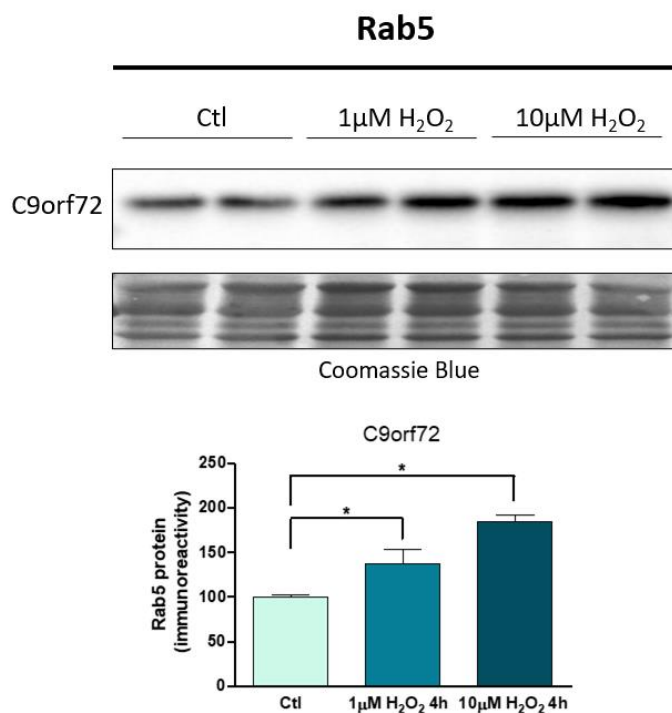
agregats sota el tractament amb sorbitol (Figura 34B). En l'anàlisi de la intensitat dels agregats s'observa un augment significatiu en el citosol de les cèl·lules quan es tracten amb sorbitol respecte les control (Figura 34C) i en canvi en el nucli disminueix sota el mateix tractament (Figura 34D).



**Figura 34. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab5 sota l'estrès osmòtic induït amb sorbitol en les cèl·lules de la línia C9orf72.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de Rab5 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de Rab5 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de Rab5 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

Per tal de corroborar els resultats es va realitzar un anàlisi per Western Blot, sota el tractament amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  durant 4h. Els resultats obtinguts

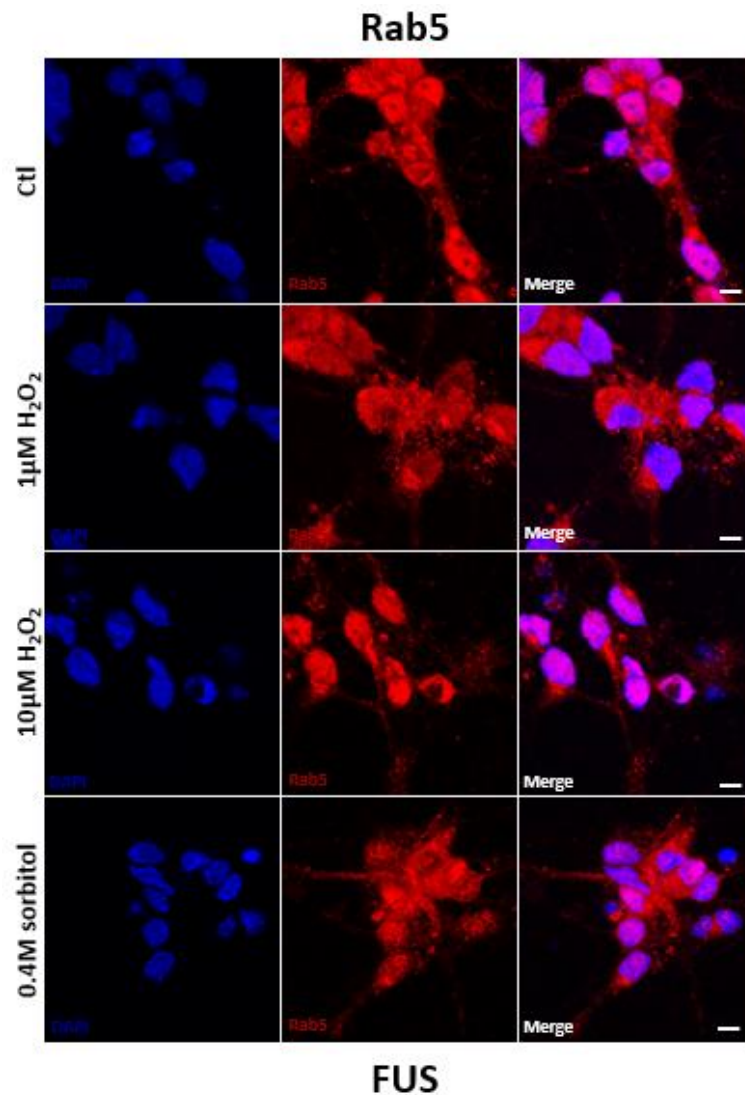
mostren un augment significatiu de Rab5 en les cèl·lules tractades a ambdues concentracions de  $H_2O_2$ , tant a  $1\mu M$  com a  $10\mu M$ , durant 4h respecte les control (Figura 35).



**Figura 35. Alteració en els nivells de Rab5 sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de línia C9orf72.** Analitzat per Western Blot en la línia cel·lular C9orf72 sota l'estrès induït amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu M$  i  $10\mu M$  durant 4h de tractament. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. Augment significatiu dels nivells de Rab5 en les cèl·lules tractades a  $1\mu M$  i  $10\mu M$  de  $H_2O_2$  durant 4h respecte les control. ( $n=2$  per cada condició). \* Indica  $p < 0.05$  per one-way ANOVA.

### 5.1.2.1.3. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab5 en les cèl·lules de la línia FUS

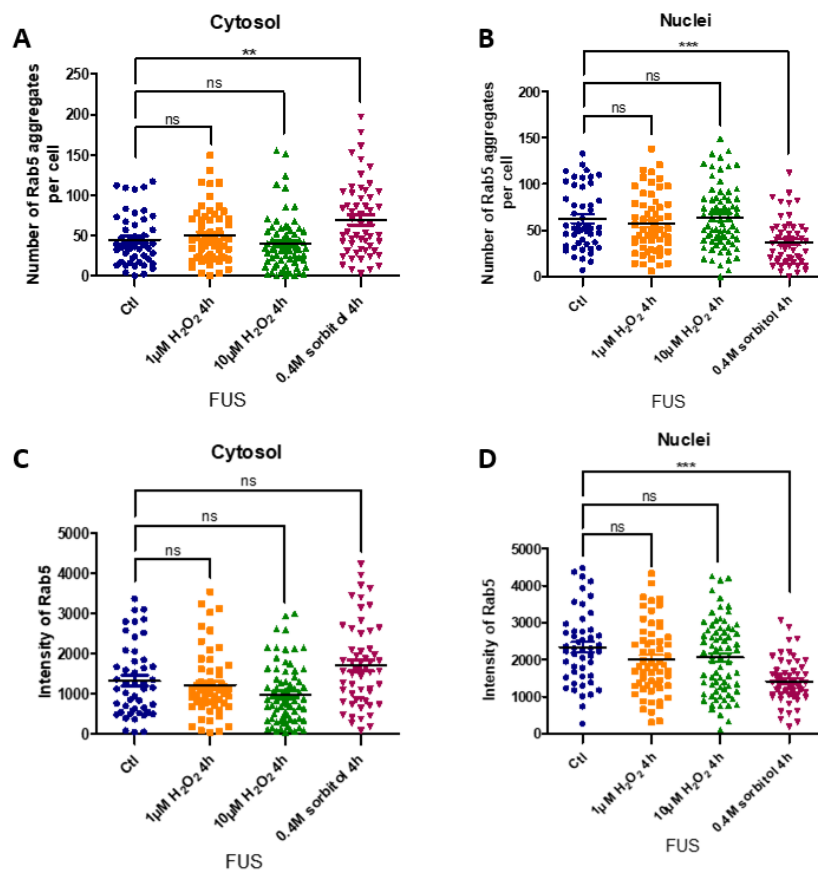
Les imatges obtingudes per microscopia confocal no mostren canvis en el nombre d'agregats de Rab5 en cap dels tractaments utilitzats, ni amb peròxid d'hidrogen ni amb sorbitol, respecte les control (Figura 36).



**Figura 36. Agregació de Rab5 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia FUS.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de Rab5 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1µM, 10µM) i sorbitol (0.4M) durant 4h. Barres amb una longitud de 5µM.

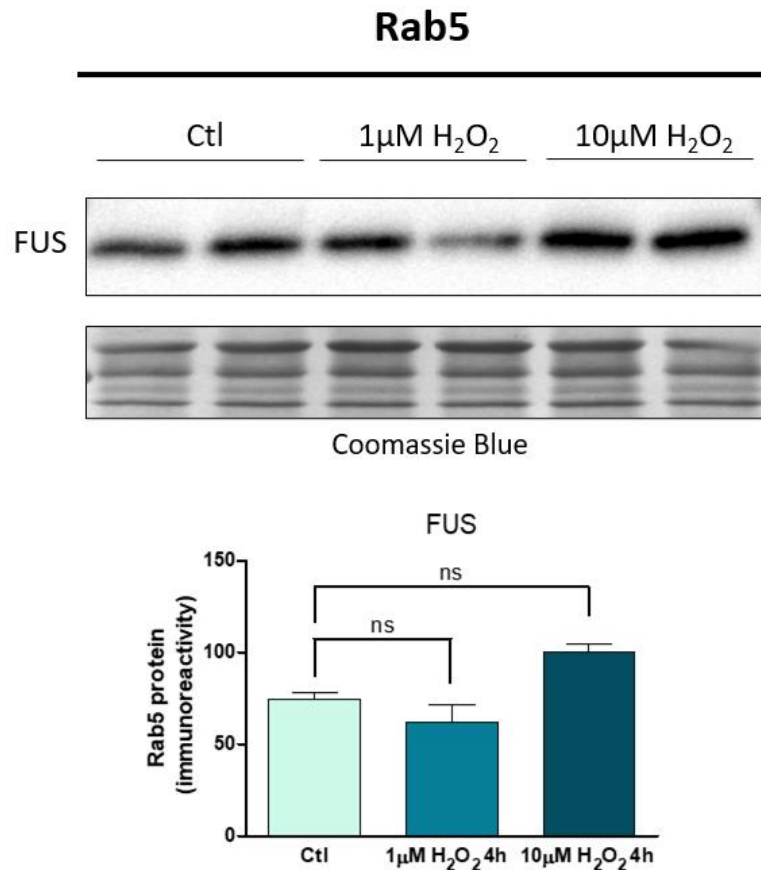
Els resultats obtinguts en la quantificació mostren un augment significatiu del nombre d'agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 37A). En canvi, en el nucli, es produeix una disminució d'aquests agregats sota l'estrès a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 37B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats, en el citosol no es detecten canvis significatius (Figura 37C) però si es produeix una disminució sota el tractament amb sorbitol en el nucli de les cèl·lules respecte les control (Figura 37D).





**Figura 37. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab5 sota l'estrès osmòtic induït amb sorbitol en les cèl·lules de la línia FUS.** Analtzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de Rab5 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de Rab5 en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de Rab5 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de Rab5 en el citosol en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de Rab5 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

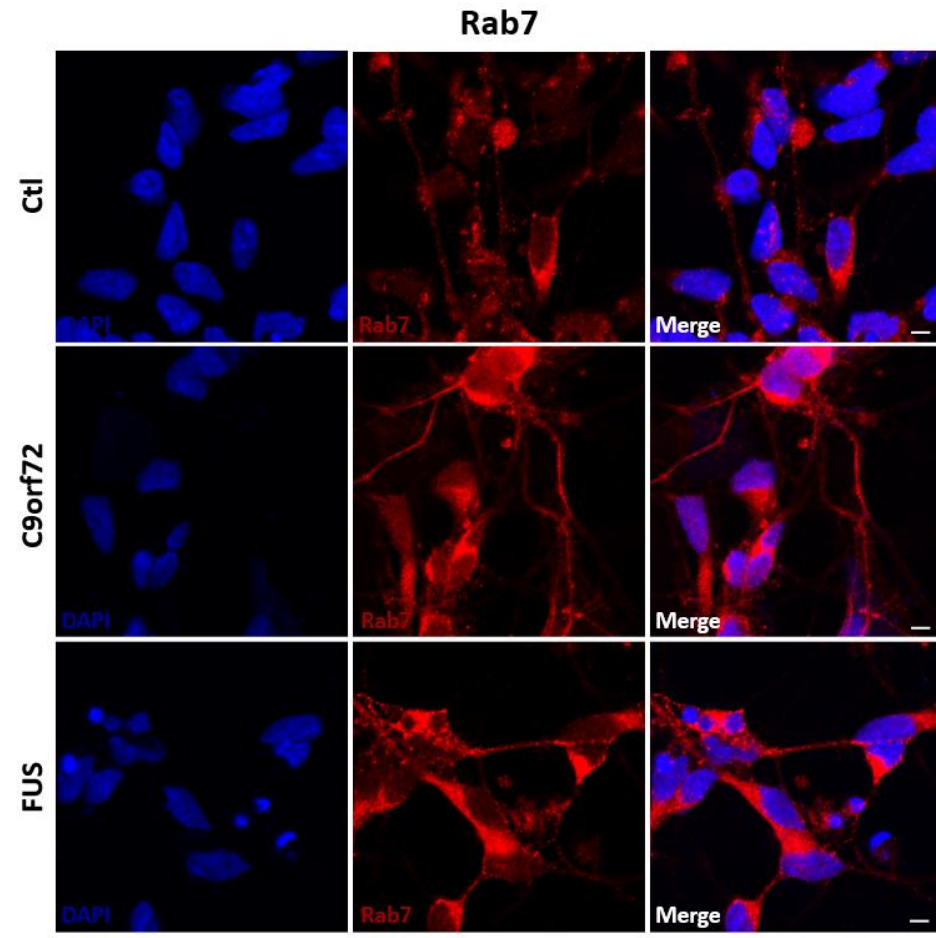
Per últim, també es van comprovar els resultats de Rab5 amb un anàlisi per Western Blot. Tot i que sembla que es produeix un petit augment de la proteïna sota el tractament a 10µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la quantificació no mostra canvis significatius respecte les control (Figura 38).



**Figura 38.** Els nivells de Rab5 no es troben alterats sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de línia FUS. Analitzat per Western Blot en la línia cel·lular FUS sota l'estrès induït amb peròxid d'hidrogen a 1μM i 10μM durant 4h de tractament. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. No es detecten canvis significatius en els nivells de Rab5 sota el tractament amb peròxid d'hidrogen respecte les control (n=2 per cada condició). ns Indica  $p>0.05$  per one-way ANOVA.

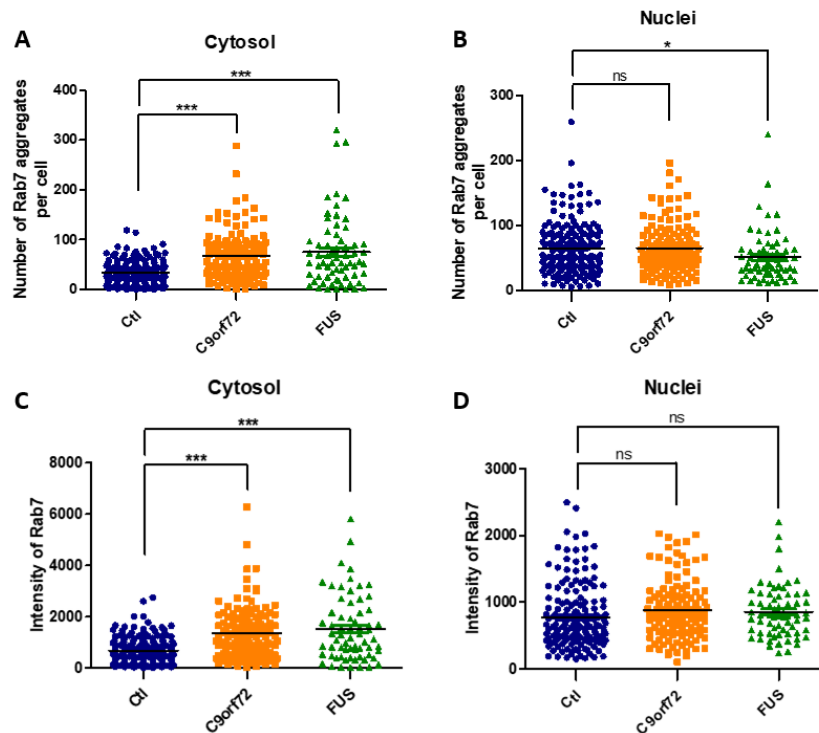
### 5.1.2.2. Rab7

Les imatges obtingudes per microscopia confocal de Rab7 mostren un augment d'aquesta proteïna tant en les cèl·lules de la línia C9orf72 com en les cèl·lules de la línia FUS respecte la control (Figura 39).



**Figura 39. Agregació de Rab7 en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de Rab7 en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control (Figura 40A). Per contra, en el nucli, es produeix una disminució del nombre d'agregats d'aquesta proteïna en les cèl·lules de la línia FUS respecte la control (Figura 40B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats, en el citosol augmenta també en les dues línies, C9orf72 i FUS, respecte la control (Figura 40C). En canvi, en el nucli no es mostren canvis significatius en la intensitat dels agregats en cap de les línies analitzades respecte la control (Figura 40D).

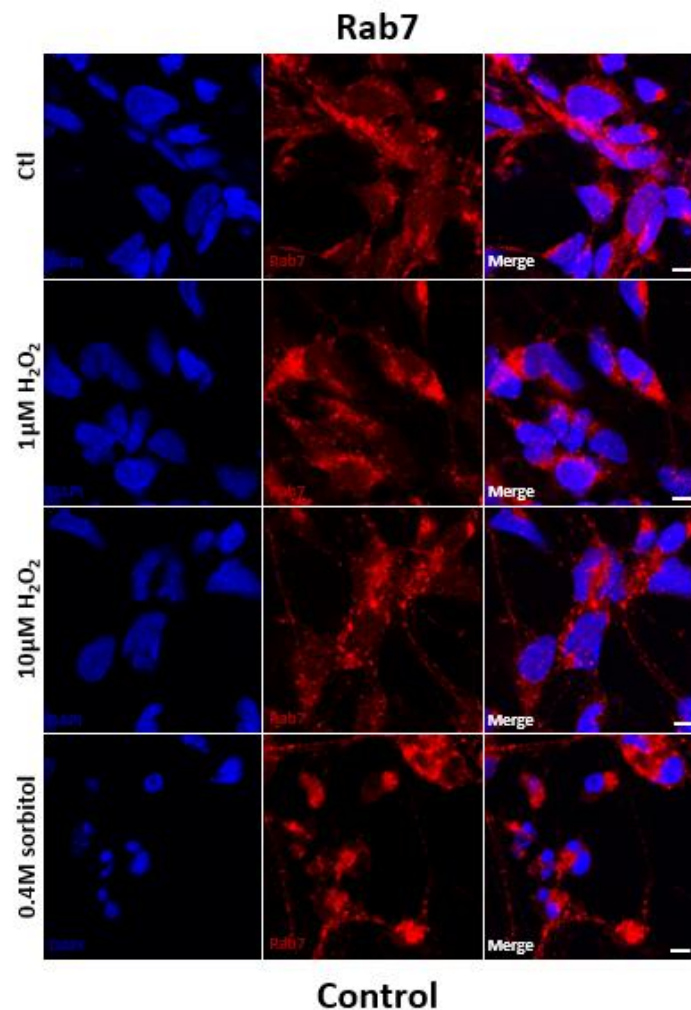


**Figura 40. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab7 en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de Rab7 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de Rab7 en el nucli de les cèl·lules de la línia FUS respecte la control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de Rab7 en el nucli de les cèl·lules en cap de les línies analitzades respecte la control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

D'igual forma, s'ha analitzat l'efecte de l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen, a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$ , i de l'estrès osmòtic induït amb  $0.4\text{M}$  de sorbitol, ambdós tractaments durant 4h, sobre l'agregació proteica de Rab7 en les tres línies analitzades.

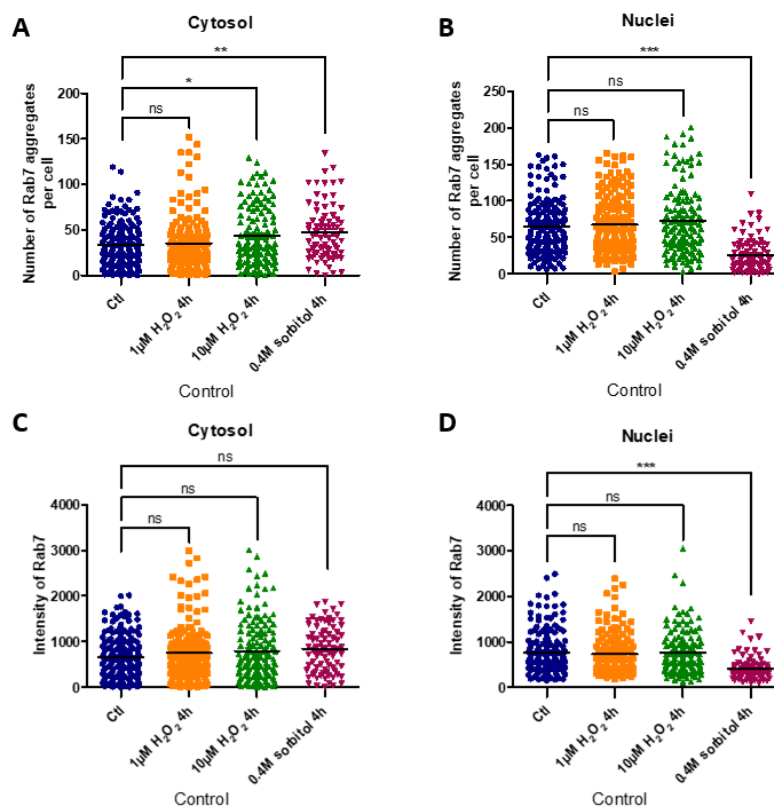
### 5.1.2.2.1. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab7 en les cèl·lules de la línia control

Les imatges obtingues per microscopia confocal no mostren diferències en el nombre d'agregats de Rab7 en cap dels tractaments utilitzats, ni amb peròxid d'hidrogen ni amb sorbitol, respecte les control. Si que s'observa com sota el tractament amb sorbitol els nuclis són més petits i picnòtics (Figura 41).



**Figura 41. Agregació de Rab7 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia control.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de Rab7 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) i sorbitol (0.4M) durant 4h. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

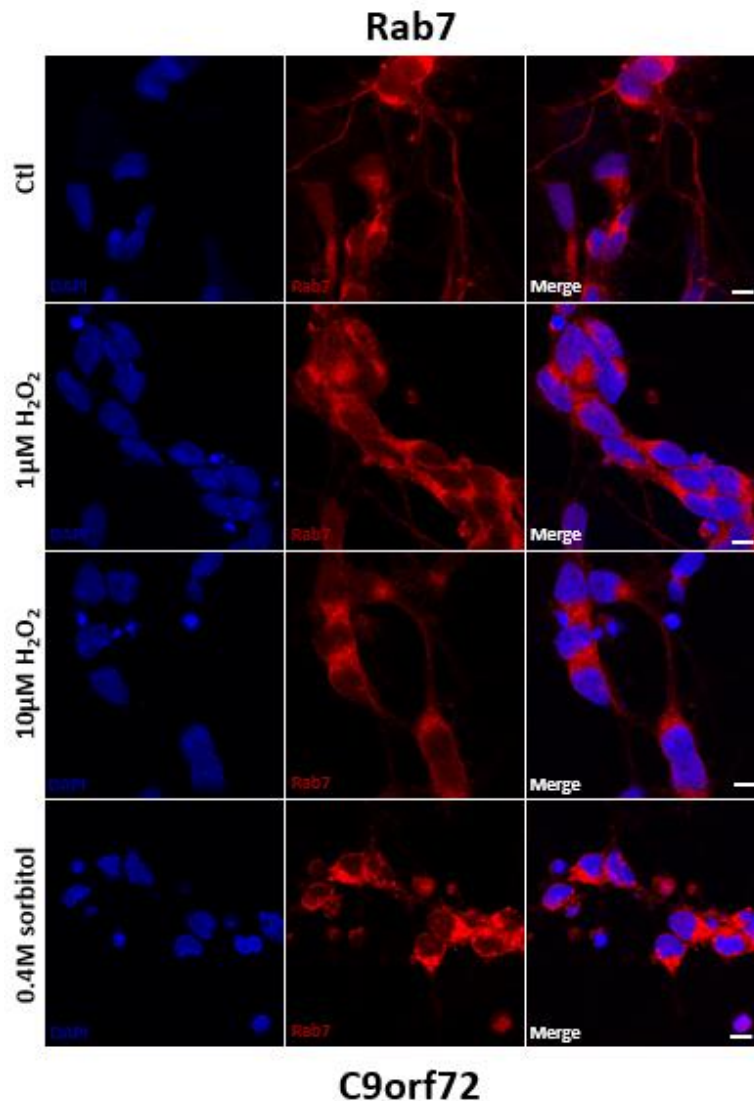
La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules tractades a 10 $\mu$ M de peròxid d'hidrogen i a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 42A). En el nucli es produeix una disminució d'aquests agregats en les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 42B). Pel que fa a la intensitat, en el citosol no s'observen canvis significatius (Figura 42C) i en el nucli disminueix també sota el tractament a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 42D).



**Figura 42. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab7 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de línia control.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de Rab7 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules tractades a 10 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de Rab7 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de Rab7 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica p>0.05, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 per one-way ANOVA.

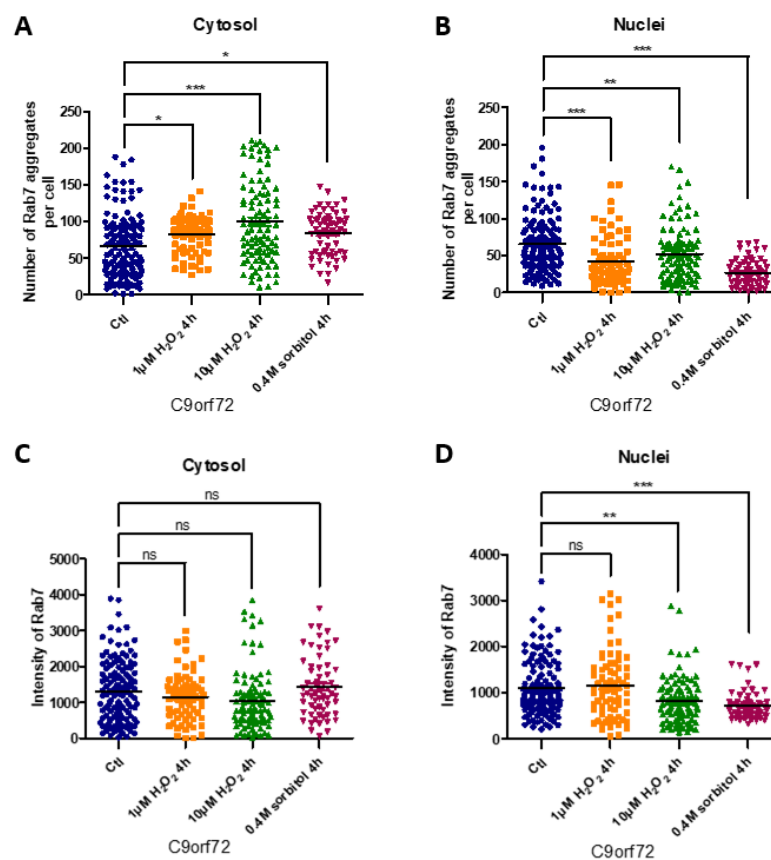
### 5.1.2.2.2. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab7 en les cèl·lules de la línia C9orf72

Les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren un augment del nombre d'agregats de Rab7 en les cèl·lules tractades amb peròxid d'hidrogen, tant a 1 $\mu$ M com a 10 $\mu$ M durant 4h, i també a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 43).



**Figura 43.** Agregació de Rab7 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de línia C9orf72. Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de Rab7 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) i sorbitol (0.4M) durant 4h. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments, tant amb peròxid d'hidrogen com amb sorbitol, a totes les concentracions utilitzades durant 4h respecte les control (Figura 44A). En canvi en el nucli, es produeix una disminució sota tots els tractaments utilitzats respecte les control (Figura 44B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats, en el citosol no es mostren canvis significatius respecte les control (Figura 44C) i en el nucli disminueix a 10 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 44D).

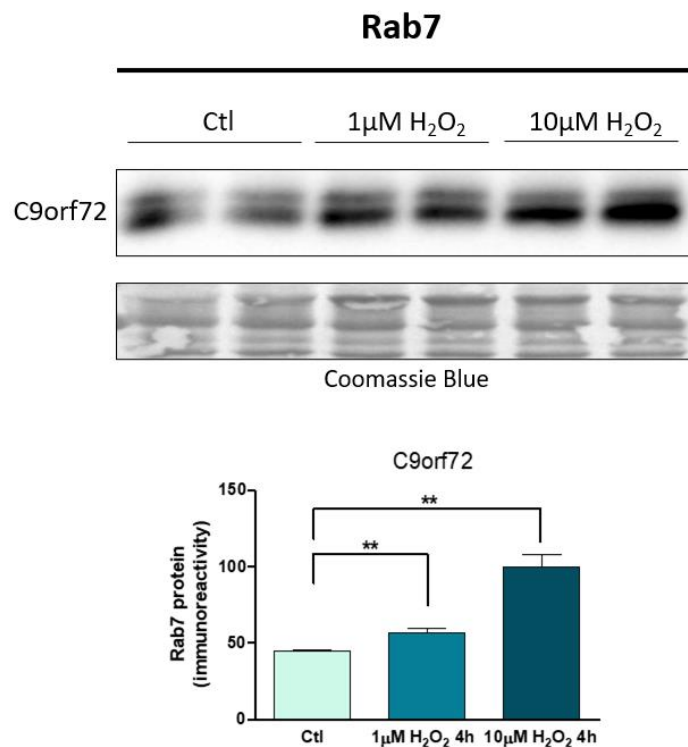


**Figura 44.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab7 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia C9orf72. Analtzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de Rab7 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats, tant amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com amb sorbitol durant 4h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de Rab7 en el nucli de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats, tant amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com amb sorbitol durant 4h respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de Rab7 en el citosol en cap dels tractaments



utilitzats respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de Rab7 en el nucli de les cèl·lules tractades a 10 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica p>0.05, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 per one-way ANOVA.

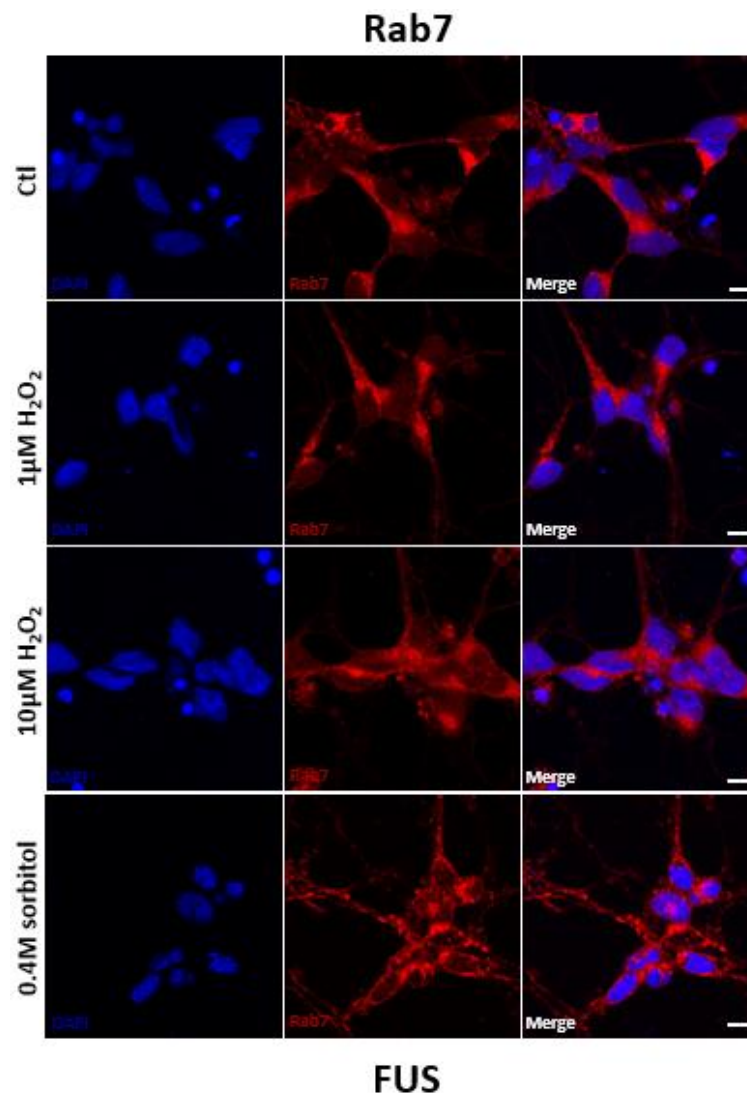
Per altra banda, també es va quantificar aquesta proteïna per Western Blot corroborant els resultats obtinguts prèviament. Com es mostra en els resultats, es produeix un augment significatiu de Rab7 en les cèl·lules tractades tant a 1 $\mu$ M com a 10 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 4h respecte les control (Figura 45).



**Figura 45. Alteració en els nivells de Rab7 sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de línia C9orf72.** Analitzat per Western Blot en la línia cel·lular C9orf72 sota l'estrès induït amb peròxid d'hidrogen a 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M durant 4h de tractament. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. Augment significatiu dels nivells de Rab7 en les cèl·lules tractades a 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M de peròxid d'hidrogen durant 4h de respecte les control. (n=2 per cada condició). \*\* Indica p<0.01 per one-way ANOVA.

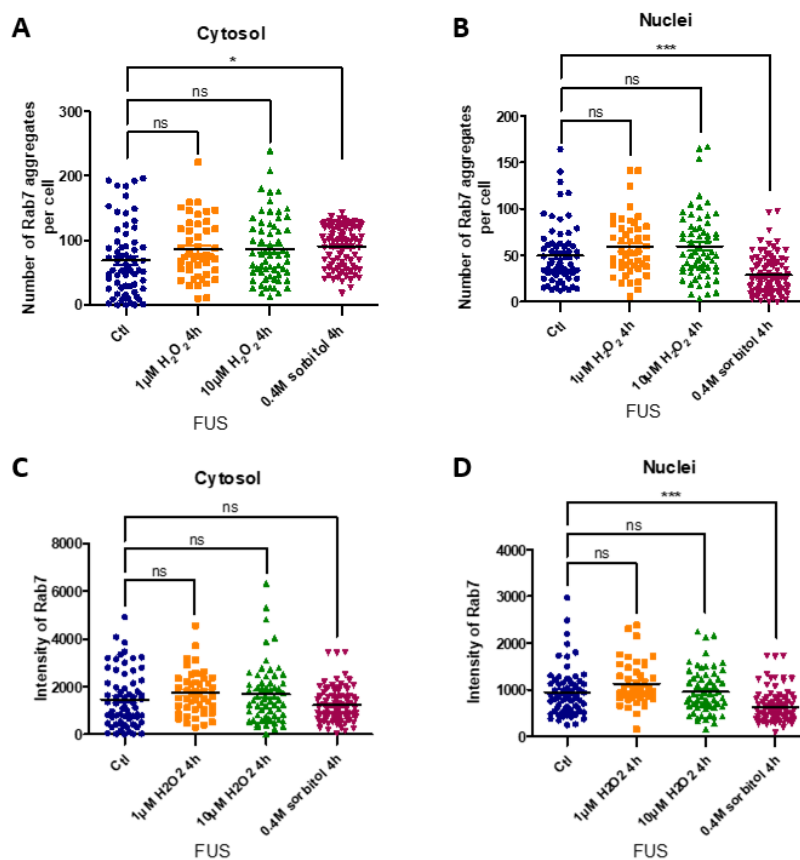
### 5.1.2.2.3. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de Rab7 en les cèl·lules de la línia FUS

Les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren un augment del nombre d'agregats de Rab7 en les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. A més, un cop més, es produeix una reducció de la mida dels nuclis de les cèl·lules tractades amb sorbitol (Figura 46).



**Figura 46.** Agregació de Rab7 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia FUS. Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de Rab7 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1µM, 10µM) i sorbitol (0.4M) durant 4h. Barres amb una longitud de 5µM.

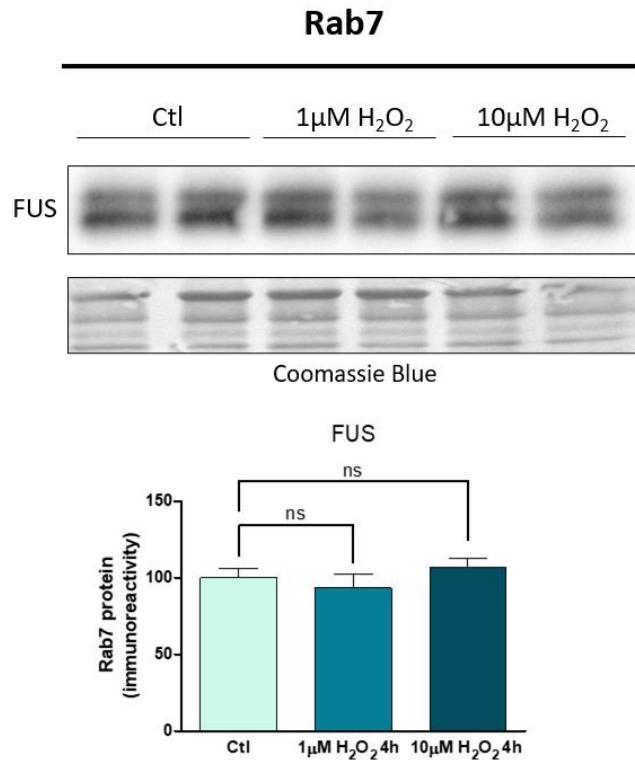
La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 47A). En el nucli, en canvi, es produeix una disminució del nombre d'agregats sota el mateix tractament respecte les control (Figura 47B). Pel que fa a la intensitat dels agregats de Rab7 en el citosol no es detecten canvis significatius en cap dels tractaments utilitzats (Figura 47C) i en canvi en el nucli disminueix aquesta sota el tractament a 0.4M de sorbitol respecte les control (Figura 47D).



**Figura 47. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de Rab7 sota l'estrès osmòtic induït amb sorbitol en les cèl·lules de la línia FUS.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de Rab7 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de Rab7 en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de Rab7 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de Rab7 en el citosol en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de Rab7 en el nucli de les cèl·lules tractades a

0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

Tampoc es mostren canvis de Rab7 analitzat per Western Blot en cap de les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades respecte les control (Figura 48).



**Figura 48.** Els nivells de Rab7 no es troben alterats sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia FUS. Analitzat per Western Blot en la línia cel·lular FUS sota l'estrès induït amb peròxid d'hidrogen a 1µM i 10µM durant 4h de tractament. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. No es detecten canvis significatius en els nivells de Rab7 sota el tractament amb peròxid d'hidrogen respecte les control. (n=2 per cada condició). ns Indica  $p > 0.05$  per one-way ANOVA.

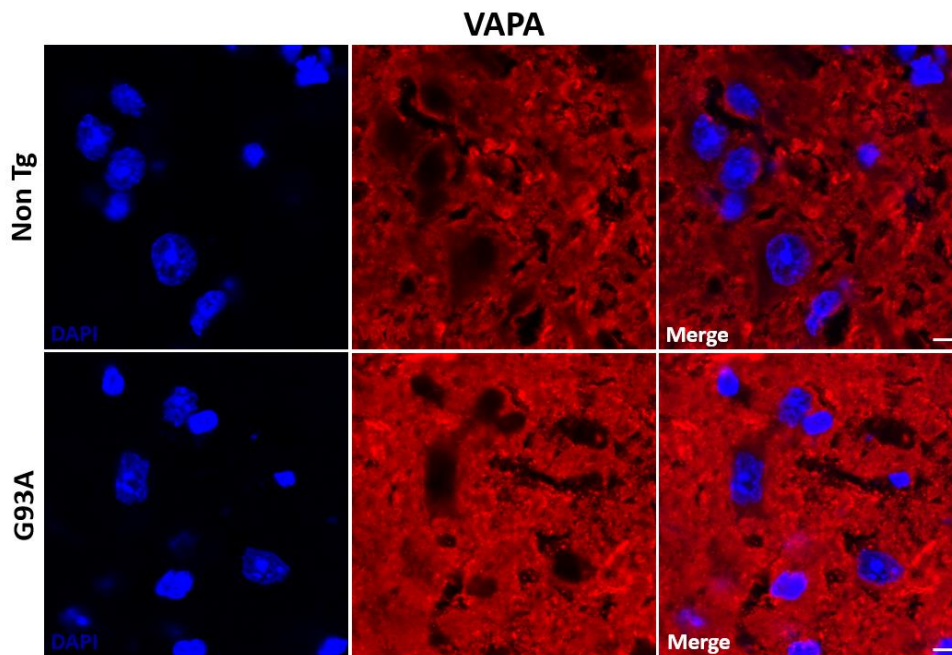
## 5.2. Alteració en proteïnes encarregades de la comunicació entre orgànuls

S'ha analitzat el nombre d'agregats i la intensitat de VAPA i VAPB, proteïnes encarregades de la comunicació entre orgànuls, en els dos models estudiats: en seccions de medulla espinal lumbar de ratolí als 150 dies d'edat, G93A i no transgènic, i en línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, en la línia control, en la línia C9orf72 i en la línia FUS.

### 5.2.1. Anàlisi en seccions de medul·la espinal lumbar de ratolins G93A

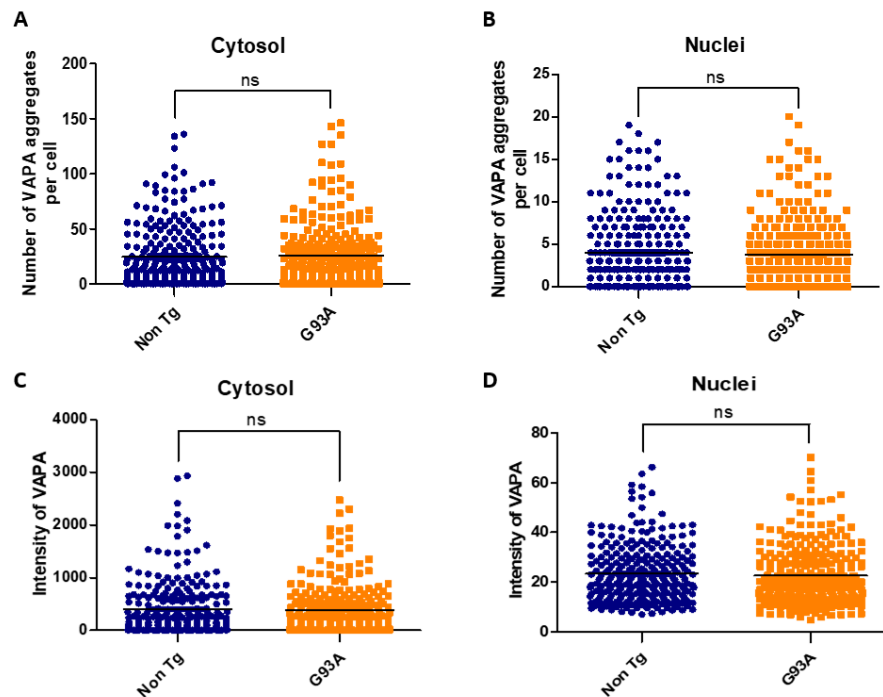
S'ha analitzat el nombre d'agregats de VAPA i VAPB tant en el citosol com en el nucli de les cèl·lules presents en la regió ventral de la medul·la espinal lumbar dels ratolins.

Les imatges obtingudes per microscopia confocal no mostren diferències en quant als agregats de VAPA en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 49).



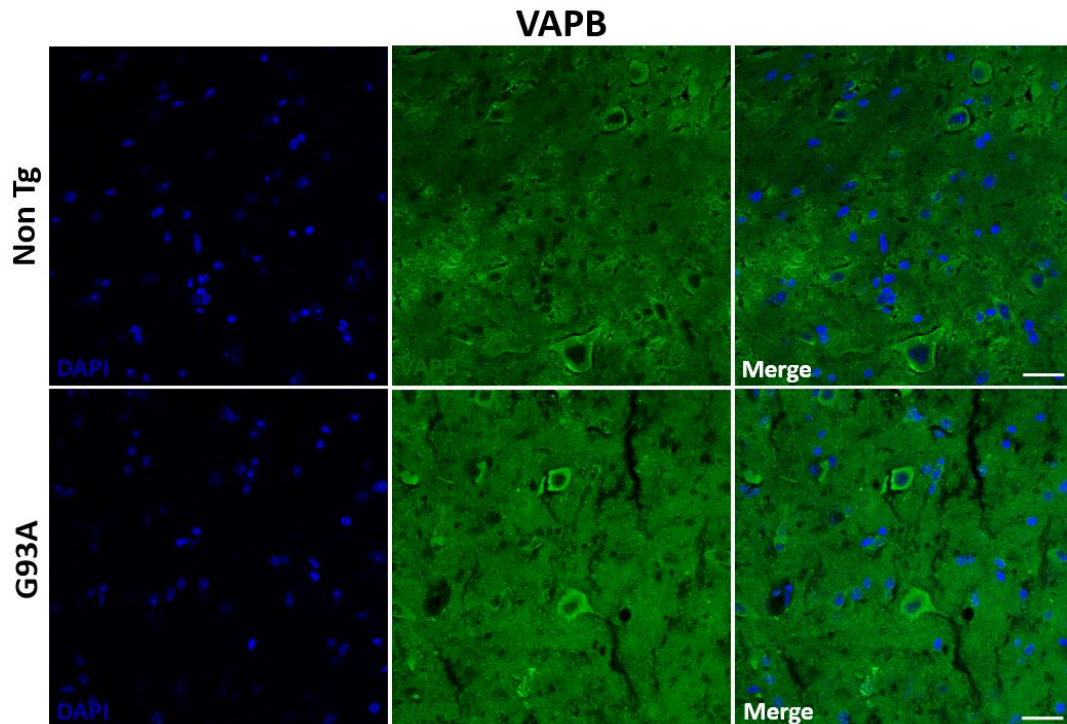
**Figura 49. Agregació de VAPA en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de VAPA en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. Barres amb una longitud de 5µM. (n=2 ratolins per cada genotip).

Els resultats obtinguts en la quantificació de VAPA no mostren canvis significatius en el nombre d'agregats ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 50A i 50B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats tampoc s'observen diferències significatives en cap de les dues localitzacions cel·lulars respecte els ratolins no transgènics (Figura 50C i 50D).



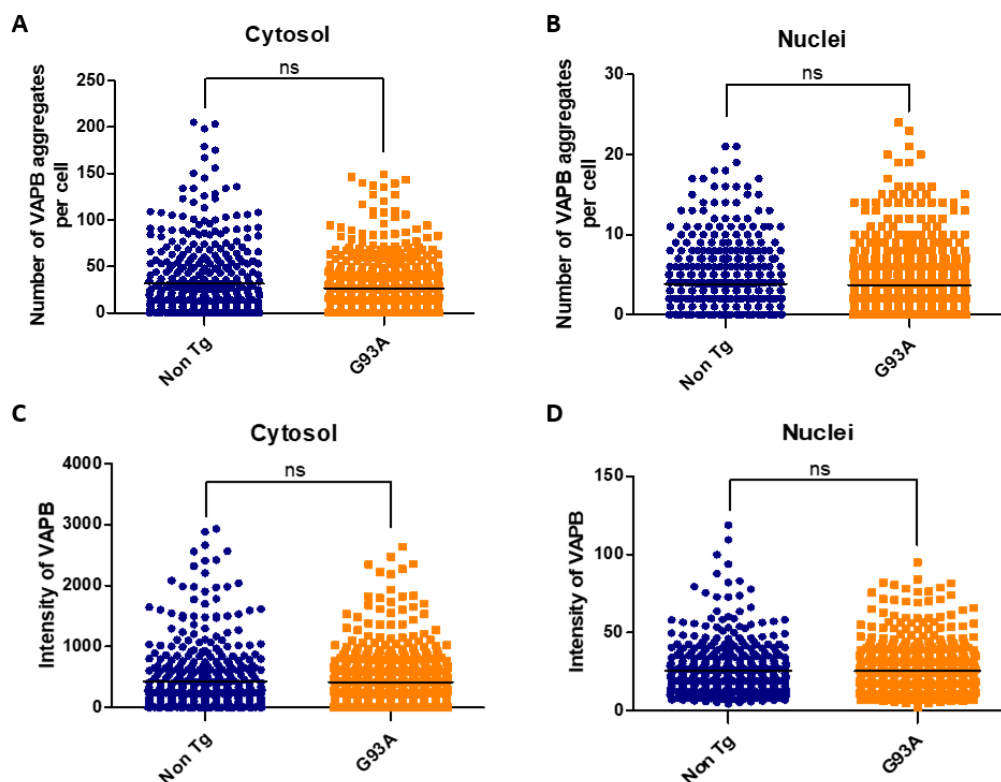
**Figura 50.** El nombre d'agregats de VAPA no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de VAPA en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de VAPA en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPA en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=2 ratolins per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test.

Pel que fa a VAPB, les imatges obtingudes per microscopia confocal tampoc mostren diferències en el nombre d'agregats de proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 51).



**Figura 51. Agregació de VAPB en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de VAPB en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. Barres amb una longitud de 20 $\mu$ M. (n=2 ratolins per cada genotip).

Tal i com s'ha pogut observar en les imatges presentades anteriorment, la quantificació tampoc mostra canvis significatius en el nombre d'agregats de VAPB ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 52A i 52B). Tampoc es produeixen canvis en la intensitat d'aquests agregats en cap dels dos compartiments cel·lulars (Figura 52C i 52D).



**Figura 52.** El nombre d'agregats de VAPB no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de VAPB en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de VAPB en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPB en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=2 ratolí per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test.

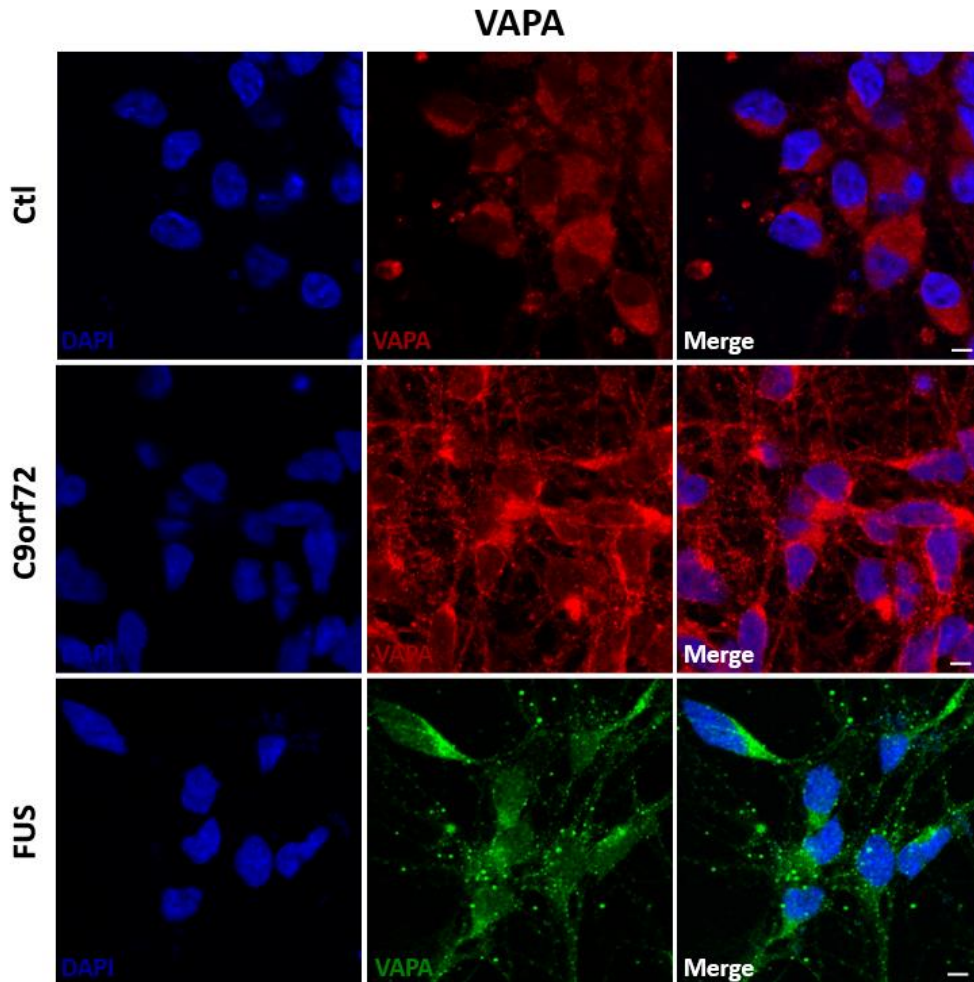
### 5.2.2. Anàlisi en el model cel·lular de motoneurons derivades de pacients

S'ha analitzat el nombre d'agregats i la intensitat de VAPA i VAPB, en tres línies de motoneurons derivades de pacients: línia control, línia C9orf72 i línia FUS. A més a més, s'ha analitzat també els seus nivells sota una situació d'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen i sota estrès osmòtic induït amb sorbitol.



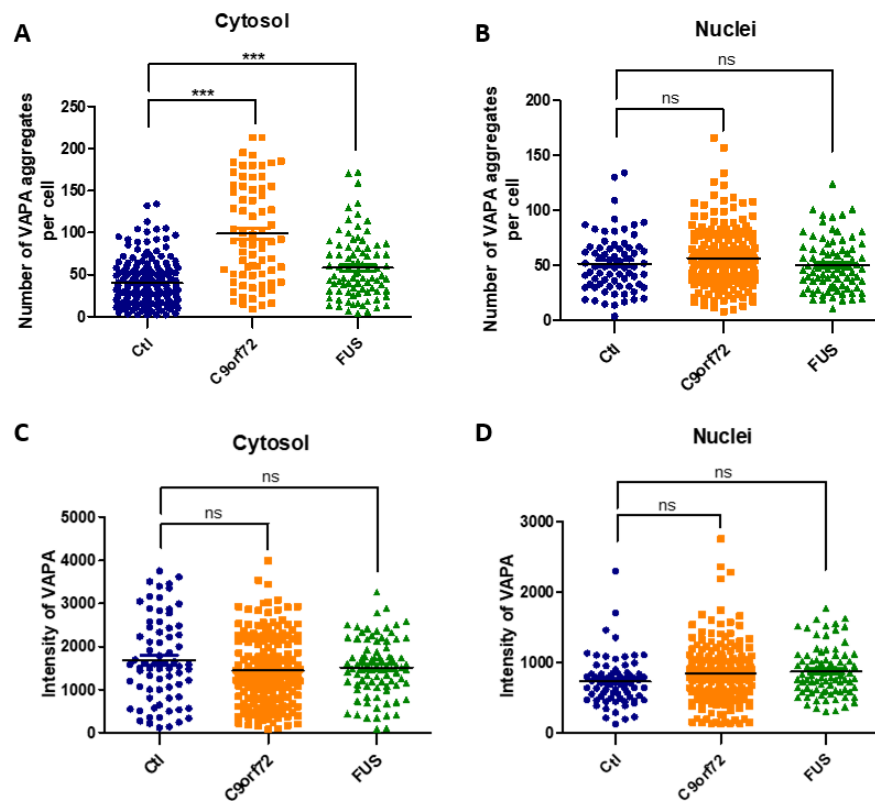
### 5.2.2.1. VAPA

Les imatges obtingudes per microscopia confocal de VAPA mostren un augment de la proteïna en les cèl·lules tant de la línia C9orf72 com de la línia FUS respecte la control (Figura 53).



**Figura 53. Agregació de VAPA en les cèl·lules de línia control, C9orf72 i FUS.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de VAPA en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

Els resultats obtinguts en la quantificació per VAPA, tal i com s'ha observat anteriorment, mostren un augment significatiu del nombre d'agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control (Figura 54A). En el nucli en canvi, no es detecten canvis en cap de les línies respecte la control (Figura 54B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats ni en el citosol ni en el nucli es produeixen canvis significatiu en cap de les dues línies respecte la control (Figura 54C i 54D).

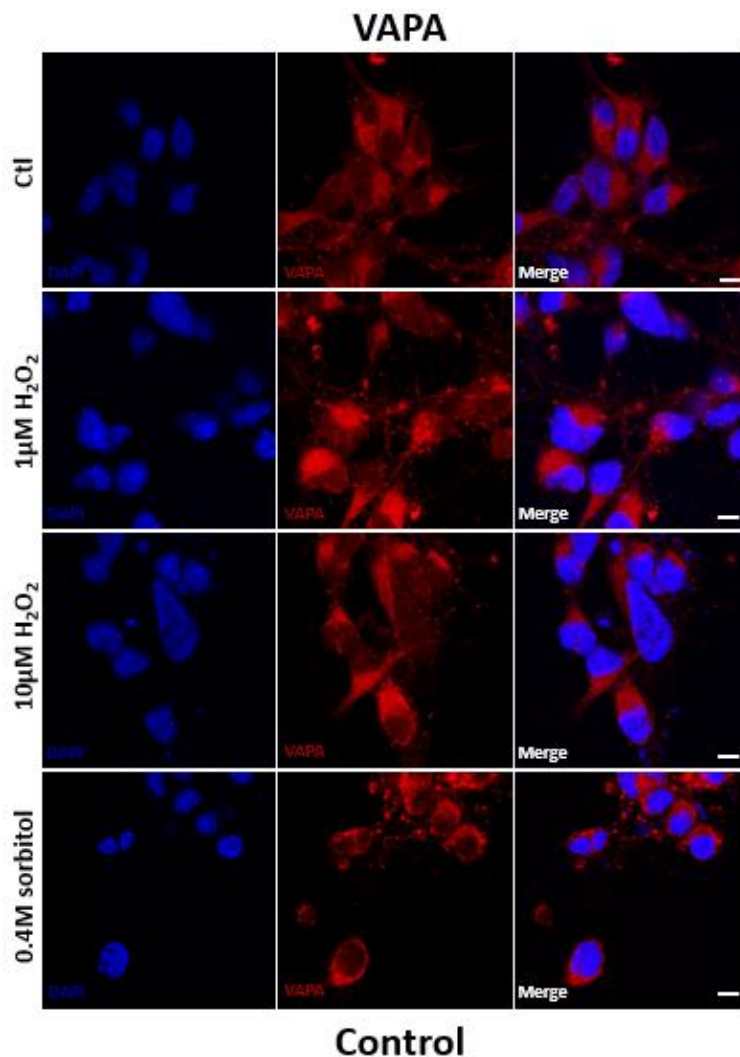


**Figura 54. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPA en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de VAPA en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(B)** No es detecten canvis significatiu en el nombre d'agregats de VAPA en el nucli de les cèl·lules en cap de les línies analitzades respecte la control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules en cap de les línies analitzades respecte la control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPA en el nucli de les cèl·lules en cap de les línies analitzades respecte la control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

Per altra banda s'ha analitzat l'efecte de dos estressors a nivell d'agregació proteica de VAPA. Les cèl·lules de les tres línies van ser tractades amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  durant 4h de tractament (estrès oxidatiu) i sorbitol a  $0.4\text{M}$  també durant 4h (estrès osmòtic).

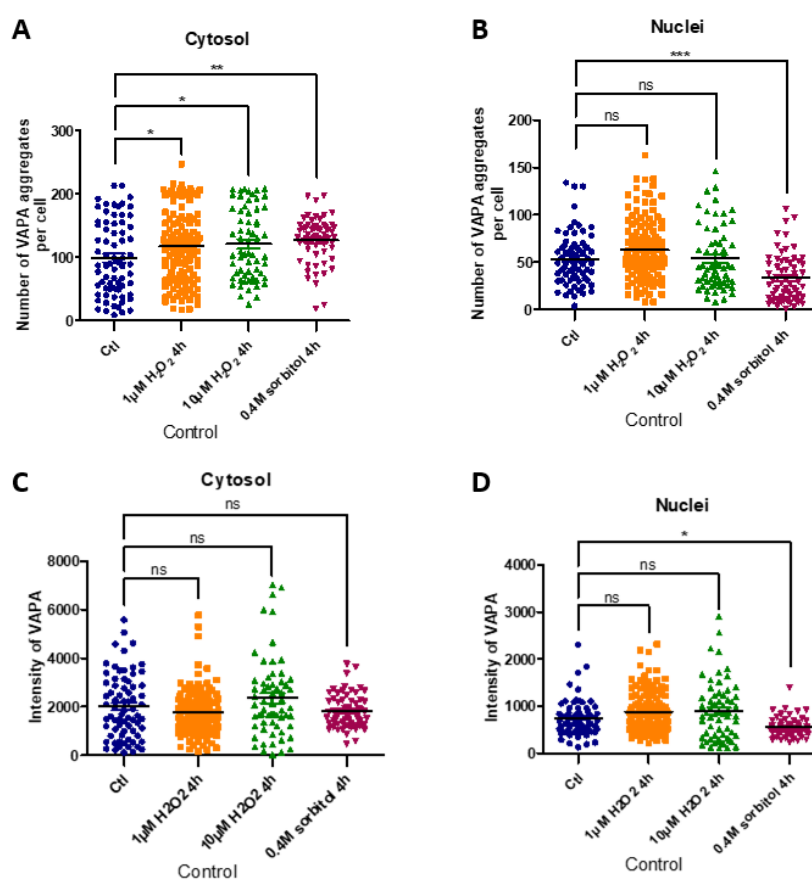
### 5.2.2.1.1. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPA en les cèl·lules de la línia control

Les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren un augment del nombre d'agregats de VAPA en les cèl·lules tractades amb peròxid d'hidrogen, tant a  $1\mu\text{M}$  com a  $10\mu\text{M}$ , i a  $0.4\text{M}$  de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 55).



**Figura 55. Agregació de VAPA sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia control.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de VAPA en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) i sorbitol ( $0.4\text{M}$ ) durant 4h. Barres amb una longitud de  $5\mu\text{M}$ .

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules tractades en ambdues concentracions de peròxid d'hidrogen, 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M, i també a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 56A). En canvi, en el nucli disminueixen sota el tractament a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 56B). Pel que fa a la intensitat dels agregats, en el citosol de les cèl·lules no es detecten canvis significatius en cap dels tractaments utilitzats (Figura 56C) i en el nucli disminueix sota el tractament amb sorbitol respecte les control (Figura 56D).

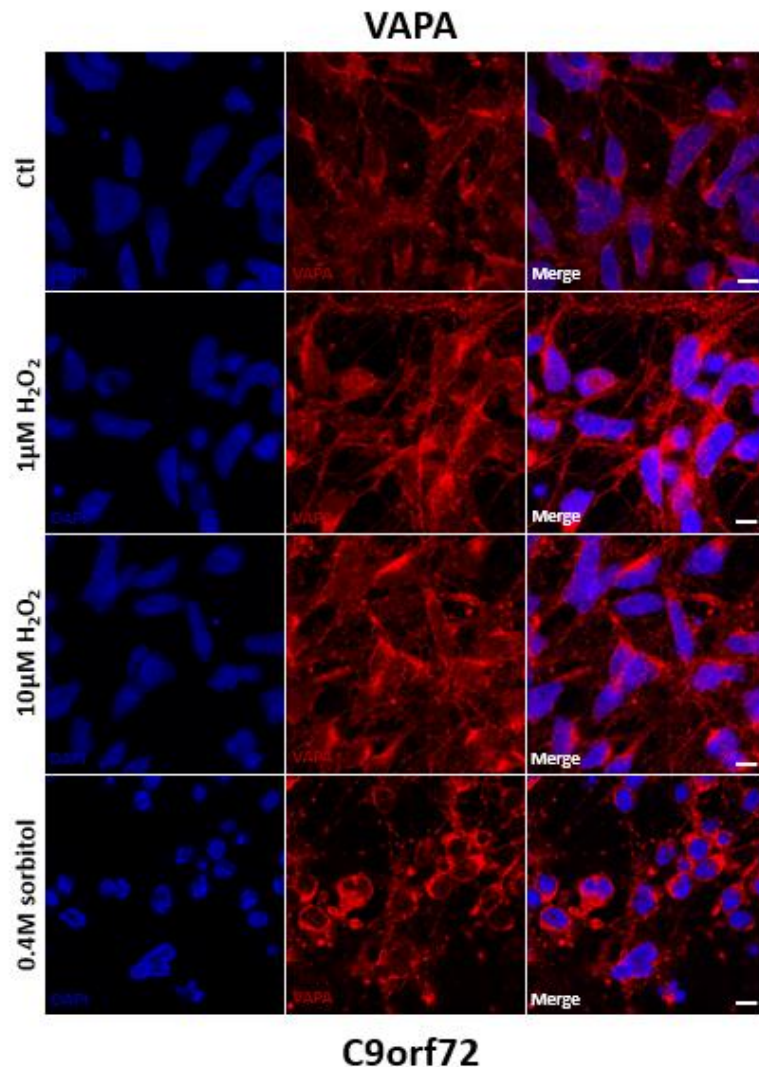


**Figura 56.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPA sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia control. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de VAPA en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurones derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats, tant amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com amb sorbitol durant 4h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de VAPA en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat

dels agregats de VAPA en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de VAPA en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  per one-way ANOVA.

### 5.2.2.1.2. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPA en les cèl·lules de la línia C9orf72

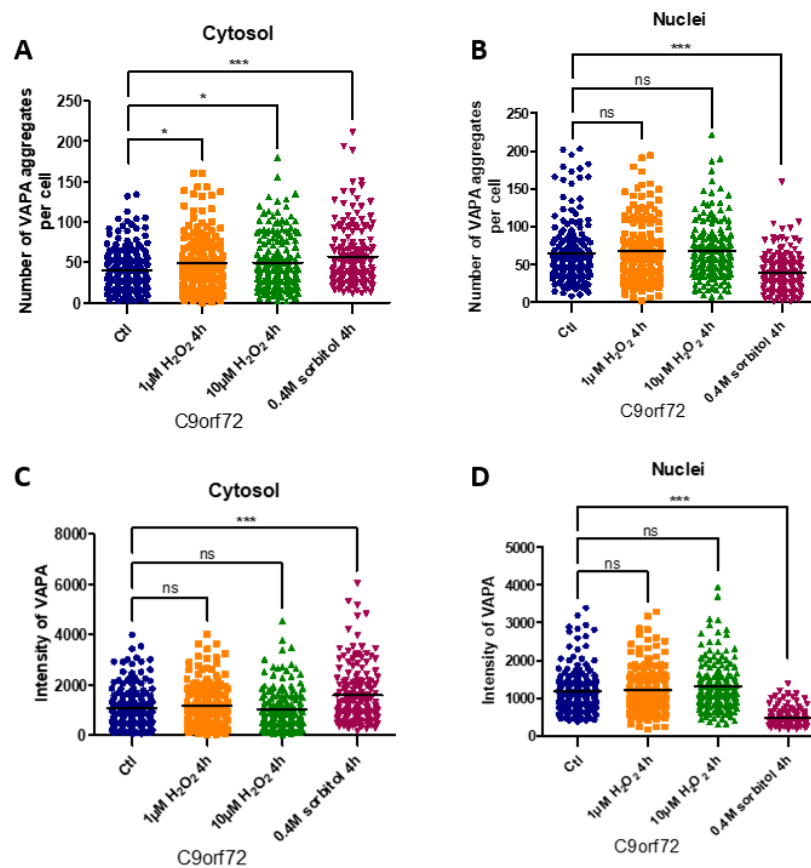
Les imatges per microscopia confocal de VAPA mostren un augment de la proteïna sota tots els tractaments utilitzats, tant amb peròxid d'hidrogen, a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$ , com amb sorbitol a 0.4M durant 4h, respecte les control (Figura 57).



**Figura 57.** Agregació de VAPA sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72. Analtitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de VAPA en les

cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) i sorbitol ( $0.4\text{M}$ ) durant 4h. Barres amb una longitud de  $5\mu\text{M}$ .

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats, tant amb peròxid d'hidrogen com amb sorbitol, durant 4h respecte les control (Figura 58A). En el nucli, per contra, es produeix una disminució del nombre d'agregats d'aquesta proteïna solament en les cèl·lules tractades a  $0.4\text{M}$  de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 58B). Pel que fa a la intensitat dels agregats, augmenta en el citosol únicament sota el tractament amb sorbitol respecte les control (Figura 58C) i disminueix en el nucli també sota el mateix tractament (Figura 58D).

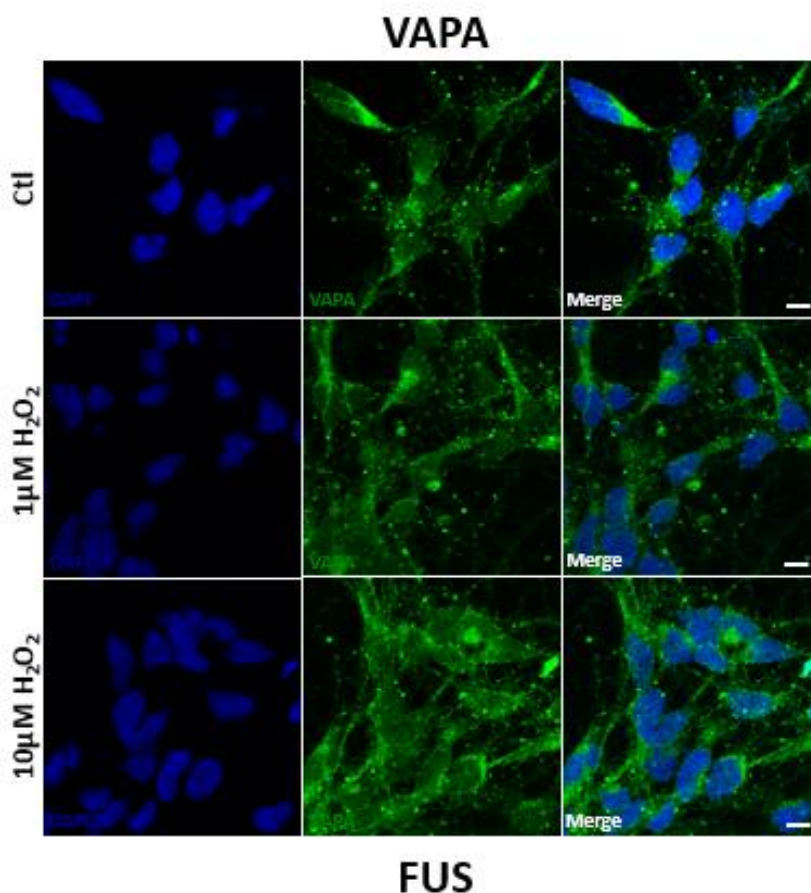


**Figura 58.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPA sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia C9orf72. Anàlitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de VAPA en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats, tant amb  $\text{H}_2\text{O}_2$  com amb sorbitol durant 4h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de VAPA en el nucli de les cèl·lules tractades

a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de VAPA en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

### 5.2.2.1.3. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPA en les cèl·lules de la línia FUS

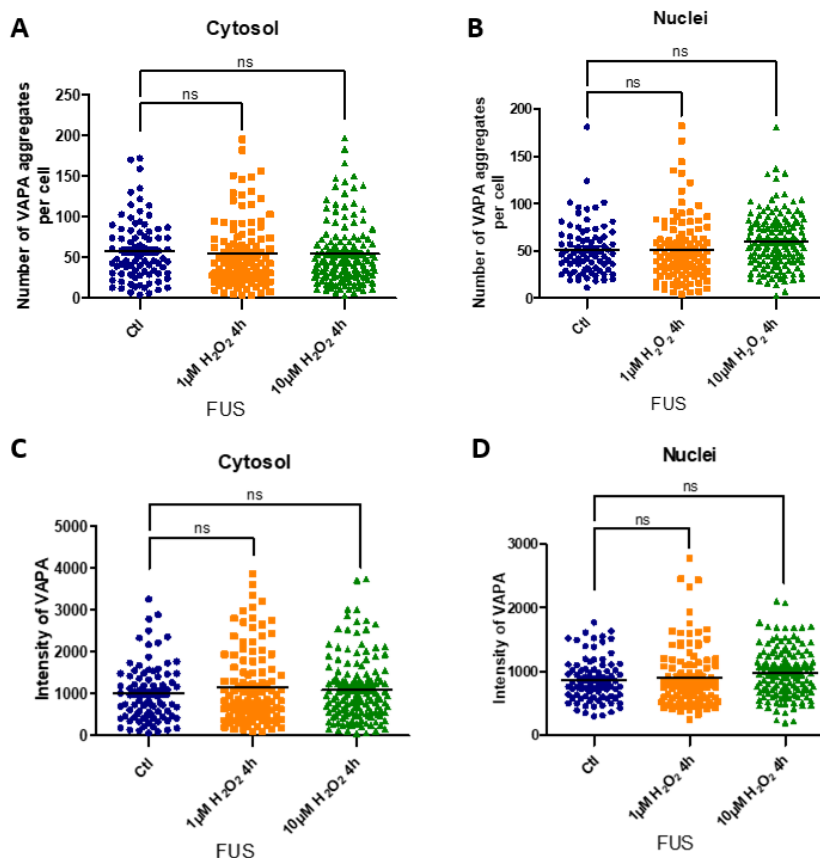
Les imatges obtingudes per microscopia confocal de VAPA no mostren diferències en quant als nivells de la proteïna en les cèl·lules en cap de les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades, ni a  $1\mu\text{M}$  ni a  $10\mu\text{M}$ , respecte les control (Figura 59).



**Figura 59. Agregació de VAPA sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia FUS.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de VAPA en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) durant 4h. Barres amb una longitud de  $5\mu\text{M}$ .

La quantificació en aquest cas tampoc mostra diferències significatives en el nombre d'agregats de VAPA ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions

de peròxid d'hidrogen utilitzades, ni a  $1\mu\text{M}$  ni a  $10\mu\text{M}$ , respecte les control (Figura 60A i 60B). Pel que fa a la intensitat, tampoc s'observen diferències significatives en cap de les localitzacions cel·lulars ni en cap de les concentracions de peròxid d'hidrogen (Figura 60C i 60D).

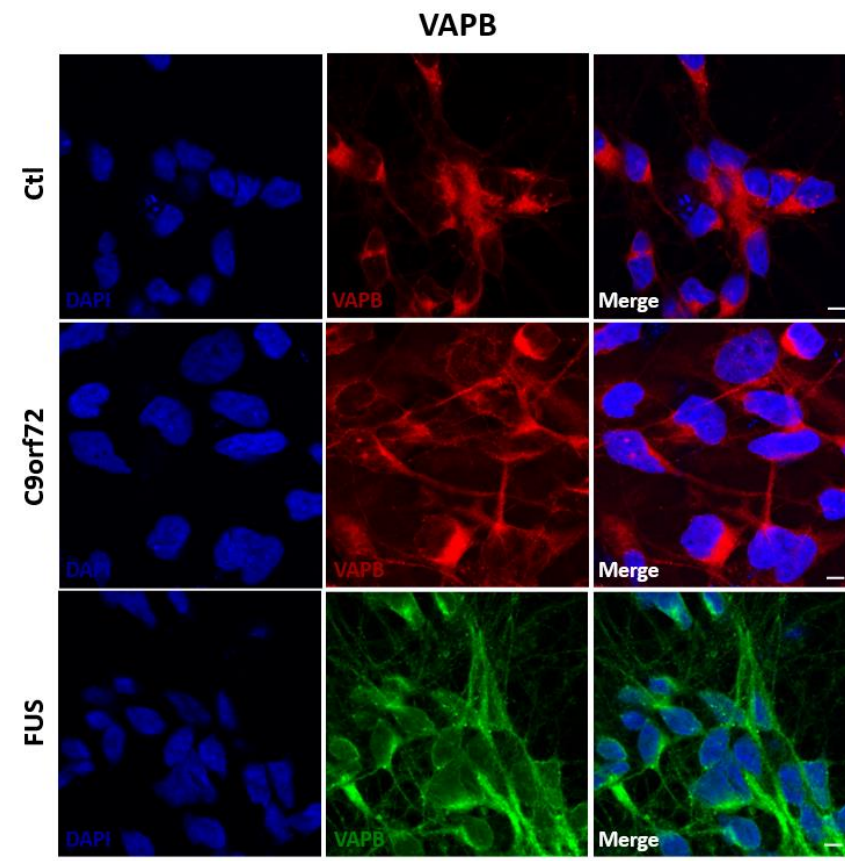


**Figura 60.** El nombre d'agregats de VAPA no es troba alterat en cap de les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades en les cèl·lules de la línia FUS. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de VAPA en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules en cap de les concentracions de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilitzades respecte les control. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de VAPA en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilitzades respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPA en el citosol de les cèl·lules en cap de les concentracions de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilitzades respecte les control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPA en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilitzades respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$  per one-way ANOVA.



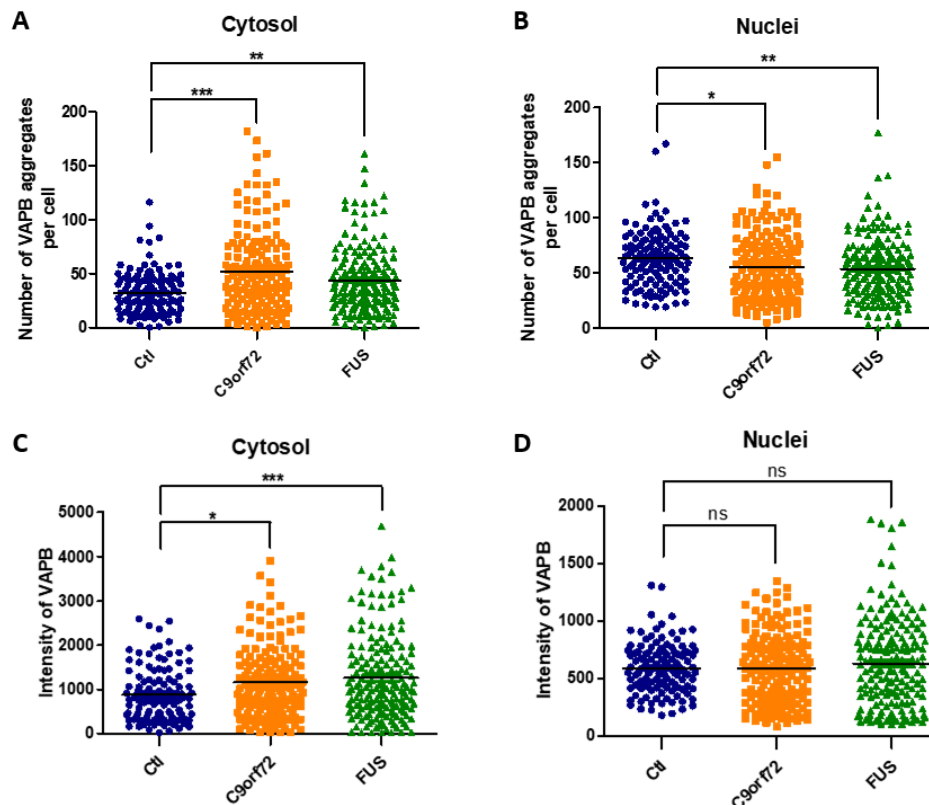
### 5.2.2.2. VAPB

Les imatges obtingudes per microscopia confocal de VAPB mostren un augment de la proteïna en les cèl·lules tant de la línia C9orf72 com de la línia FUS respecte les cèl·lules de la línia control (Figura 61).



**Figura 61. Agregació de VAPB en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de VAPB en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

Els resultats obtinguts en la quantificació, tal i com s'ha comentat anteriorment, mostren un augment significatiu del nombre d'agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules tant de la línia C9orf72 com de la FUS respecte la control (Figura 62A). En el nucli, en canvi, disminueix el nombre d'agregats en ambdues línies respecte la control (Figura 62B). Pel que fa a l'anàlisi de la intensitat dels agregats, augmenta en el citosol tant en les cèl·lules de la línia C9orf72 com de la FUS respecte la control (Figura 62C) i en el nucli no es detecten canvis significatius en cap de les línies analitzades (Figura 62D).

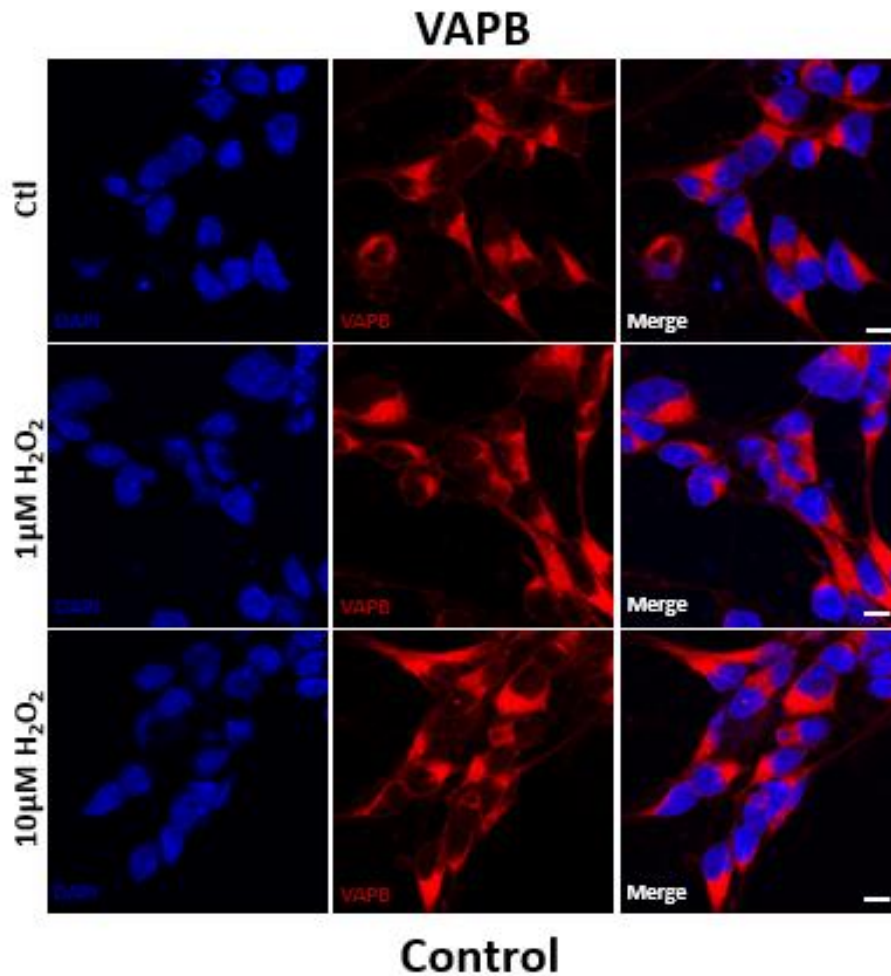


**Figura 62. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPB en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de VAPB en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de VAPB en el nucli de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPB en cap de les línies analitzades respecte la control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

D'igual forma, s'ha analitzat l'efecte de l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen, a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$ , i de l'estrès osmòtic induït amb sorbitol a  $0.4\text{M}$ , ambdós tractaments durant 4h, sobre l'agregació proteica de VAPB en les tres línies analitzades.

### 5.2.2.2.1. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPB en les cèl·lules de la línia control

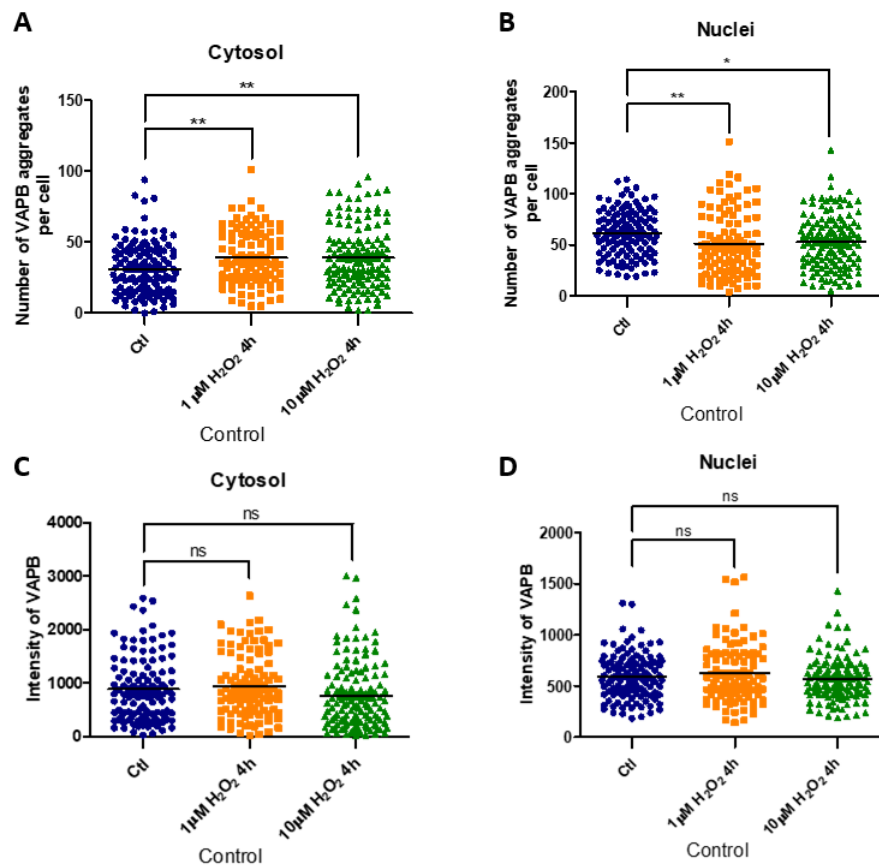
Les imatges obtingudes per microscopia confocal de VAPB mostren un augment del nombre d'agregats de la proteïna en les cèl·lules tractades en ambdues concentracions de peròxid d'hidrogen, 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M, durant 4h respecte les control (Figura 63).



**Figura 63.** Agregació de VAPB sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia control. Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de VAPB en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) durant 4h. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

Tal i com s'ha observat anteriorment, la quantificació obtinguda mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules sota ambdues concentracions de peròxid, 1 $\mu$  i 10 $\mu$ M, durant 4h respecte les control (Figura 64A). En canvi, en el nucli es produeix una disminució d'aquests agregats en les dues concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecte les control (Figura 64B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats no es

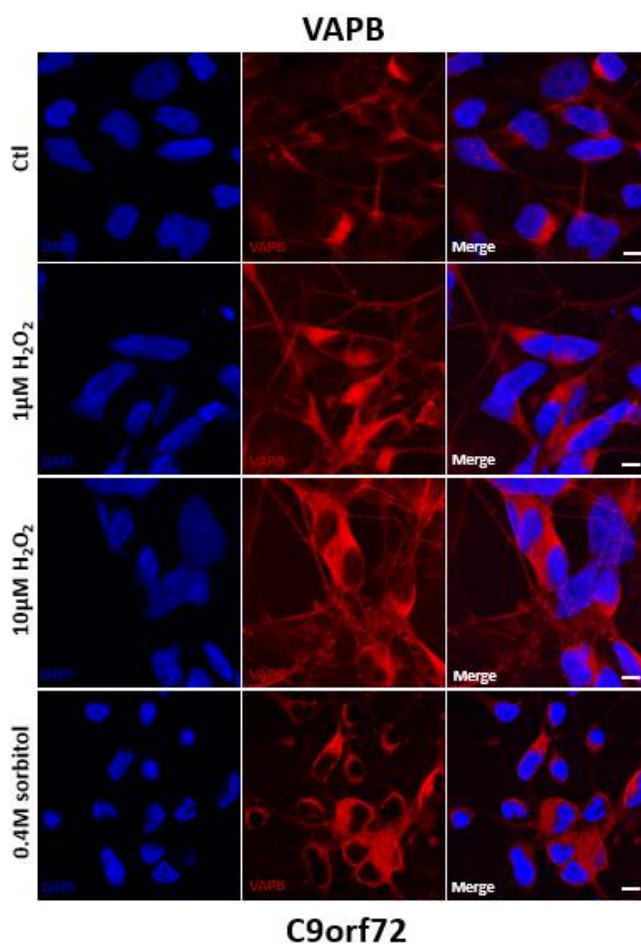
detecten canvis en cap de les localitzacions cel·lulars ni en cap de les concentracions de  $H_2O_2$  utilitzades respecte les control (Figura 64C i 64D).



**Figura 64. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPB sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia control.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de VAPB en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de  $H_2O_2$  utilitzades respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de VAPB en el nucli de les cèl·lules sota totes les concentracions de  $H_2O_2$  respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules en cap de les concentracions de  $H_2O_2$  utilitzades respecte les control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPB en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de  $H_2O_2$  utilitzades respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  per one-way ANOVA.

### 5.2.2.2.2. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPB en les cèl·lules de la línia C9orf72

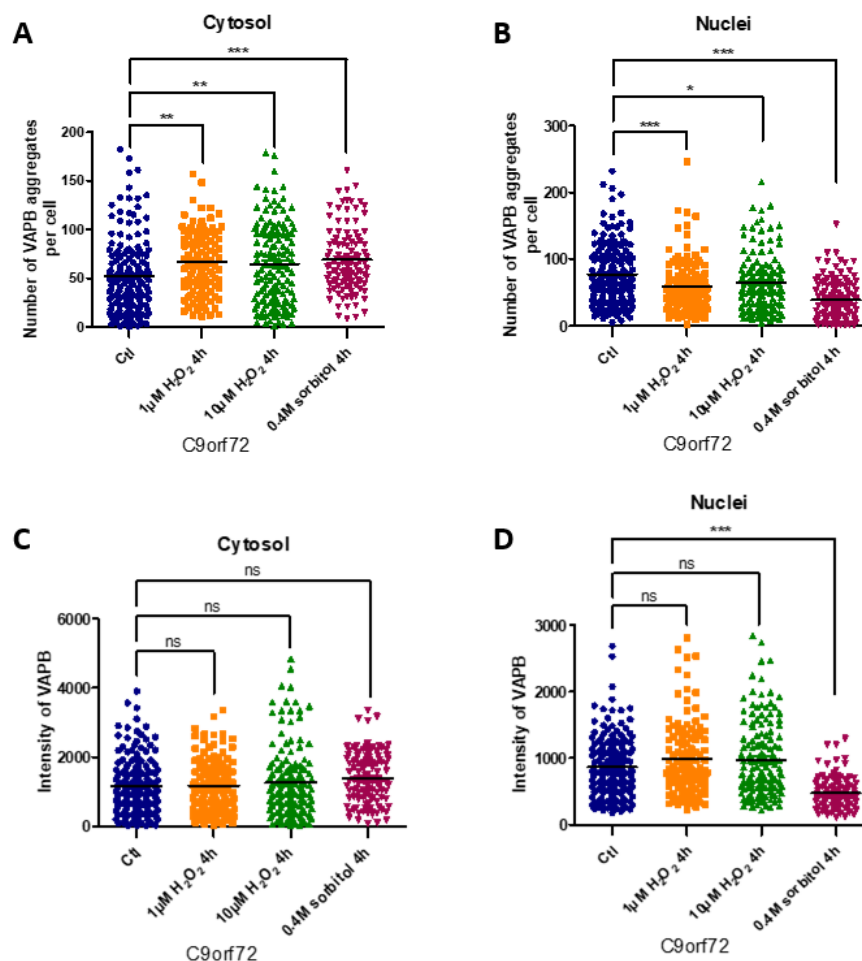
Les imatges obtingudes per microscopia confocal de VAPB mostren un augment del nombre d'agregats de la proteïna en les cèl·lules tractades tant amb peròxid d'hidrogen, a 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M, com a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. També es pot observar una disminució de la mida nuclear en les cèl·lules tractades amb sorbitol (Figura 65).



**Figura 65.** Agregació de VAPB sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72. Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de VAPB en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) i sorbitol (0.4M) durant 4h. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

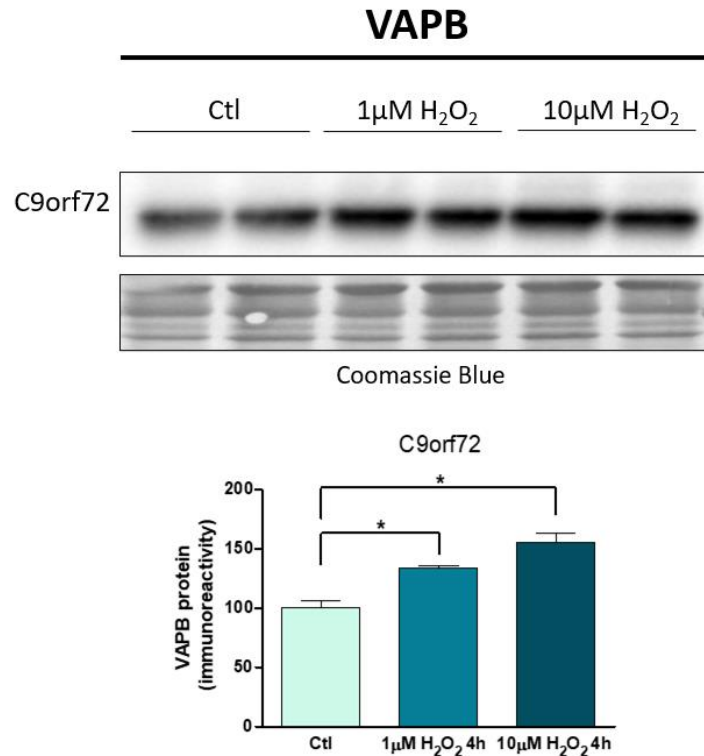
Tal i com s'ha observat anteriorment, els resultats obtinguts en la quantificació mostren un augment significatiu del nombre d'agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats, tant amb peròxid d'hidrogen a 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M, com a 0.4M de sorbitol, ambdós durant 4h, respecte les control (Figura 66A). En el nucli però, es produeix

una disminució significativa del nombre d'agregats de la proteïna sota tots els tractaments utilitzats respecte les control (Figura 66B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats, en el citosol no es detecten canvis significatius en cap dels tractaments (Figura 66C) i en el nucli es produeix una disminució d'aquesta sota el tractament a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 66D).



**Figura 66.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de VAPB sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia C9orf72. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de VAPB en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de VAPB en el nucli de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de VAPB en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

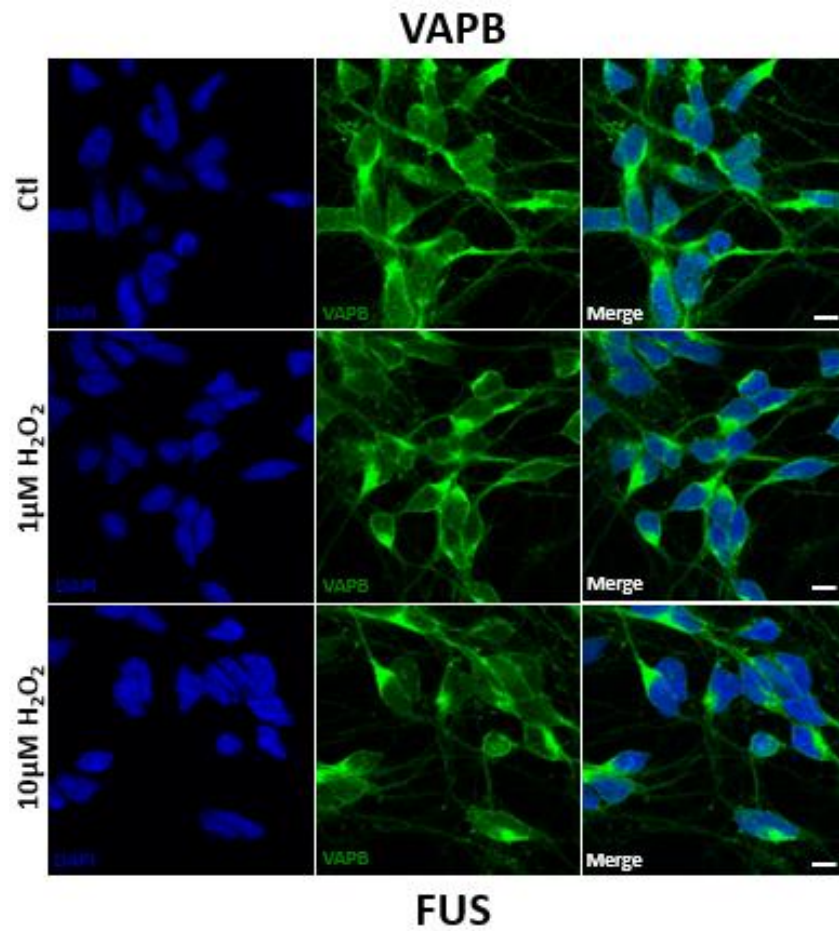
Els resultats obtinguts es van poder confirmar també per Western Blot, mostrant un augment significatiu dels nivells de VAPB sota el tractament a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen durant 4h respecte les control (Figura 67).



**Figura 67. Alteració en els nivells de VAPB sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia C9orf72.** Analitzat per Western Blot en la línia cel·lular C9orf72 sota l'estrès amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  durant 4h de tractament. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. Augment significatiu dels nivells de VAPB en les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen durant 4h respecte les control. (n=2 per cada condició). \* Indica  $p < 0.05$  per one-way ANOVA.

### 5.2.2.2.3. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de VAPB en les cèl·lules de la línia FUS

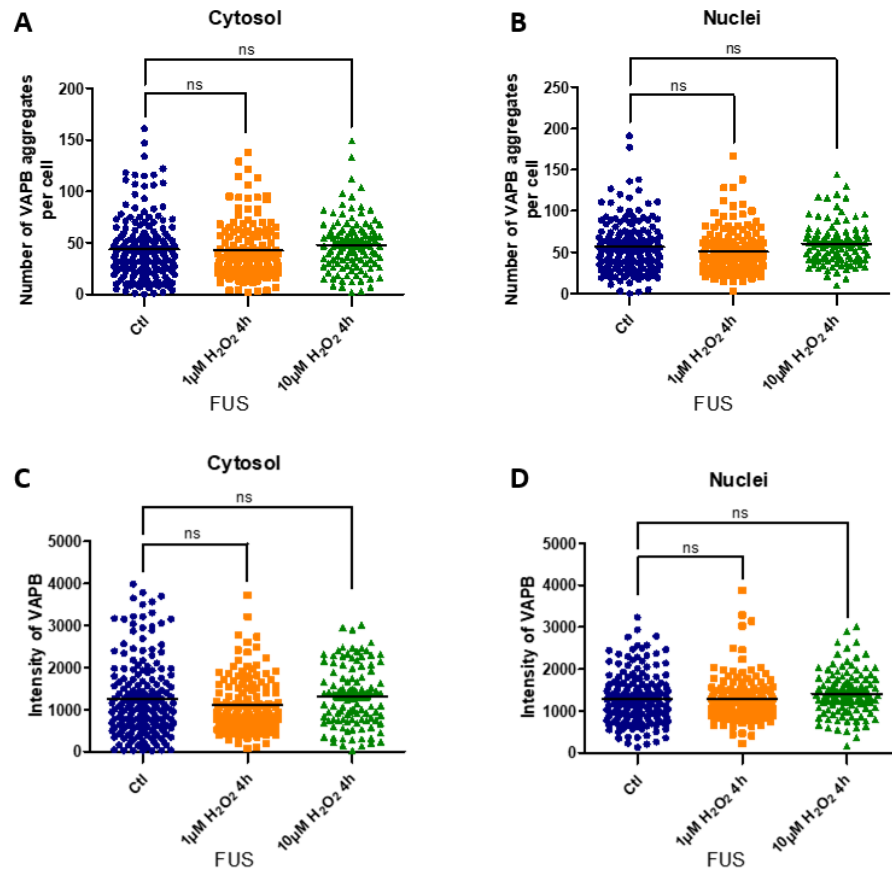
Per últim, en la línia FUS, les imatges obtingudes per microscopia confocal de VAPB no mostren diferències en el nombre d'agregats de la proteïna en cap de les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades, ni a  $1\mu\text{M}$  ni a  $10\mu\text{M}$ , respecte les control (Figura 68).



**Figura 68. Agregació de VAPB sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia FUS.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de VAPB en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1µM, 10µM) durant 4h. Barres amb una longitud de 5µM.

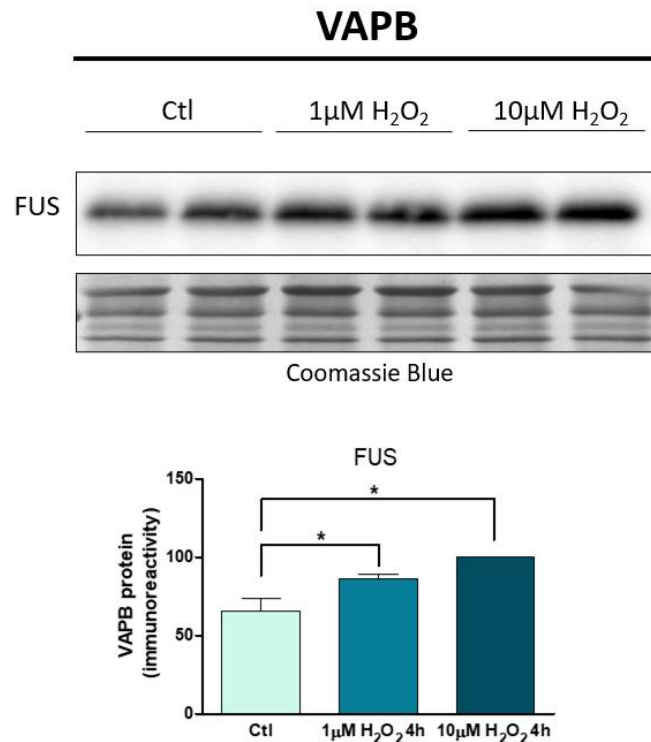
D'igual forma, els resultats obtinguts en la quantificació a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors no mostren diferències significatives en el nombre d'agregats de VAPB ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades, ni a 1µM ni a 10µM, respecte les control (Figura 69A i 69B). En la intensitat d'aquests agregats tampoc es produeixen canvis significatius en cap de les dues localitzacions cel·lulars ni en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 69C i 69D).





**Figura 69.** El nombre d'agregats de VAPB no es troba alterat en cap de les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades en les cèl·lules de la línia FUS. Analtzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de VAPB en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecte les control. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de VAPB en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPB en el citosol de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecte les control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de VAPB en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$  per one-way ANOVA.

En canvi, en aquesta línia, per Western Blot si s'observa un augment significatiu dels nivells de la proteïna sota el tractament amb peròxid d'hidrogen, tant a 1µM com a 10µM, durant 4h respecte les control (Figura 70).



**Figura 70. Alteració en els nivells de VAPB sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia FUS.** Analitzat per Western Blot en la línia cel·lular FUS sota l'estrès amb peròxid d'hidrogen a 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M durant 4h de tractament. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. Augment significatiu dels nivells de VAPB en les cèl·lules tractades a 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M de peròxid d'hidrogen durant 4h respecte les control. (n=2 per cada condició). \* Indica p<0.05 per one-way ANOVA.

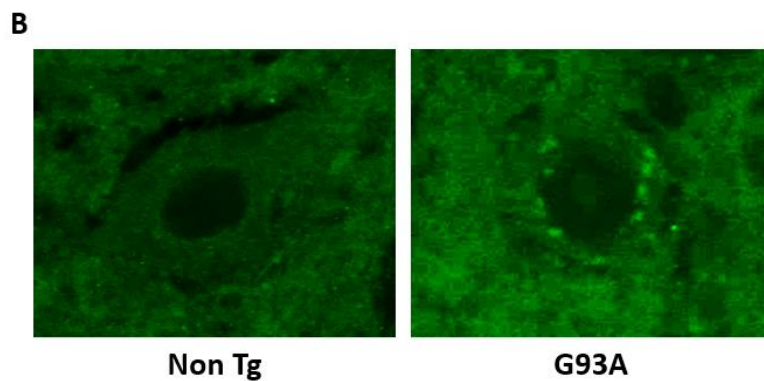
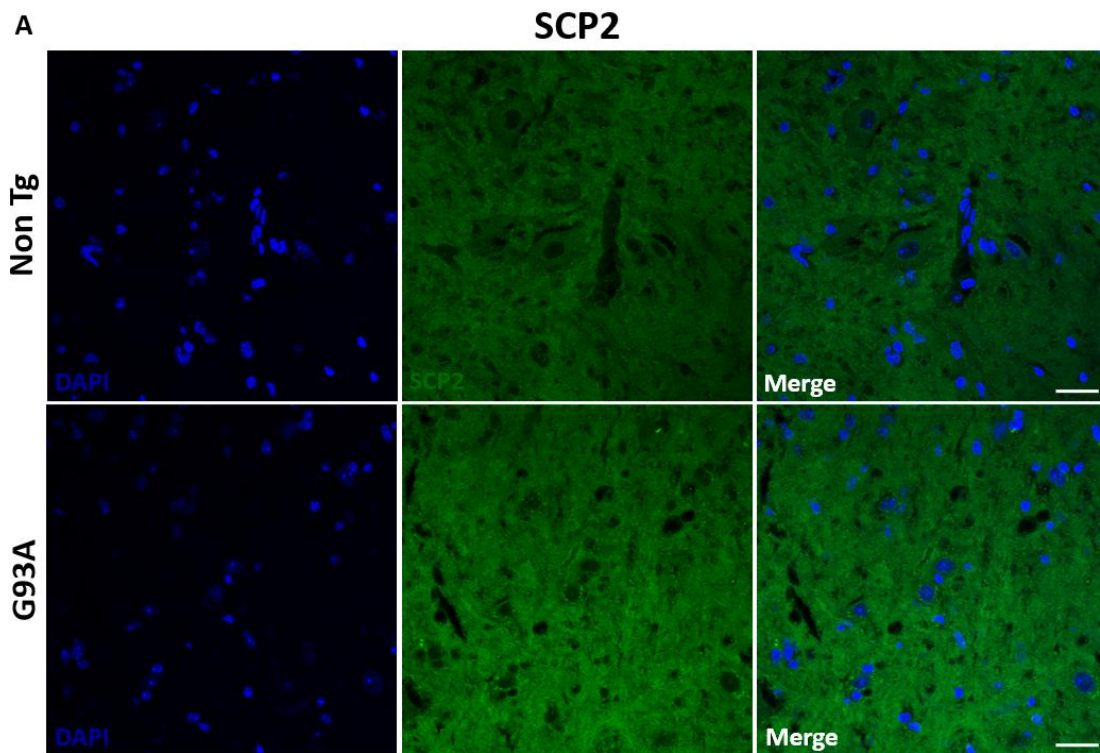
### 5.3. Alteració en proteïnes encarregades de la síntesi lipídica

S'ha analitzat el nombre d'agregats i la intensitat de SCP2, proteïna encarregada de la síntesi lipídica, en dos models: en seccions de medul·la espinal lumbar de ratolí als 150 dies d'edat, G93A i no transgènics, i en línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, en la línia control, en la línia C9orf72 i en la línia FUS. FADS2 únicament s'ha analitzat en seccions de medul·la espinal de ratolí també als 150 dies. Per altra banda, s'ha tingut l'oportunitat d'analitzar PKC $\beta$ II i PLC $\beta$ 1 en seccions de medul·la espinal de ratolí a diferents dies d'edat: 90 dies, 120 dies i 150 dies, per tal d'analitzar aquestes proteïnes durant el procés de neurodegeneració a mesura que avança la malaltia.

### 5.3.1. Anàlisi en seccions de medul·la espinal lumbar de ratolins G93A

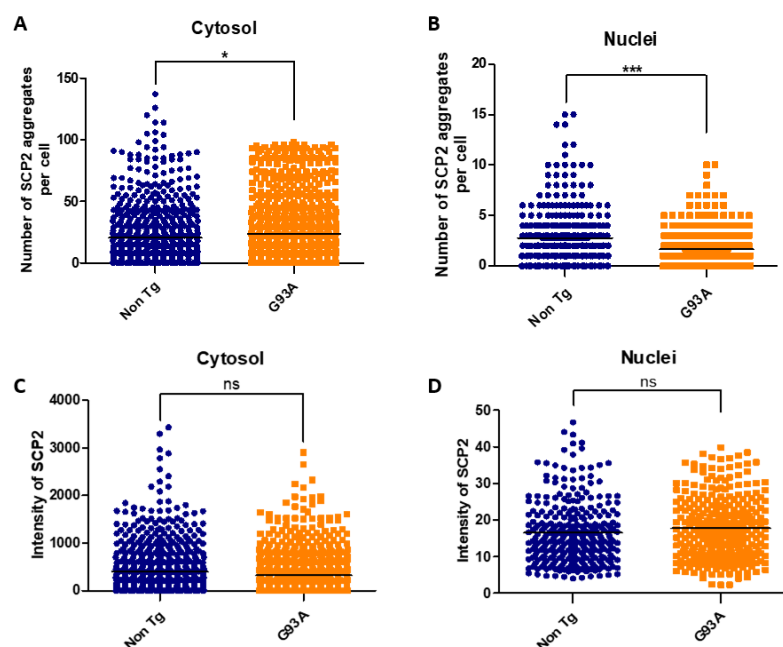
S'ha analitzat el nombre d'agregats de SCP2 i FADS2 tant en el citosol com en el nucli de les cèl·lules presents en la regió ventral de la medul·la espinal lumbar.

En les imatges obtingudes per microscopia confocal de SCP2 es mostra un augment de la proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 71A). A més a més, SCP2 es transloca des de la regió perinuclear a vesícules citoplasmàtiques en les motoneurons dels ratolins G93A (Figura 71B).



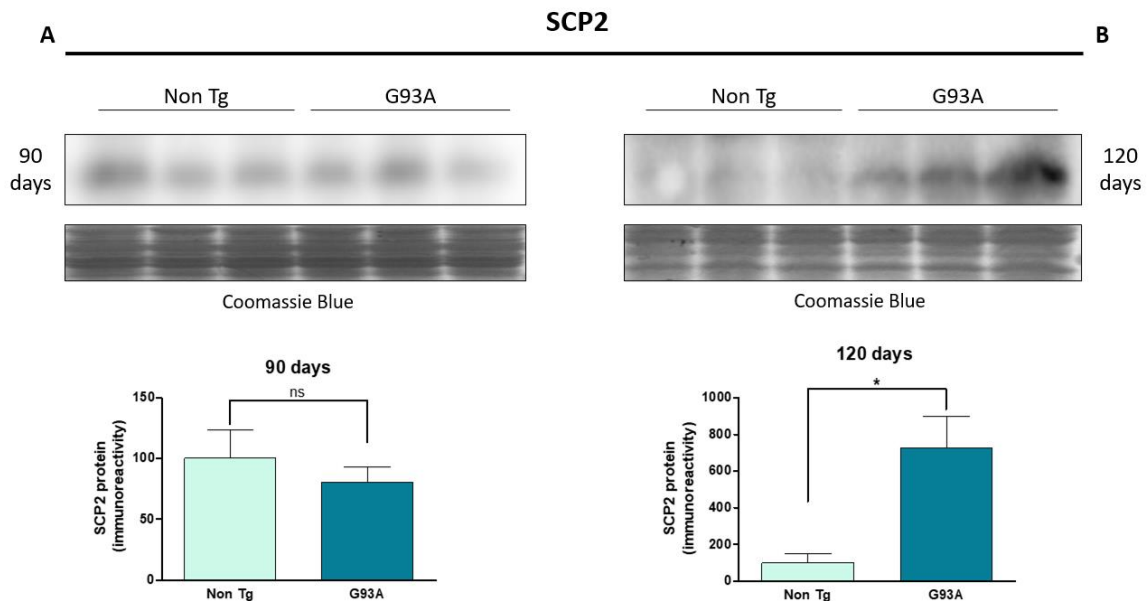
**Figura 71. Agregació de SCP2 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de SCP2 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. Barres amb una longitud de 20µM. (n=2 ratolí per cada genotip).

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 72A), en canvi en el nucli es produeix una disminució d'aquests agregats en els ratolins G93A (Figura 72B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats no s'observen diferències significatives ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 72C i 72D).



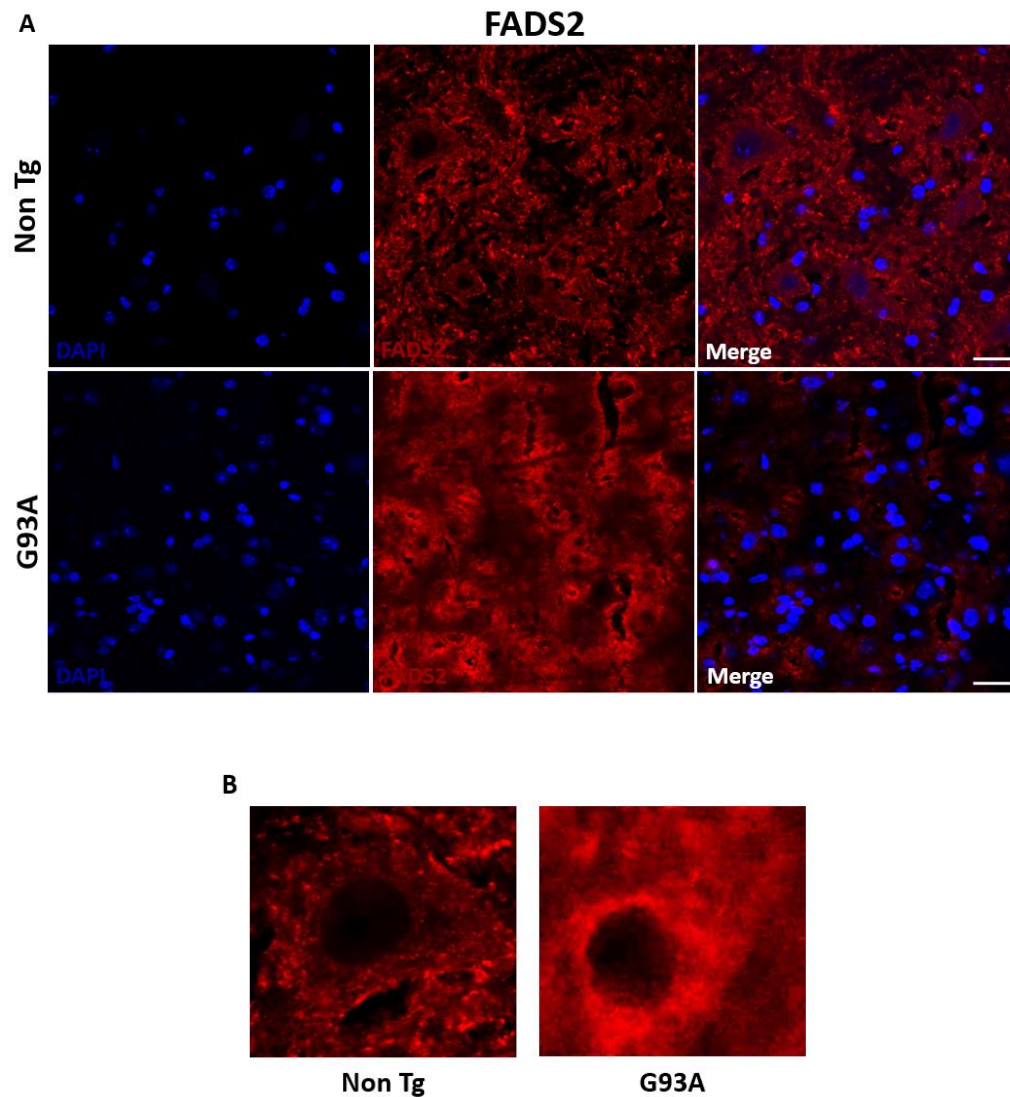
**Figura 72. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de SCP2 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de SCP2 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de SCP2 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de SCP2 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (n=2 ratolí per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per Student's t-test.

Es va quantificar aquesta proteïna també per Western Blot, en aquest cas en mostres de medul·la espinal de ratolins de 90 dies i 120 dies d'edat. Els resultats obtinguts no mostren canvis significatius en els nivells de SCP2 en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics als 90 dies d'edat (Figura 73A). En canvi, a l'edat de 120 dies es produeix un augment significatiu de la proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 73B).



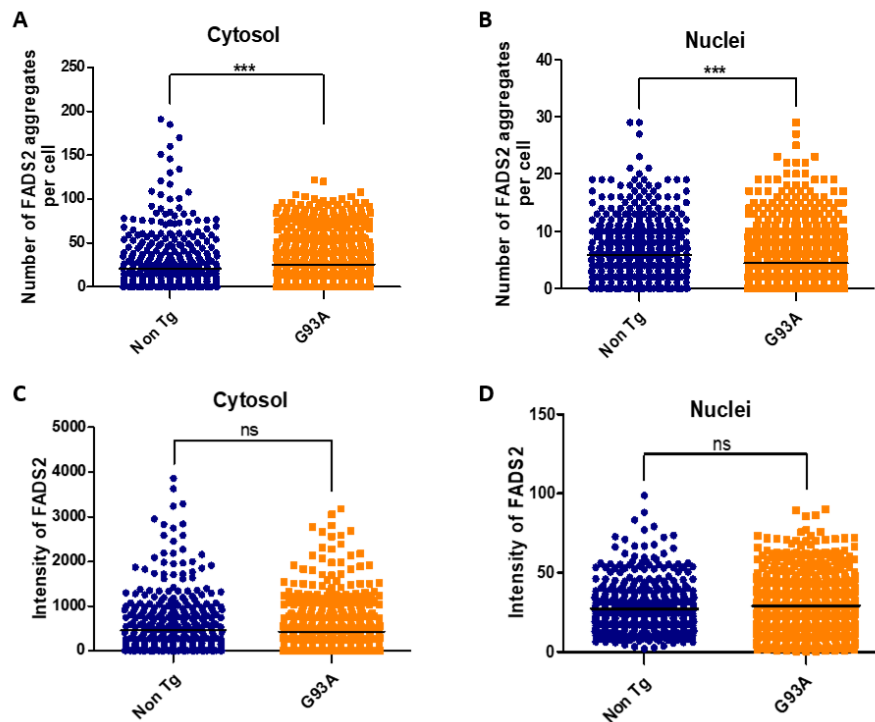
**Figura 73. Alteració en els nivells de SCP2 en les cèl·lules dels ratolins G93A de 120 dies d'edat.** Analitzat per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A als 90 dies i 120 dies d'edat. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. **(A)** Als 90 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de SCP2 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** Als 120 dies d'edat del ratolí, es produeix un augment significatiu dels nivells de SCP2 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip i per cada edat). ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$  per Student's t-test.

Pel que fa a FADS2, les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren un augment de la proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 74A i 74B).



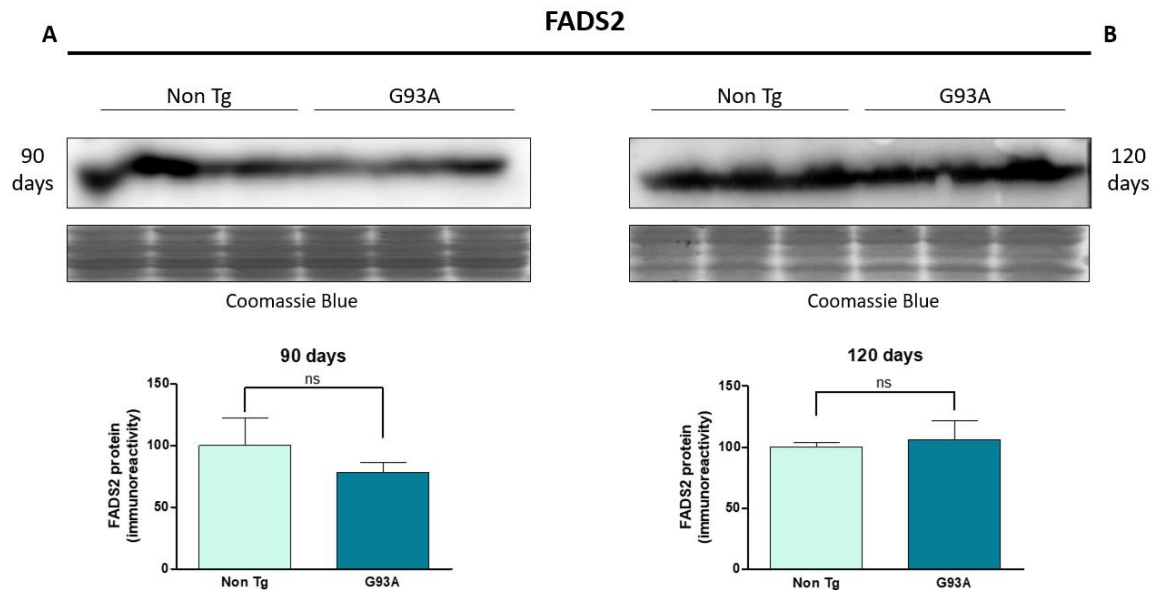
**Figura 74. Agregació de FADS2 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de FADS2 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. Barres amb una longitud de 20 $\mu$ M. (n=3 ratolins per cada genotip).

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors també mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de FADS2 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 75A), en canvi en el nucli disminueixen (Figura 75B). Pel que fa a la intensitat dels agregats, no es detecten canvis significatius ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 75C i 75D).



**Figura 75.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de FADS2 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. Analtitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de FADS2 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de FADS2 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de FADS2 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de FADS2 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de FADS2 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (n=3 ratolins per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per Student's t-test.

Tot i els resultats obtinguts anteriorment, l'anàlisi per Western Blot de FADS2 en mostres de medul·la espinal de ratolí als 90 dies i 120 dies d'edat no mostren canvis significatius en els nivells de la proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics en cap de les dues edats (Figura 76A i 76B).



**Figura 76.** Els nivells de FADS2 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A ni als 90 dies ni als 120 dies d'edat. Analitzat per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A als 90 dies i 120 dies d'edat. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. **(A)** Als 90 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de FADS2 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** Als 120 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de FADS2 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip i per cada edat). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test.

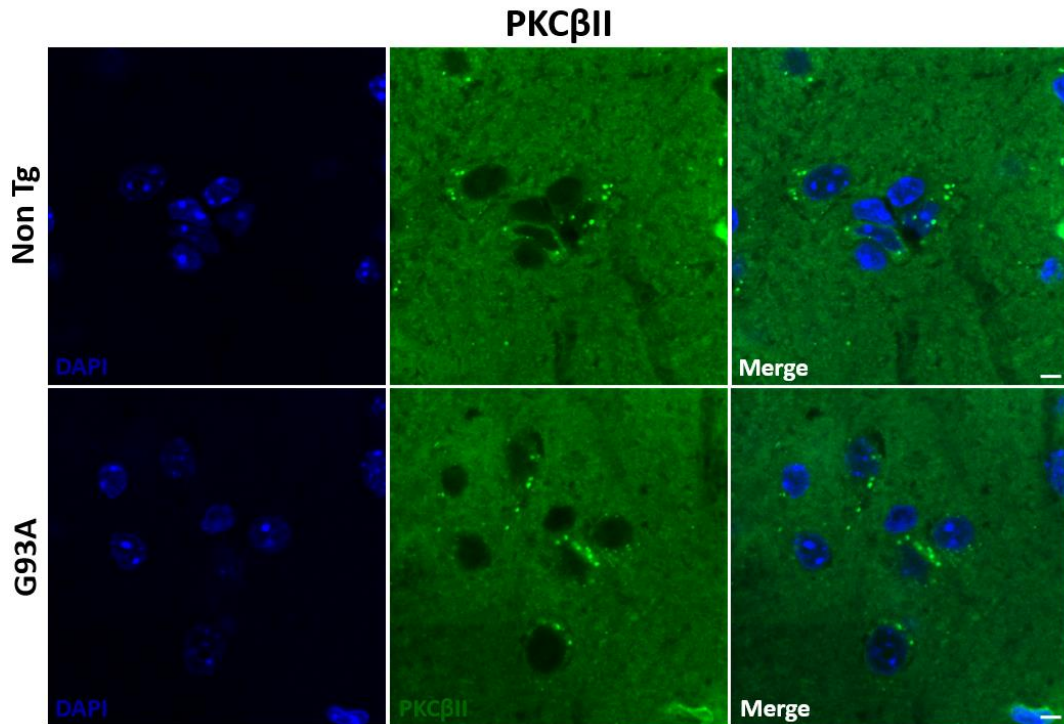
### 5.3.1.1. Anàlisi de PKC $\beta$ II a diferents fases de la malaltia en ratolins

S'ha analitzat PKC $\beta$ II en mostres de medul·la espinal de ratolí a 3 edats diferents: 90 dies on hi ha una pèrdua aproximada del 20% de les motoneurones, als 120 dies amb una pèrdua del 40% i als 150 dies (fase final) amb una pèrdua del 50%.

#### 5.3.1.1.1. PKC $\beta$ II als 90 dies d'edat

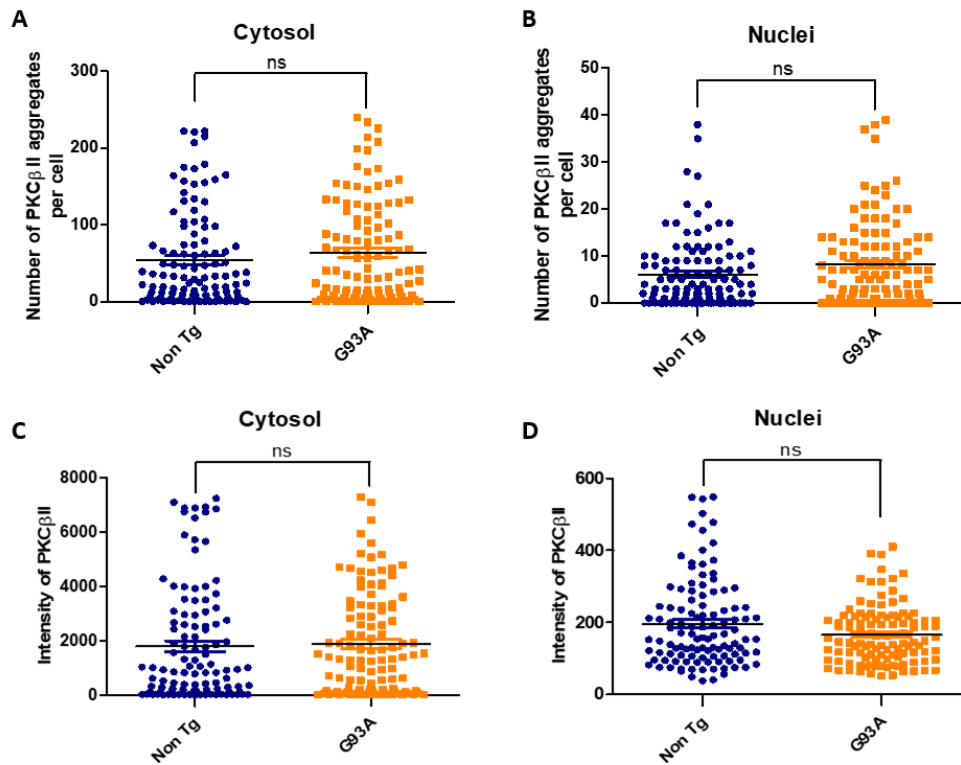
Les imatges obtingudes per microscopia confocal de PKC $\beta$ II no mostren canvis significatius en el nombre d'agregats de la proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics als 90 dies d'edat (Figura 77).





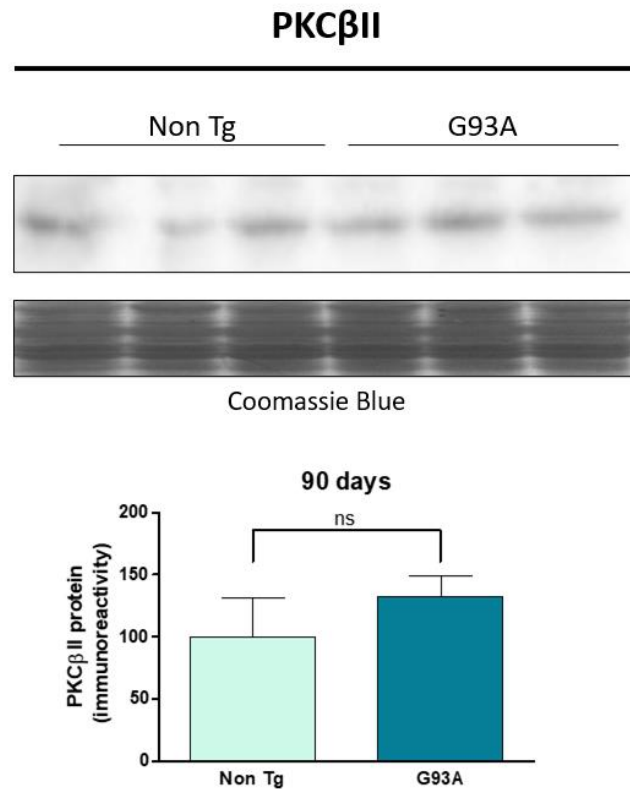
**Figura 77. Agregació de PKC $\beta$ II en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 90 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de PKC $\beta$ II en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 90 dies d'edat. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M. (n=2 ratolins per cada genotip).

Els resultats obtinguts en la quantificació tampoc mostren diferències significatives en el nombre d'agregats de PKC $\beta$ II ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 78A i 78B). Pel que fa a la intensitat, tampoc s'observen diferències significatives en cap de les dues localitzacions cel·lulars (Figura 78C i 78D).



**Figura 78.** El nombre d'agregats de PKC $\beta$ II no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies d'edat. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de PKC $\beta$ II en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PKC $\beta$ II en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PKC $\beta$ II en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PKC $\beta$ II en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PKC $\beta$ II en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=2 ratolins per cada genotip). ns Indica p>0.05 per Student's t-test.

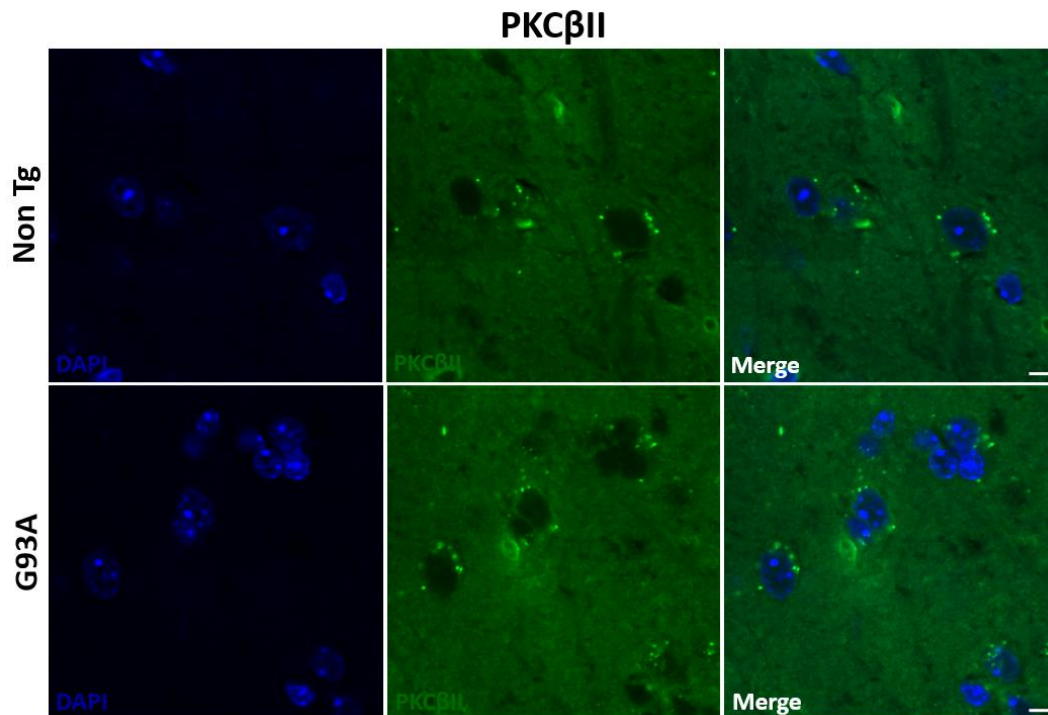
La quantificació per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins als 90 dies d'edat tampoc mostren canvis significatius dels nivells de la proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 79).



**Figura 79.** Els nivells de PKC $\beta$ II no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies d'edat. Analitzat per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A als 90 dies d'edat. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. Als 90 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de PKC $\beta$ II en els ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test.

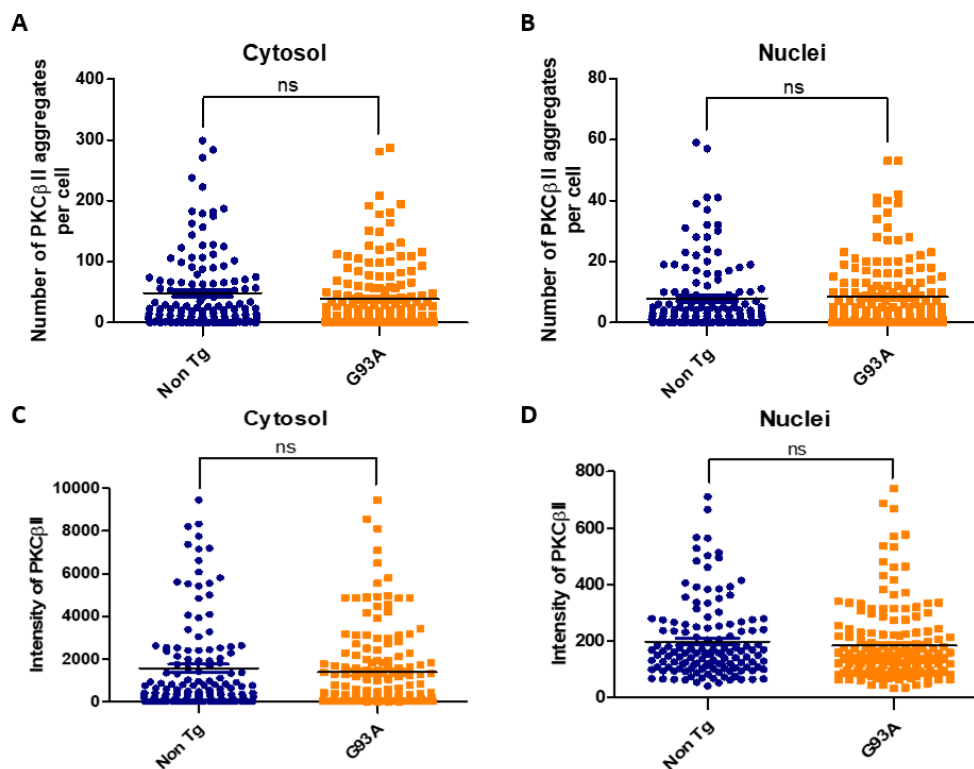
### 5.3.1.1.2. PKC $\beta$ II als 120 dies d'edat

D'igual forma, pels ratolins de 120 dies d'edat, les imatges obtingudes per microscopia confocal, tampoc mostren canvis en el nombre d'agregats de PKC $\beta$ II en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 80).



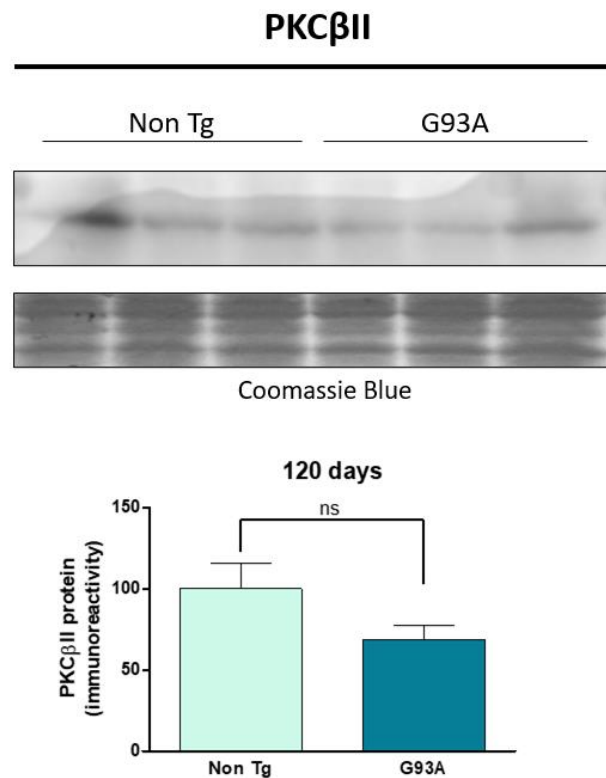
**Figura 80. Agregació de PKC $\beta$ II en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 120 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de PKC $\beta$ II en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 120 dies d'edat. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M. (n=2 ratolins per cada genotip).

En la quantificació, igual que en el cas anterior, tampoc s'observen canvis significatius en el nombre d'agregats de PKC $\beta$ II ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 81A i 81B). Pel que fa a la intensitat, tampoc s'observen diferències significatives en cap de les dues localitzacions cel·lulars (Figura 81C i 81D).



**Figura 81.** El nombre d'agregats de PKC $\beta$ II no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 120 dies d'edat. Analtitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de PKC $\beta$ II en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PKC $\beta$ II en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PKC $\beta$ II en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PKC $\beta$ II en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PKC $\beta$ II en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=2 ratolins per cada genotip). ns Indica p>0.05 per Student's t-test.

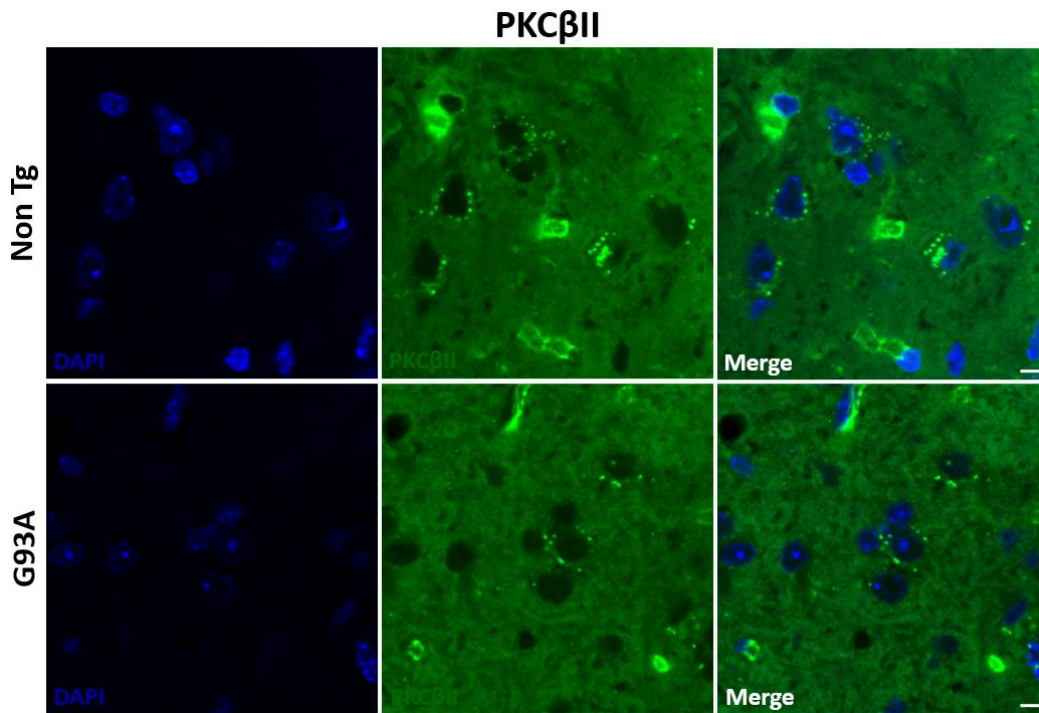
En la quantificació per Western Blot als 120 dies d'edat tampoc s'observen canvis significatius en els nivells de la proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 82).



**Figura 82.** Els nivells de PKC $\beta$ II no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 120 dies d'edat. Analitzat per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A als 120 dies d'edat. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. Als 120 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de PKC $\beta$ II en els ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip). ns Indica  $p>0.05$  per Student's t-test.

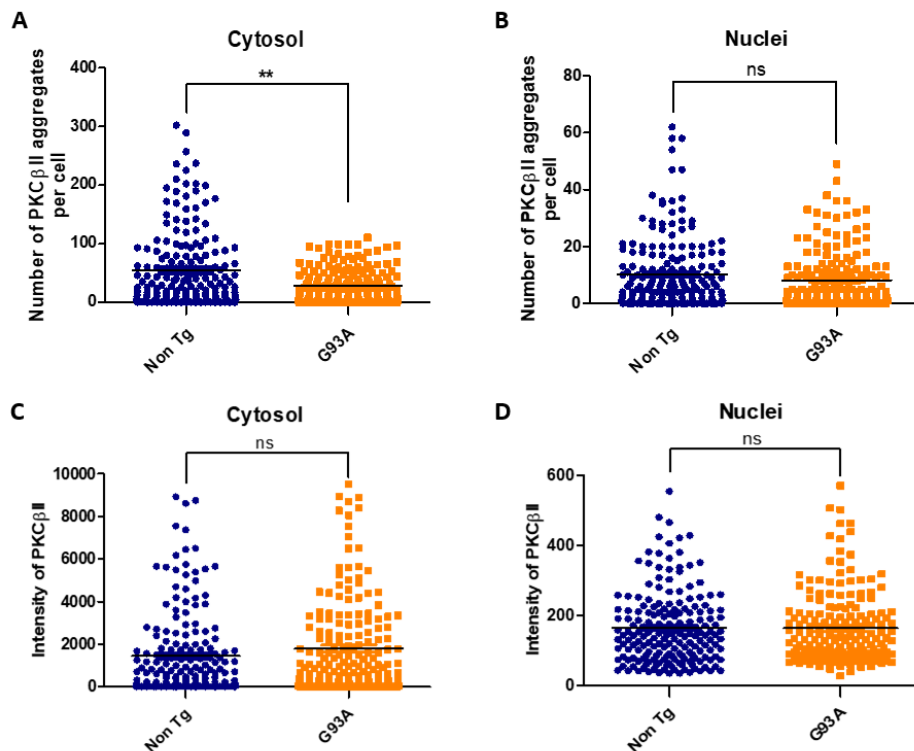
### 5.3.1.1.3. PKC $\beta$ II als 150 dies d'edat

En el cas dels ratolins als 150 dies d'edat, les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren una disminució del nombre d'agregats de la proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 83).



**Figura 83. Agregació de PKC $\beta$ II en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de PKC $\beta$ II en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M. (n=2 ratolins per cada genotip).

La quantificació per aquesta proteïna mostra una disminució significativa del nombre d'agregats de PKC $\beta$ II en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 84A), en canvi en el nucli no es detecten canvis significatius (Figura 84B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats tampoc es produeixen canvis ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 84C i 84D).



**Figura 84. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de PKCβII en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de PKCβII en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** Disminució significativa del nombre d'agregats de PKCβII en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PKCβII en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PKCβII en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PKCβII en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=2 ratolins per cada genotip). ns Indica p>0.05, \*\* p<0.01 per Student's t-test.

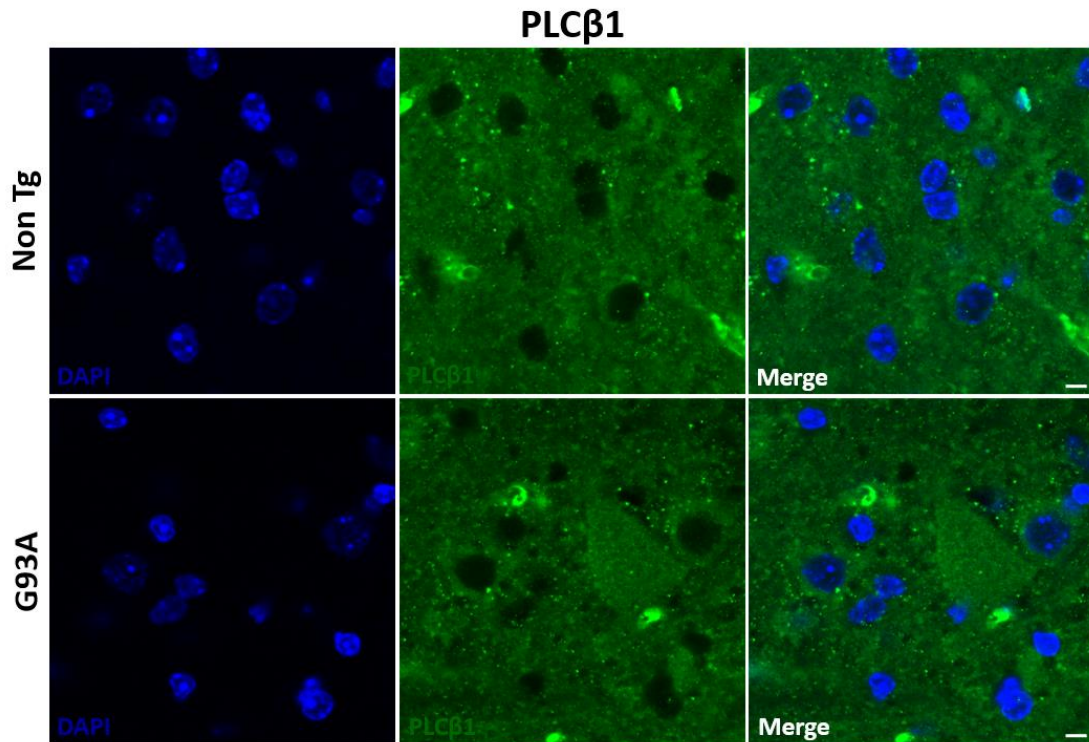
### 5.3.1.2. Anàlisi de PLCβ1 a diferents fases de la malaltia en ratolins

S'ha analitzat PLCβ1 en mostres de medul·la espinal de ratolí a 3 edats diferents: 90 dies on hi ha una pèrdua aproximada del 20% de les motoneurones, als 120 dies amb una pèrdua del 40% i als 150 dies (fase final) amb una pèrdua del 50%.



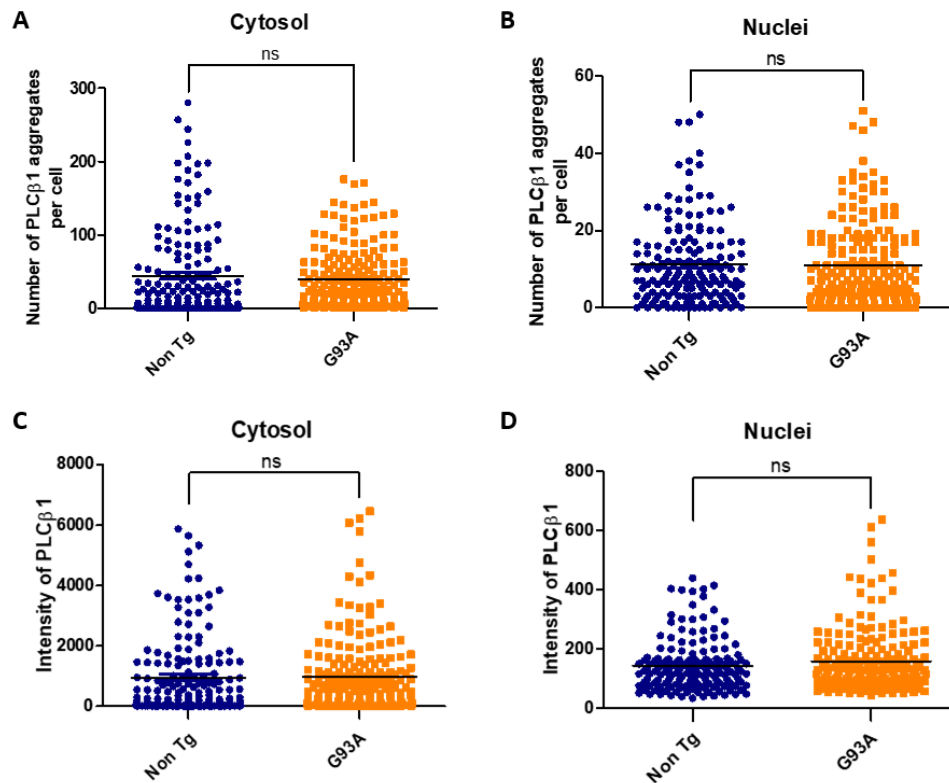
### 5.3.1.2.1. PLC $\beta$ 1 als 90 dies d'edat

Les imatges obtingudes per microscopia confocal no mostren canvis significatius en el nombre d'agregats de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics als 90 dies d'edat (Figura 85).



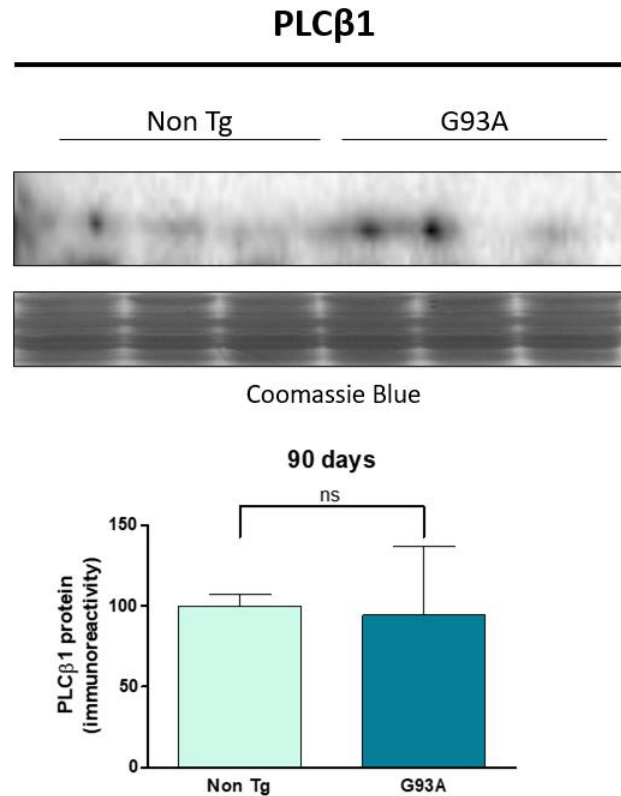
**Figura 85. Agregació de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 90 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 90 dies d'edat. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ m. (n=1 ratolí per cada genotip).

Tal i com s'ha observat anteriorment, la quantificació tampoc mostra diferències significatives en el nombre d'agregats de PLC $\beta$ 1 ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 86A i 86B). Pel que fa a la intensitat dels agregats, tampoc es produeixen canvis significatius ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 86C i 86D).



**Figura 86.** El nombre d'agregats de PLCβ1 no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies d'edat. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de PLCβ1 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PLCβ1 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PLCβ1 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PLCβ1 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PLCβ1 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=1 ratolí per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test.

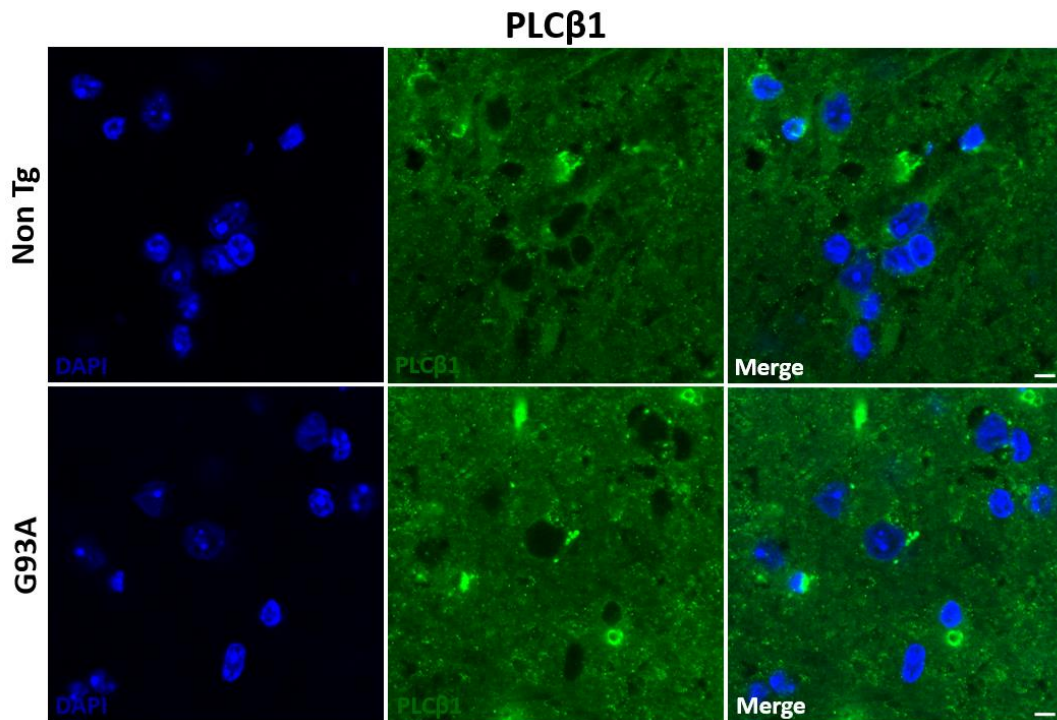
Amb la quantificació realitzada per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins als 90 dies d'edat tampoc es produeixen canvis significatius en els nivells de PLCβ1 en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 87).



**Figura 87.** Els nivells de PLC $\beta$ 1 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies d'edat. Analtzat per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A als 90 dies d'edat. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. Als 90 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de PLC $\beta$ 1 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip). ns Indica p>0.05 per Student's t-test.

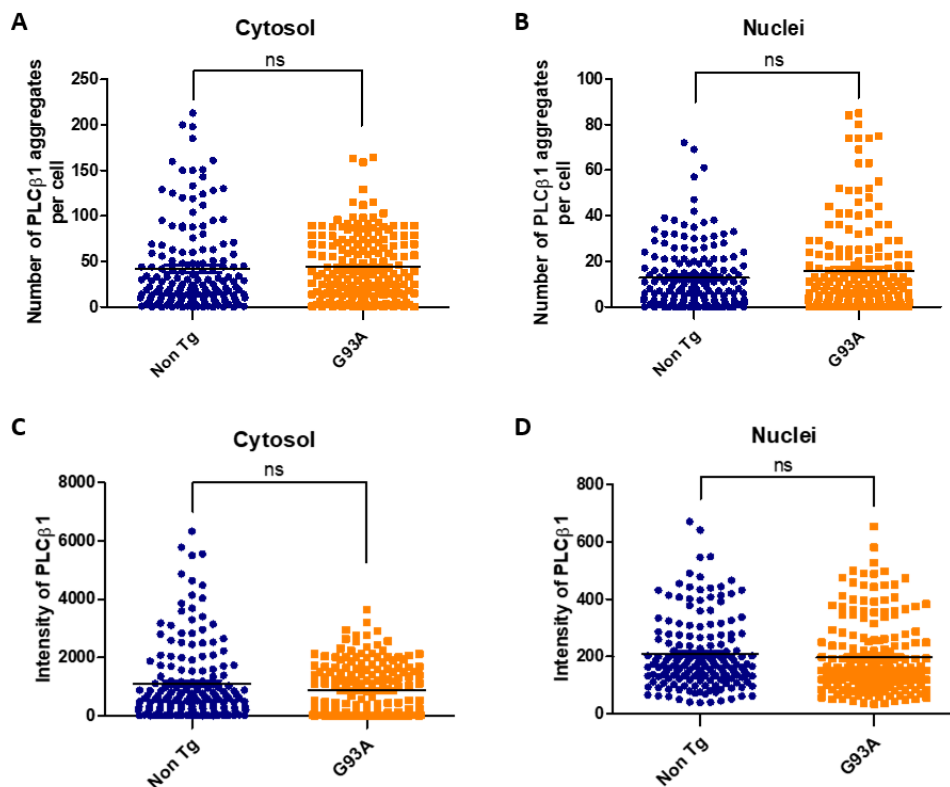
### 5.3.1.2.2. PLC $\beta$ 1 als 120 dies d'edat

Les imatges obtingudes per microscopia confocal no mostren diferències en el nombre d'agregats de la proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics als 120 dies d'edat (Figura 88).



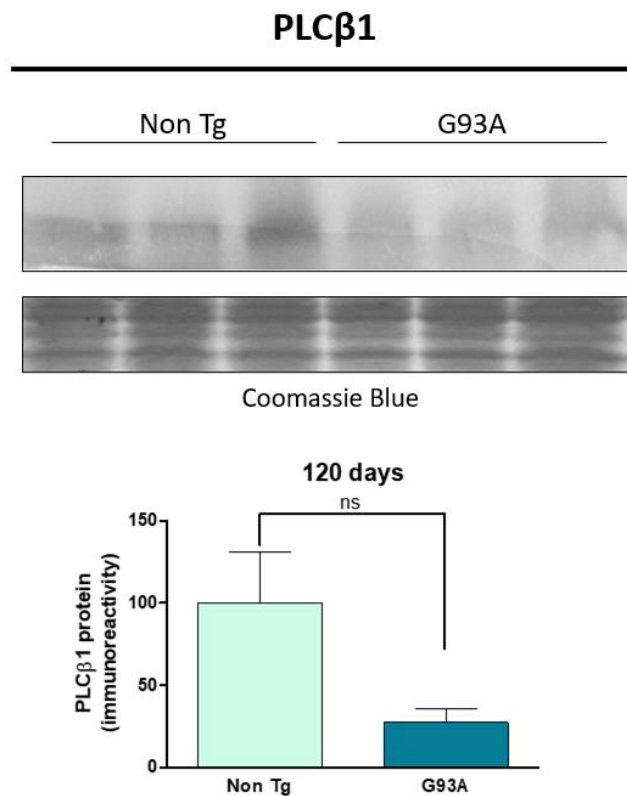
**Figura 88. Agregació de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 120 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 120 dies d'edat. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M. (n=1 ratolí per cada genotip).

En la quantificació realitzada tampoc s'observen diferències significatives en el nombre d'agregats de PLC $\beta$ 1 ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 89A i 89B). En la intensitat d'aquests agregats tampoc es produeixen canvis significatius (Figura 89C i 89D).



**Figura 89.** El nombre d'agregats de PLCβ1 no es troba alterat en les cèl·lules dels ratolins G93A als 120 dies d'edat. Analtzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de PLCβ1 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PLCβ1 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PLCβ1 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PLCβ1 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PLCβ1 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=1 ratolí per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test.

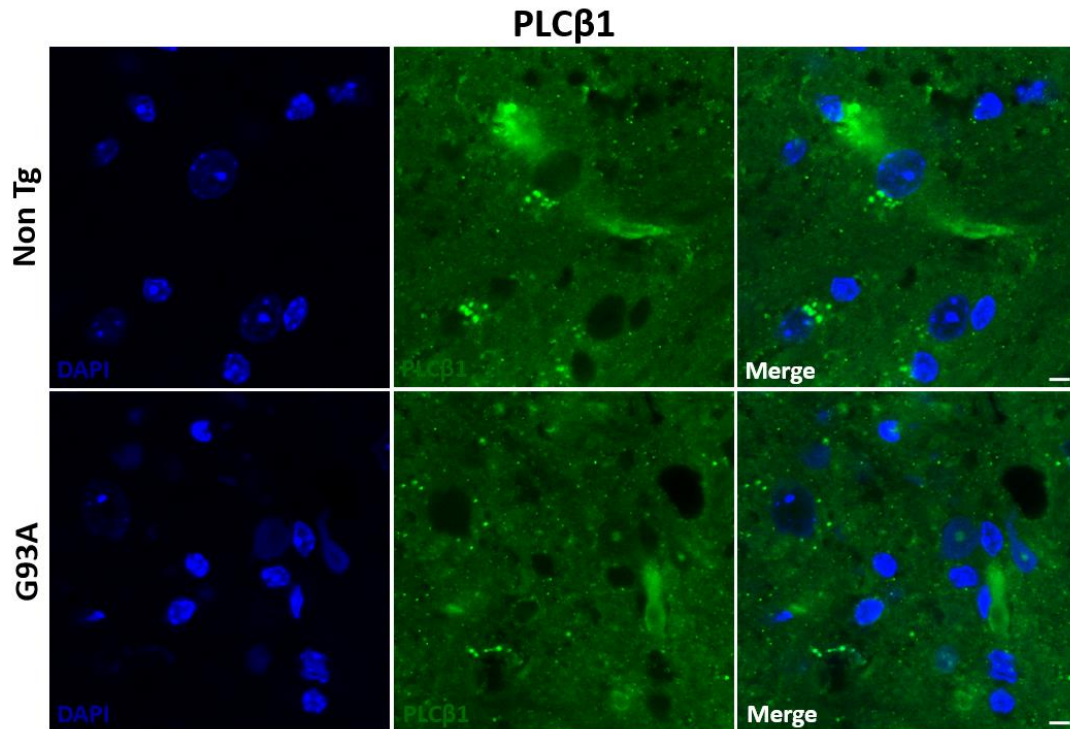
Amb la quantificació realitzada per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins als 120 dies d'edat tampoc es produeixen canvis significatius en els nivells de PLCβ1 en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics tot i mostrar una clara tendència a disminuir (Figura 90).



**Figura 90.** Els nivells de PLC $\beta$ 1 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 120 dies d'edat. Analitzat per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A als 120 dies d'edat. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. Als 120 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de PLC $\beta$ 1 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip). ns Indica  $p>0.05$  per Student's t-test.

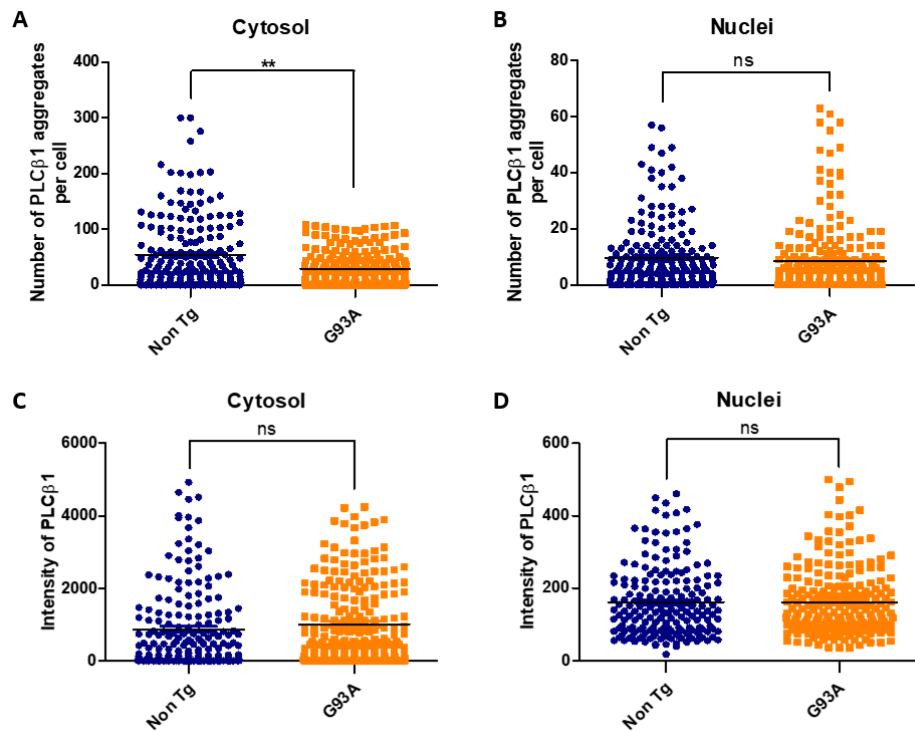
### 5.3.1.2.3. PLC $\beta$ 1 als 150 dies d'edat

Les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren una disminució del nombre d'agregats de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics als 150 dies d'edat (Figura 91).



**Figura 91. Agregació de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de PLC $\beta$ 1 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M. (n=1 ratolí per cada genotip).

La quantificació obtinguda mostra una disminució significativa del nombre d'agregats de PLC $\beta$ 1 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 92A). En canvi en el nucli, no es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats d'aquesta proteïna (Figura 92B). Pel que fa la intensitat dels agregats, tampoc es produeixen canvis significatius ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 92C i 92D).



**Figura 92. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de PLCβ1 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de PLCβ1 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** Disminució significativa del nombre d'agregats de PLCβ1 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PLCβ1 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PLCβ1 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PLCβ1 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=1 ratolí per cada genotip). ns Indica  $p>0.05$ , \*\*  $p<0.01$  per Student's t-test.

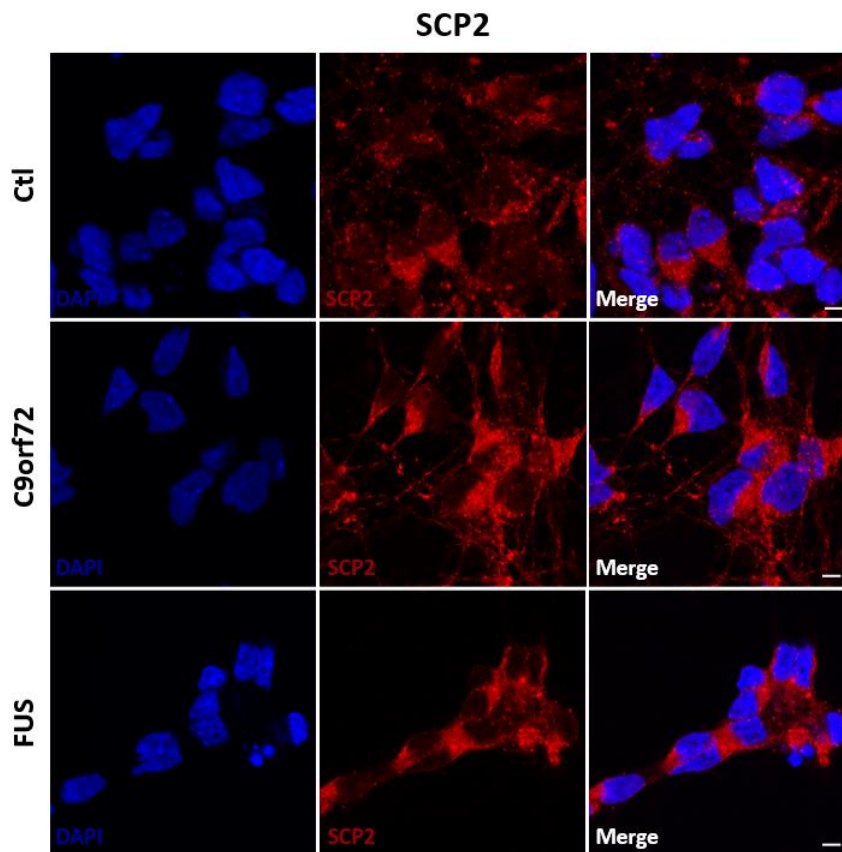
### 5.3.2. Anàlisi en el model cel·lular de motoneurones derivades de pacients

S'ha analitzat el nombre d'agregats i la intensitat de SCP2, en tres línies de motoneurones derivades de pacients: en la línia control, en la línia C9orf72 i en la línia FUS. A més a més, s'ha analitzat també els seus nivells sota una situació d'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen i sota estrès osmòtic induït amb sorbitol.



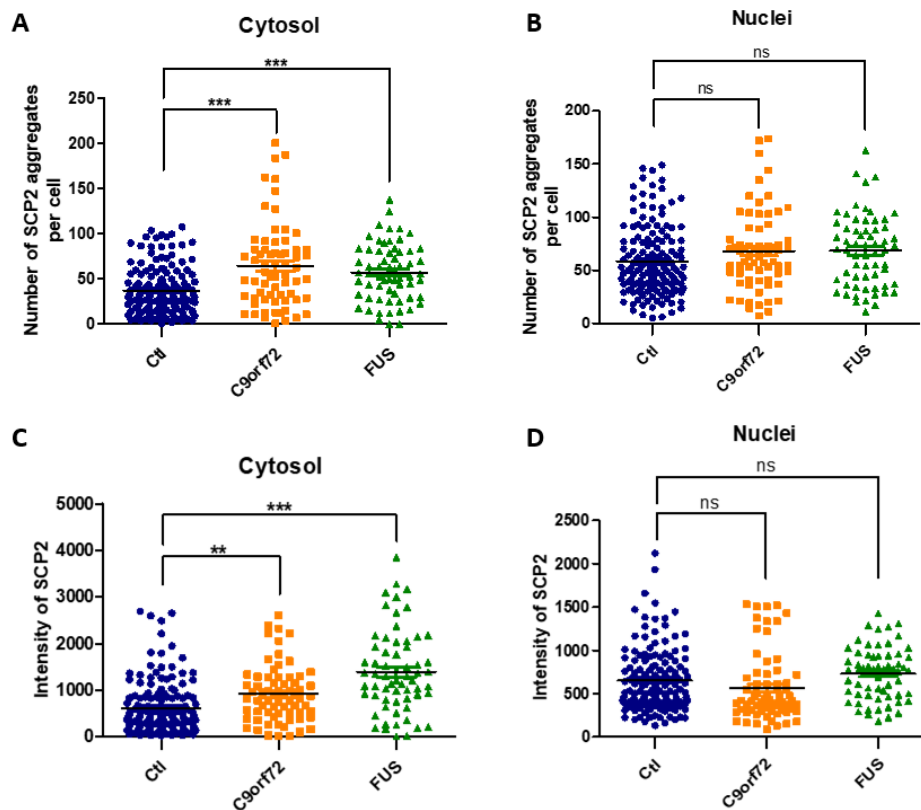
### 5.3.2.1. SCP2

Les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren un augment de la proteïna en les cèl·lules tant de la línia C9orf72 com de la FUS respecte la control (Figura 93).



**Figura 93. Agregació de SCP2 en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de SCP2 en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules tant de la línia C9orf72 com de la línia FUS respecte la control (Figura 94A). En canvi, en el nucli, no es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de SCP2 en cap de les línies analitzades (Figura 94B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats, també es produeix un augment significatiu en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control (Figura 94C). En el nucli la intensitat disminueix significativament en la línia FUS respecte la control (Figura 94D).

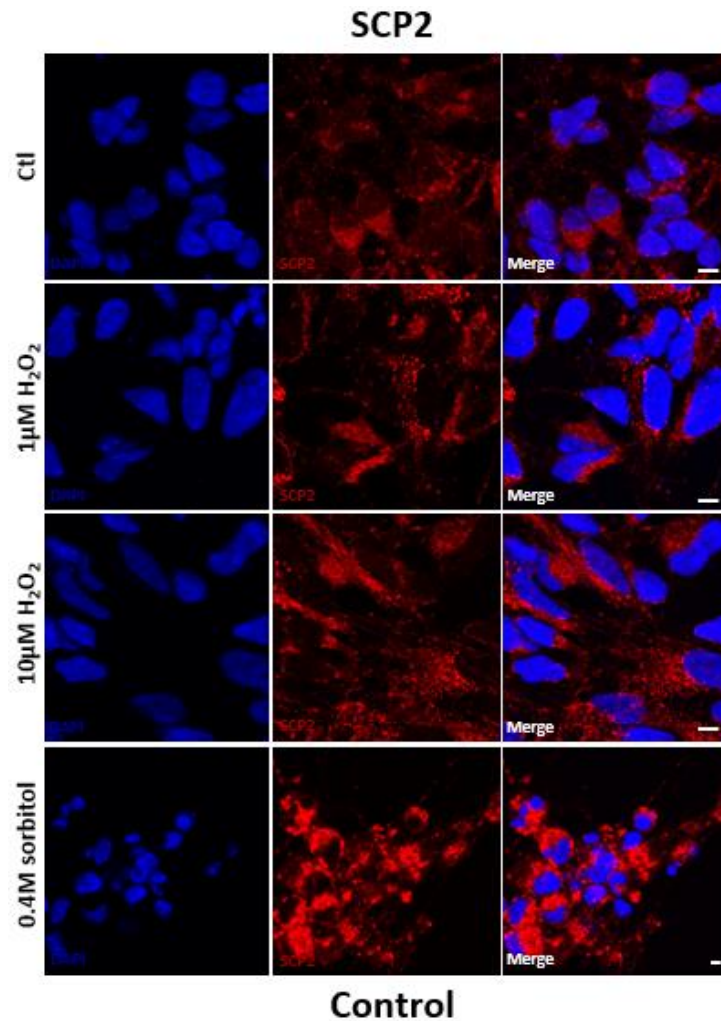


**Figura 94. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de SCP2 en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de SCP2 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de SCP2 en el nucli de les cèl·lules en cap de les línies analitzades respecte la control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de SCP2 en el nucli de les cèl·lules en cap de les línies analitzades de respecte la control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

Per altra banda s'ha analitzat l'efecte de dos estressors a nivell d'agregació proteica de SCP2. Les cèl·lules de les tres línies van ser tractades amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  durant 4h de tractament (estrès oxidatiu) i sorbitol a  $0.4\text{M}$  també durant 4h (estrès osmòtic).

### 5.3.2.1.1. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de SCP2 en les cèl·lules de la línia control

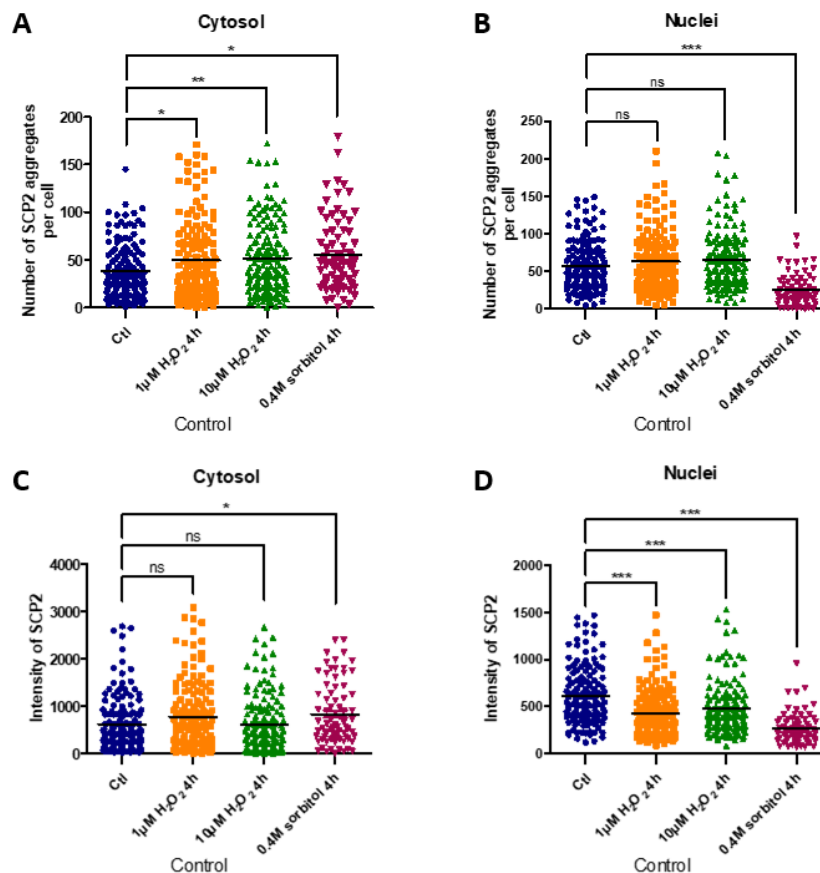
Les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren un augment de SCP2 sota l'estrès induït amb peròxid d'hidrogen, a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$ , i amb sorbitol a  $0.4\text{M}$  durant 4h respecte les control. A més a més, sota el tractament amb sorbitol s'aprecia una reducció de la mida del nucli (Figura 95).



**Figura 95. Agregació de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia control.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de SCP2 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) i sorbitol ( $0.4\text{M}$ ) durant 4h. Barres amb una longitud de  $5\mu\text{M}$ .

La quantificació obtinguda mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats, tant amb peròxid d'hidrogen, a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$ , com amb sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 96A). En

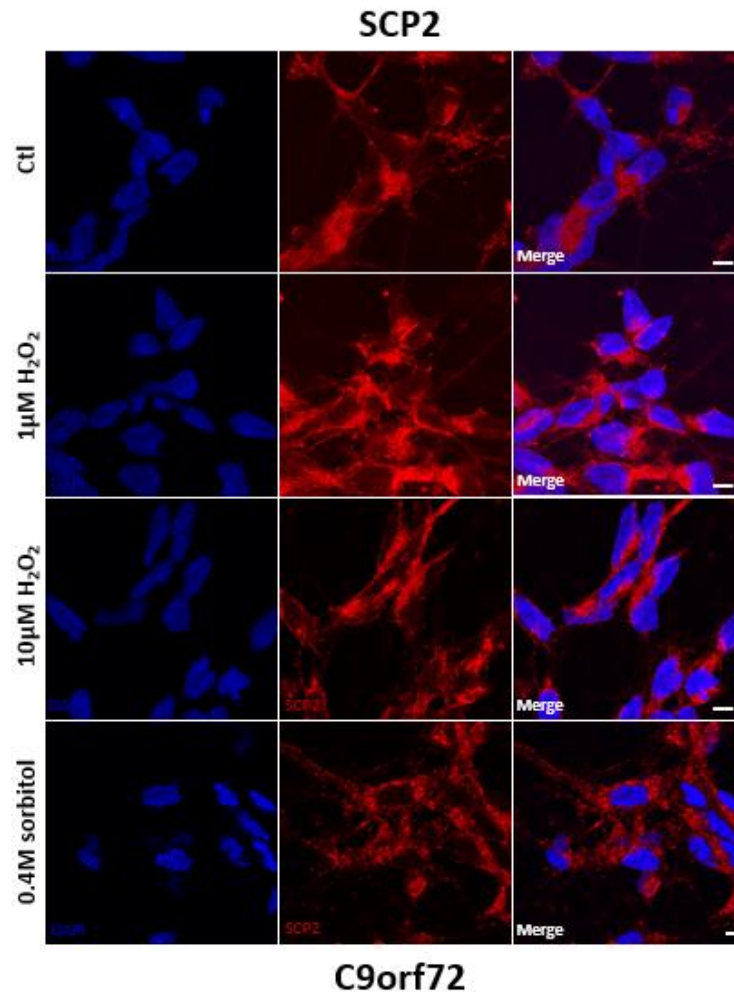
canvi, en el nucli es produeix una disminució significativa del nombre d'agregats de SCP2 en les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 96B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats, en el citosol solament augmenta sota el tractament a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 96C) i en el nucli disminueix sota tots els tractaments utilitzats, tant amb  $H_2O_2$  com amb sorbitol, respecte les control (Figura 96D).



**Figura 96. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de línia control.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de SCP2 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de SCP2 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de SCP2 en el nucli de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

### 5.3.2.1.2. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de SCP2 en les cèl·lules de la línia C9orf72

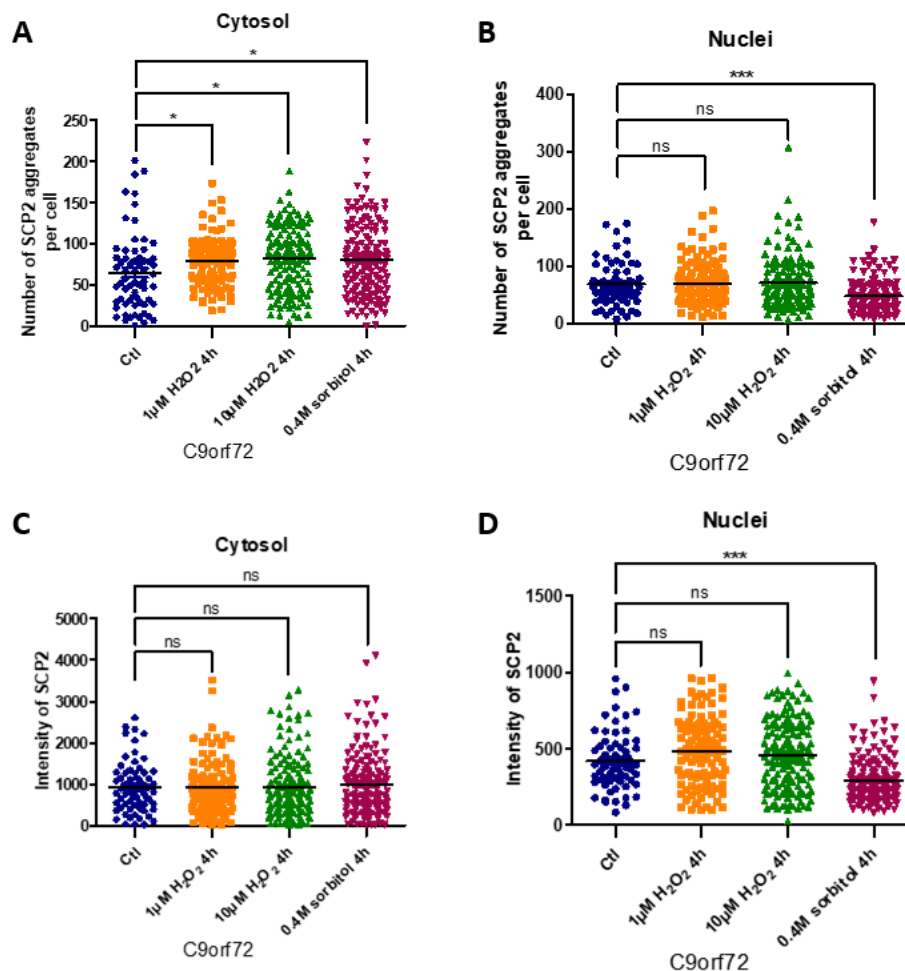
Les imatges obtingudes per microscopia confocal de SCP2 mostren un augment de la proteïna en les cèl·lules tractades tant a 1 $\mu$ M com a 10 $\mu$ M de peròxid d'hidrogen i també a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 97).



**Figura 97. Agregació de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de SCP2 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) i sorbitol (0.4M) durant 4h. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

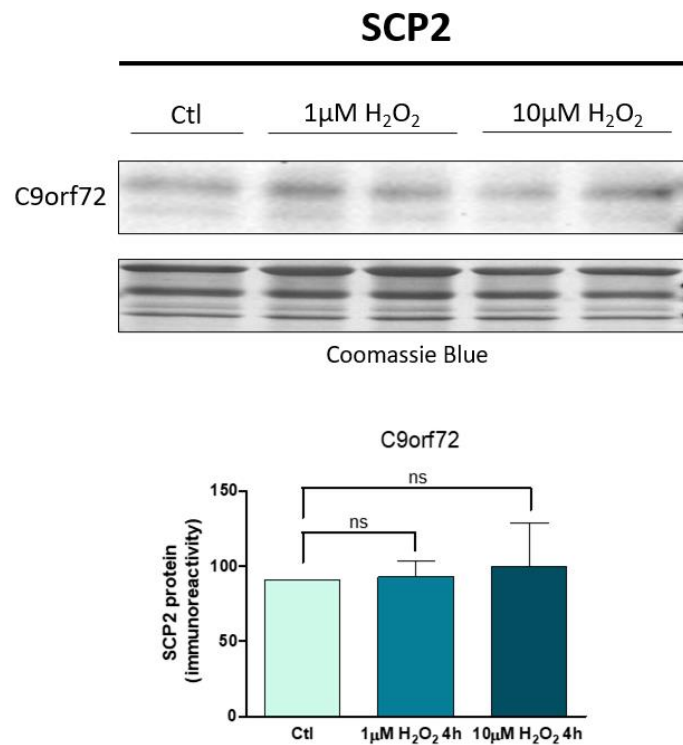
La quantificació obtinguda, tal i com s'aprecia en l'experiment que representen les imatges anteriors, mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats, tant a 1 $\mu$ M com a 10 $\mu$ M, de peròxid d'hidrogen i a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 98A). En el nucli, es produeix una

disminució significativa del nombre d'agregats de SCP2 en les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 98B). Pel que fa a la intensitat dels agregats, en el citosol no es detecten canvis significatius en cap dels tractaments utilitzats (Figura 98C) i en el nucli disminueix sota el tractament a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 98D).



**Figura 98.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia C9orf72. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de SCP2 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de SCP2 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de SCP2 en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

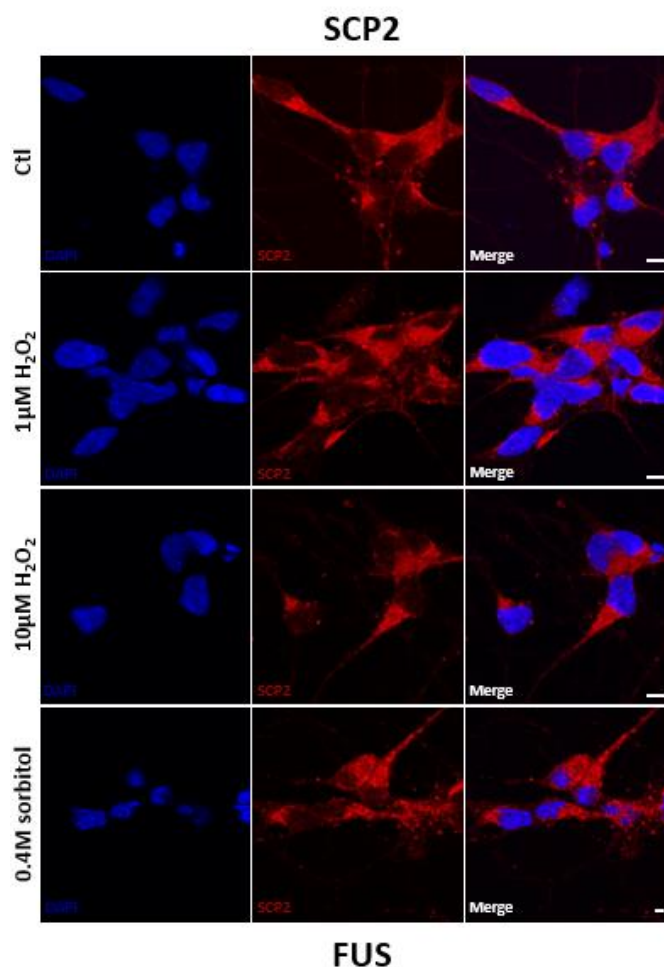
En el cas de la línia C9orf72, es va realitzar un anàlisi per Western Blot de SCP2 sota l'estrès amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  durant 4h de tractament. Els resultats obtinguts no mostren diferències significatives en els nivells de SCP2 en cap dels tractaments utilitzats respecte les control tot i que a la concentració de  $10\mu\text{M}$  presenta una certa tendència a augmentar (Figura 99).



**Figura 99. Els nivells de SCP2 no es troben alterats sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia C9orf72.** Analitzat per Western Blot en la línia cel·lular C9orf72 sota l'estrès amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  durant 4h de tractament. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. No es detecten canvis significatius en els nivells de SCP2 sota el tractament amb peròxid d'hidrogen respecte les control. (n=1 per control i n=2 per cada condició de tractament). ns Indica  $p>0.05$  per one-way ANOVA.

### 5.3.2.1.3. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de SCP2 en les cèl·lules de la línia FUS

Les imatges obtingudes per microscopia confocal de SCP2 mostren un augment del nombre d'agregats de la proteïna sota tots els tractaments utilitzats, tant amb peròxid d'hidrogen a 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M, com amb sorbitol a 0.4M durant 4h respecte les control (Figura 100).

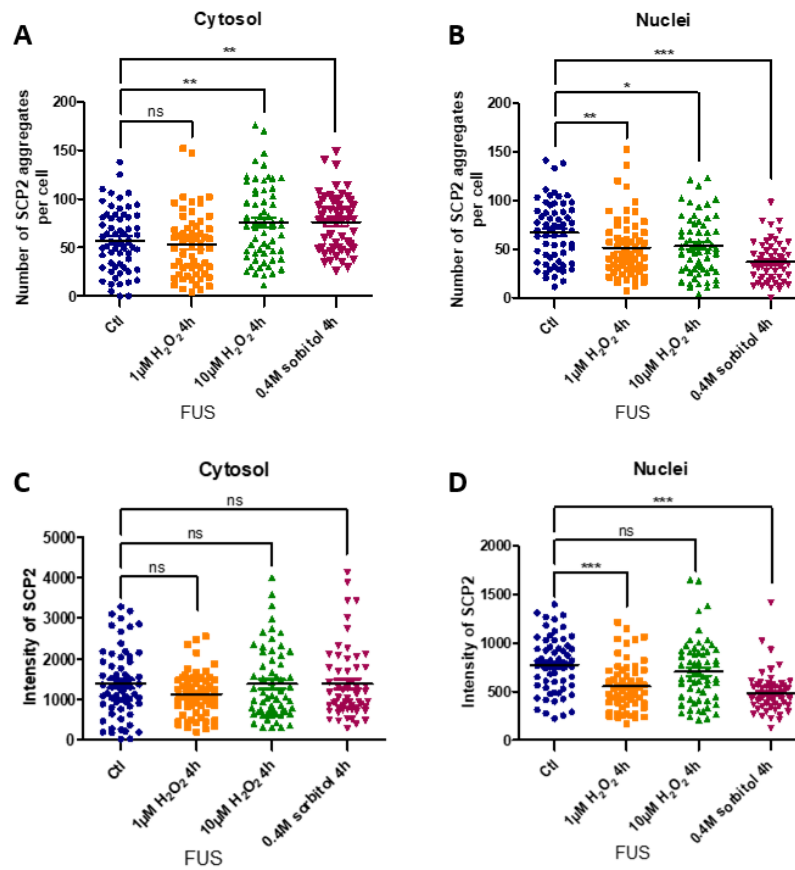


**Figura 100. Agregació de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia FUS.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de SCP2 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) i sorbitol (0.4M) durant 4h. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules tractades a 10 $\mu$ M de peròxid d'hidrogen i a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 101A). En el nucli en canvi, es produeix una disminució significativa sota tots els tractaments utilitzats, tant amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com amb sorbitol



durant 4h, respecte les control (Figura 101B). Pel que fa a la intensitat dels agregats, no es detecten canvis significatius en el citosol de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control (Figura 101C) i en el nucli disminueix a  $1\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  i a  $0.4\text{M}$  de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 101D).



**Figura 101. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de SCP2 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia FUS.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de SCP2 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules tractades a  $10\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  i a  $0.4\text{M}$  de sorbitol durant 4h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de SCP2 en el nucli de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de SCP2 en el citosol de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de SCP2 en el nucli de les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  i a  $0.4\text{M}$  de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

## 5.4. Alteració en proteïnes peroxisomals

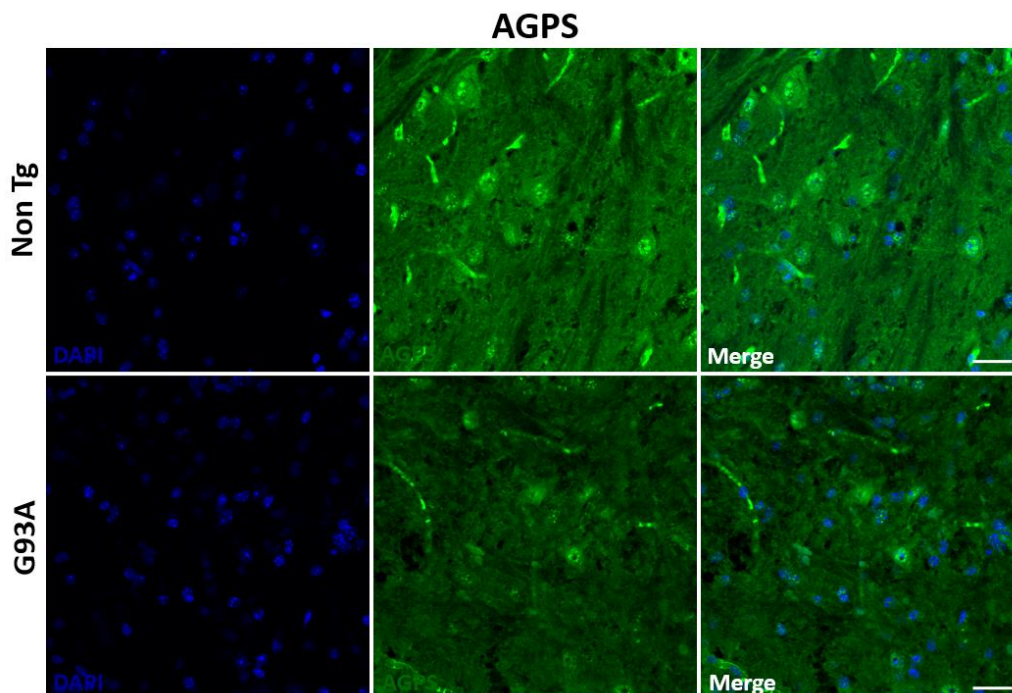
S'ha analitzat el nombre d'agregats i la intensitat d'AGPS i PMP70, proteïnes presents en els peroxisomes, en dos models: en seccions de medul·la espinal lumbar de ratolí als 150 dies d'edat, G93A i no transgènics, i en línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, en la línia control, en la línia C9orf72 i en la línia FUS.

### 5.4.1. Anàlisi en seccions de medul·la espinal lumbar de ratolins

#### G93A

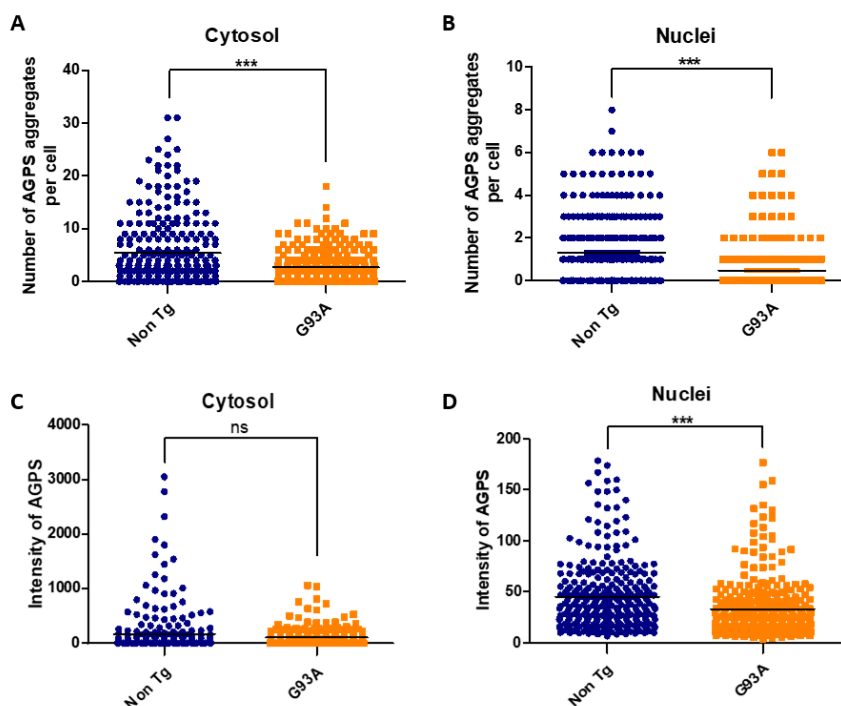
S'ha analitzat el nombre d'agregats d'AGPS i PMP70 tant en el citosol com en el nucli de les cèl·lules presents en la regió ventral de la medul·la espinal lumbar.

Les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren una disminució del nombre d'agregats d'AGPS en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 102).



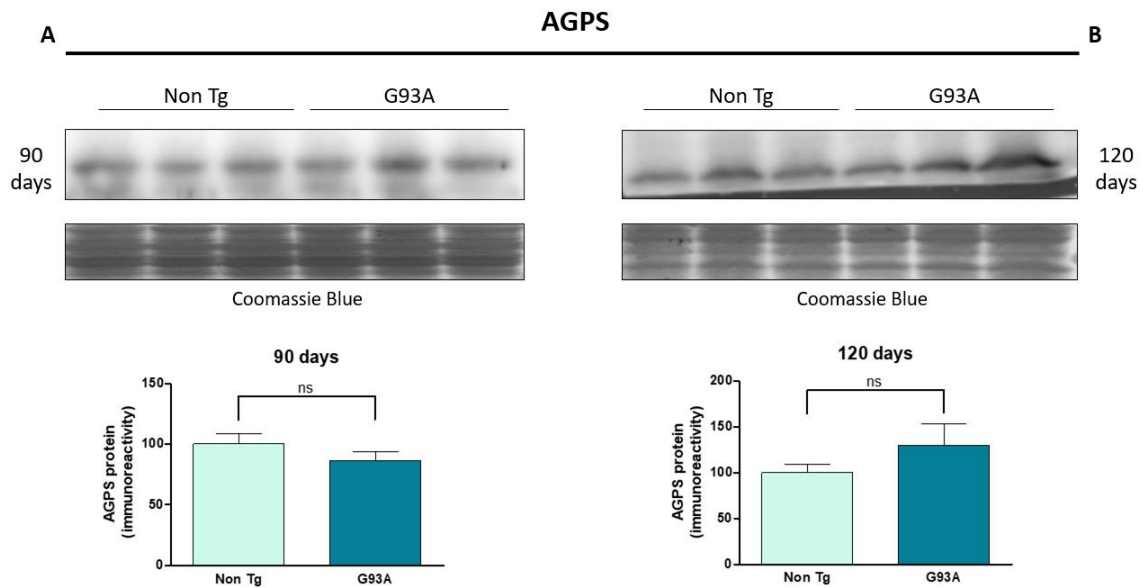
**Figura 102. Agregació d'AGPS en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats d'AGPS en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. Barres amb una longitud de 20 $\mu$ M. (n=2 ratolins per cada genotip).

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra una disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS tant en el citosol com en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els ratolins no transgènics (Figura 103A i 103B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats, en el citosol no es detecten canvis significatius (Figura 103C) i en el nucli es produeix una disminució significativa en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 103D).



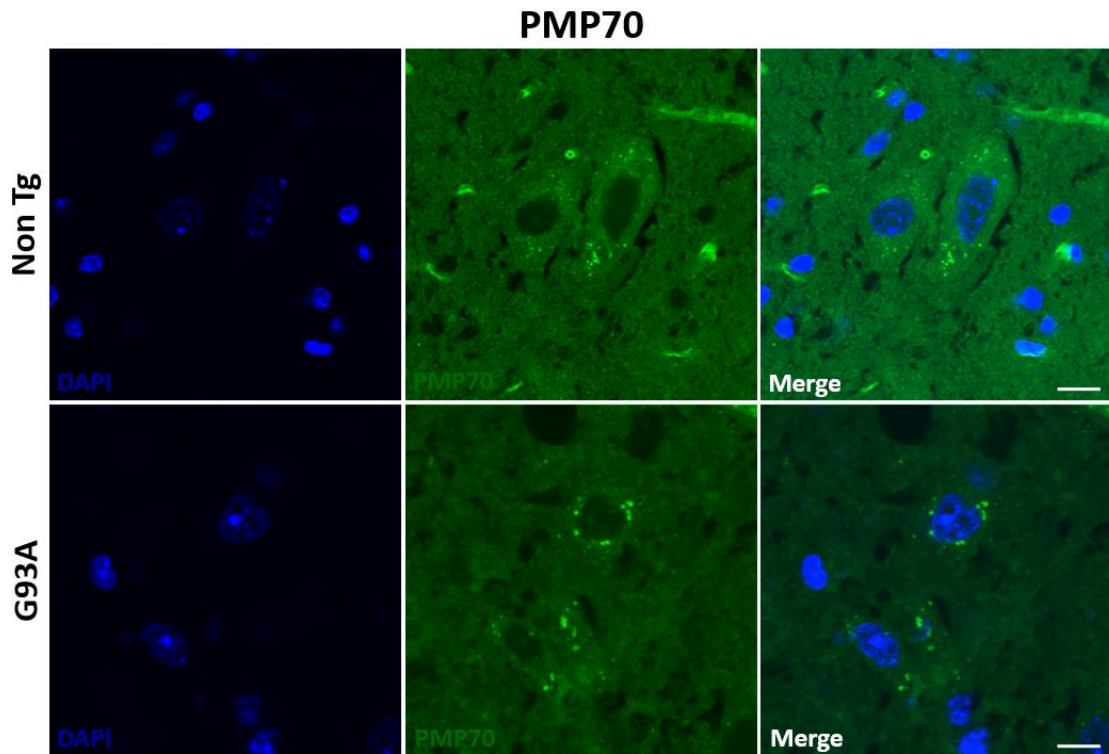
**Figura 103. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears d'AGPS en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat d'AGPS en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** Disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats d'AGPS en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=2 ratolins per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per Student's t-test.

Es va realitzar també un anàlisi per Western Blot d'AGPS en mostres de medul·la de ratolins als 90 dies i 120 dies d'edat. Els resultats obtinguts no mostren diferències significatives en els nivells d'AGPS en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics en cap de les dues edats (Figura 104A i 104B).



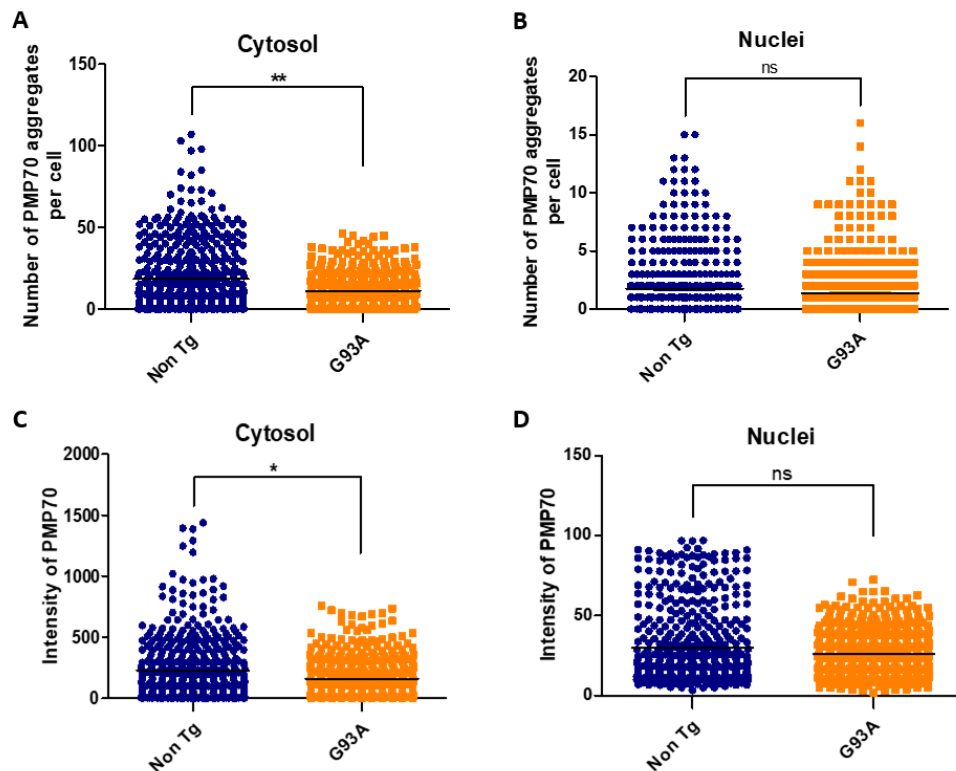
**Figura 104. Els nivells d'AGPS no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies ni als 120 dies d'edat.** Analitzat per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A als 90 dies i 120 dies d'edat. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. **(A)** Als 90 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells d'AGPS en els ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** Als 120 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells d'AGPS en els ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test.

Pel que fa a PMP70, les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren una disminució dels agregats de la proteïna en les cèl·lules del ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 105).



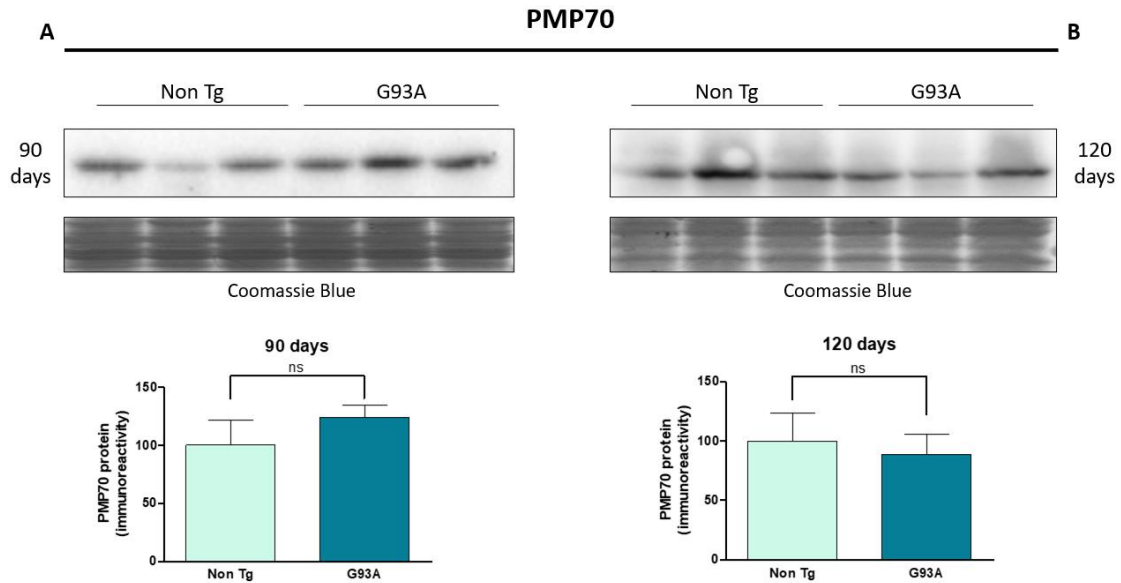
**Figura 105. Agregació de PMP70 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de PMP70 en les cèl·lules dels ratolins no transgènics i G93A als 150 dies d'edat. Barres amb una longitud de 10 $\mu$ M. (n=3 ratolins per cada genotip).

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra una disminució significativa del nombre d'agregats de PMP70 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 106A), en canvi en el nucli no es detecten canvis significatius (Figura 106B). Pel que fa a la intensitat dels agregats, també es produeix una disminució significativa en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics (Figura 106C), i en el nucli no es detecten canvis significatius (Figura 106D).



**Figura 106.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de PMP70 en les cèl·lules dels ratolins G93A als 150 dies d'edat. Analtitzat a partir de la quantificació del nombre agregats i de la intensitat de PMP70 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de seccions de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A, per microscopia confocal. **(A)** Disminució significativa del nombre d'agregats de PMP70 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PMP70 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(C)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de PMP70 en el citosol de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PMP70 en el nucli de les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  per Student's t-test.

Es va realitzar també un anàlisi per Western Blot de PMP70 en mostres de medul·la espinal de ratolins als 90 dies i 120 dies d'edat. Els resultats obtinguts no mostren diferències significatives en els nivells de la proteïna en les cèl·lules dels ratolins G93A respecte els no transgènics en cap de les dues edats (Figura 107A i 107B).



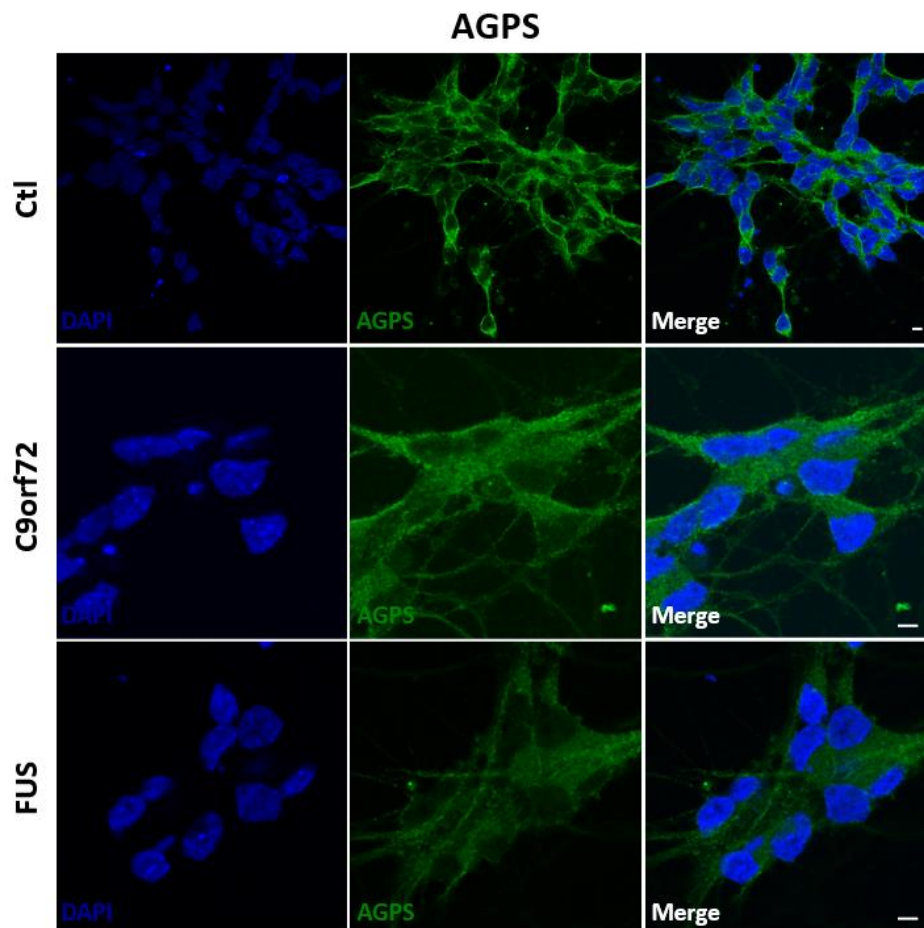
**Figura 107.** Els nivells de PMP70 no es troben alterats en les cèl·lules dels ratolins G93A als 90 dies ni als 120 dies d'edat. Analitzat per Western Blot en mostres de medul·la espinal de ratolins no transgènics i G93A als 90 dies i 120 dies d'edat. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. **(A)** Als 90 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de PMP70 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. **(B)** Als 120 dies d'edat del ratolí, no es detecten canvis significatius en els nivells de PMP70 en els ratolins G93A respecte els no transgènics. (n=3 ratolins per cada genotip). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test.

#### 5.4.2. Anàlisi en el model cel·lular de motoneurons derivades de pacients

S'ha analitzat el nombre d'agregats i la intensitat d'AGPS, en tres línies de motoneurons derivades de pacients, en la línia control, en la línia C9orf72 i en la línia FUS. Per PMP70 s'ha analitzat el nombre d'agregats en les cèl·lules de la línia C9orf72. A més a més, s'ha analitzat també el nombre d'agregats, tant d'AGPS com de PMP70, sota una situació d'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen i sota estrès osmòtic induït amb sorbitol.

##### 5.4.2.1. AGPS

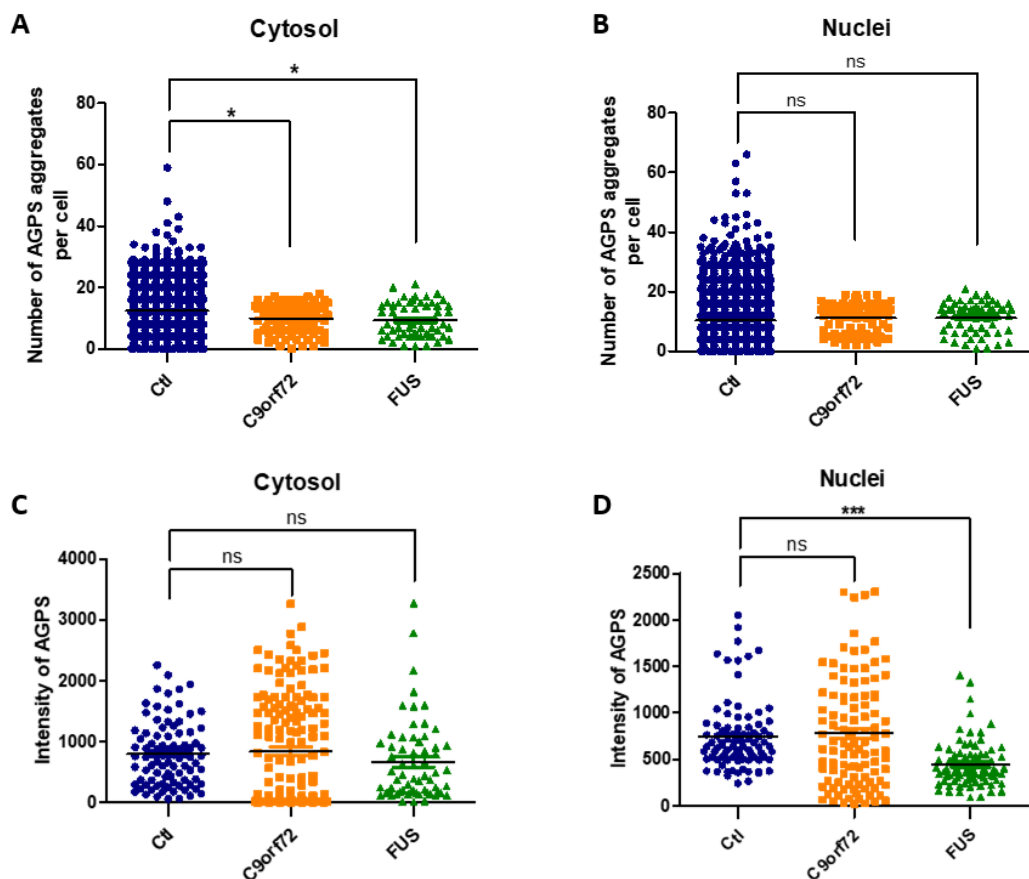
Les imatges obtingudes per microscopia confocal d'AGPS mostren una disminució de la proteïna en les cèl·lules de la línia FUS respecte la control (Figura 108).



**Figura 108.** Agregació d'AGPS en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats d'AGPS en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra una disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control (Figura 109A), en canvi en el nucli no es detecten canvis significatius (Figura 109B). Pel que fa a la intensitat dels agregats, en el citosol no s'observen canvis (Figura 109C) i en el nucli es produeix una disminució significativa d'aquesta intensitat en les cèl·lules de la línia FUS respecte la control (Figura 109D).



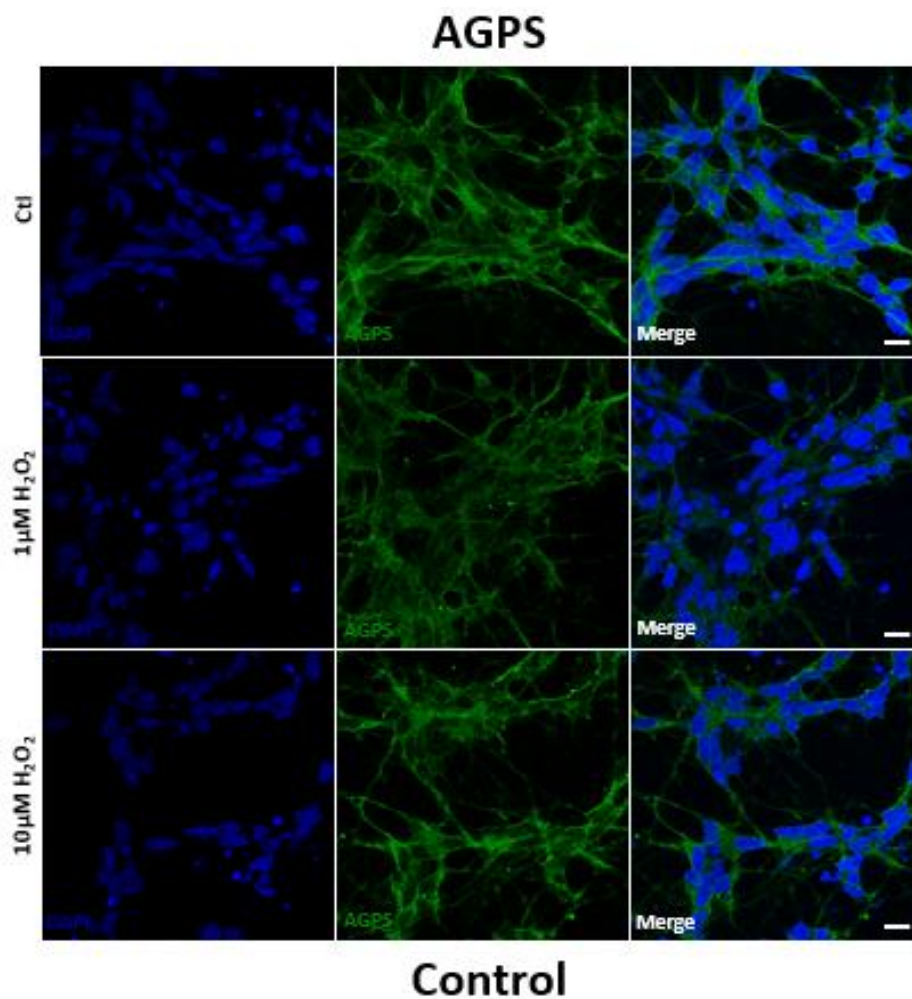


**Figura 109.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics d'AGPS en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS. Analtzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat d'AGPS en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats d'AGPS en el nucli de les cèl·lules en cap de les línies analitzades respecte la control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules en cap de les línies analitzades respecte la control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats d'AGPS en el nucli de les cèl·lules de la línia FUS respecte la control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

Per altra banda s'ha analitzat l'efecte de dos estressors a nivell d'agregació proteica d'AGPS. Les cèl·lules de les tres línies van ser tractades amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  durant 4h de tractament (estrès oxidatiu) i sorbitol a  $0.4\text{M}$  també durant 4h (estrès osmòtic).

#### 5.4.2.1.1. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació d'AGPS en les cèl·lules de la línia control

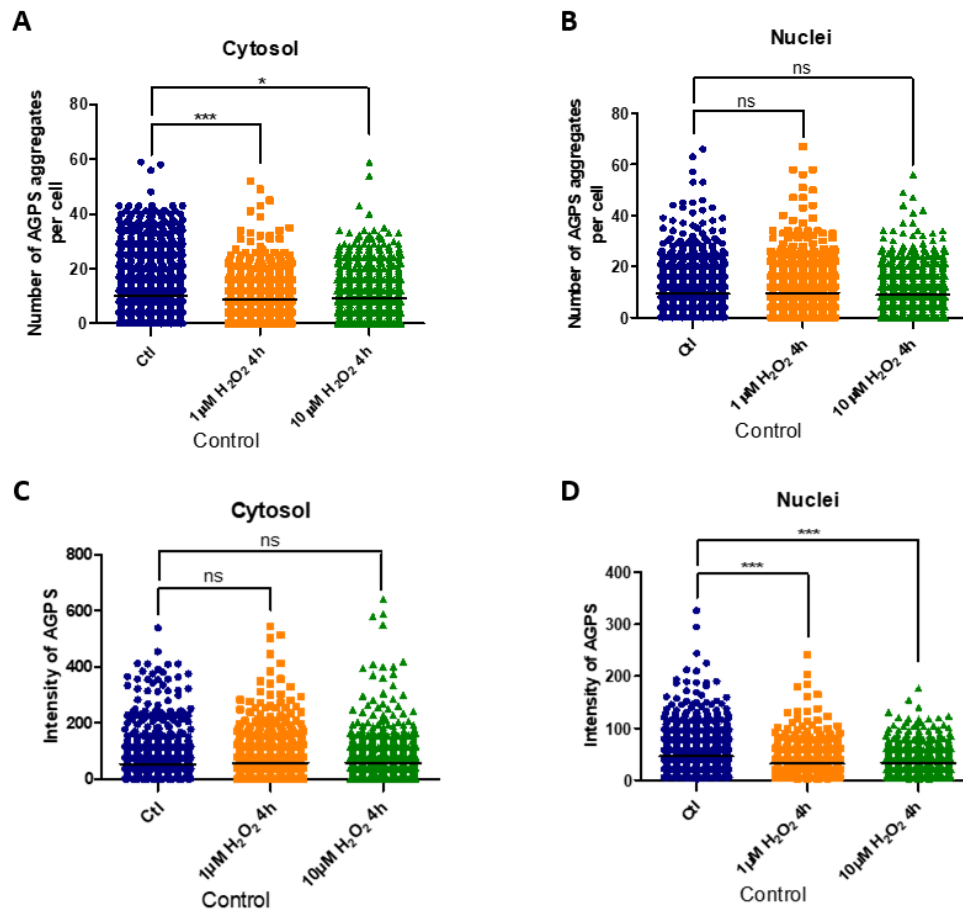
Les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren una disminució del nombre d'agregats d'AGPS sota el tractament amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  durant 4h respecte les control (Figura 110).



**Figura 110. Agregació d'AGPS sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia control.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats d'AGPS en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) durant 4h. Barres amb una longitud de  $10\mu\text{M}$ .

La quantificació obtinguda mostra una disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules tractades tant a  $1\mu\text{M}$  com a  $10\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen durant 4h respecte les control (Figura 111A). En canvi, en el nucli no es detecten canvis en el nombre d'agregats en cap de les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades respecte les control (Figura 111B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats, en el citosol no es

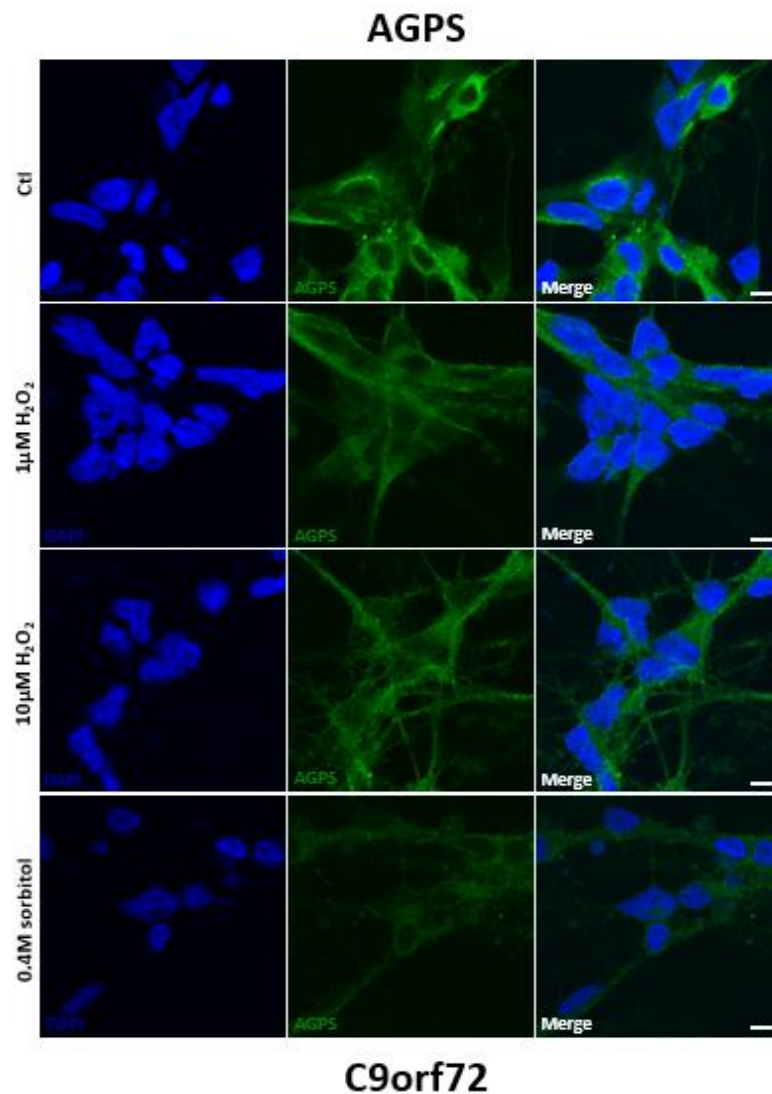
detecten canvis (Figura 111C) i en nucli es produeix una disminució significativa tant a  $1\mu\text{M}$  com a  $10\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 4h respecte les control (Figura 111D).



**Figura 111.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics d'AGPS sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia control. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat d'AGPS en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Disminució significativa dels nombre d'agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen durant 4h respecte les control. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats d'AGPS en el nucli de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. **(C)** No es detecten canvis en la intensitat dels agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules en caps dels tractaments utilitzats respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats d'AGPS en el nucli de les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen durant 4h respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

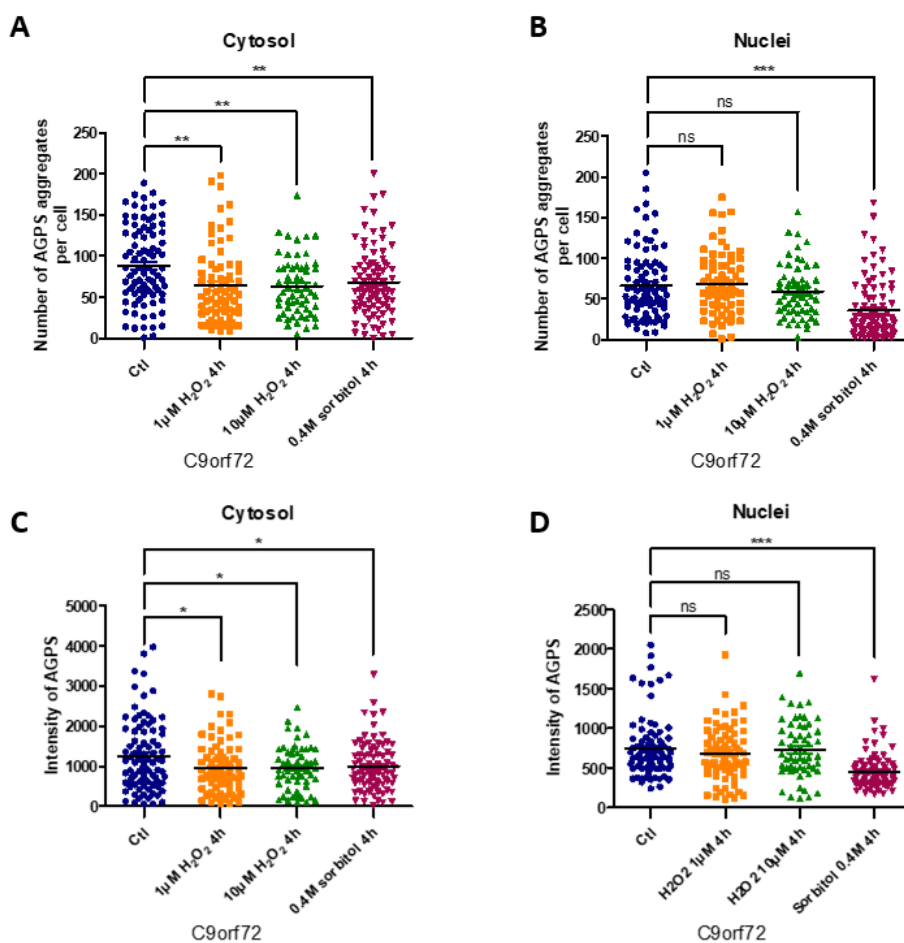
#### 5.4.2.1.2. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació d'AGPS en les cèl·lules de la línia C9orf72

Les imatges obtingudes per microscopia confocal d'AGPS mostren una disminució de la proteïna sota tots els tractaments utilitzats, tant amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  com amb sorbitol a  $0.4\text{M}$  durant 4h respecte les control (Figura 112).



**Figura 112.** Agregació d'AGPS sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72. Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats d'AGPS en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) i sorbitol ( $0.4\text{M}$ ) durant 4h. Barres amb una longitud de  $5\mu\text{M}$ .

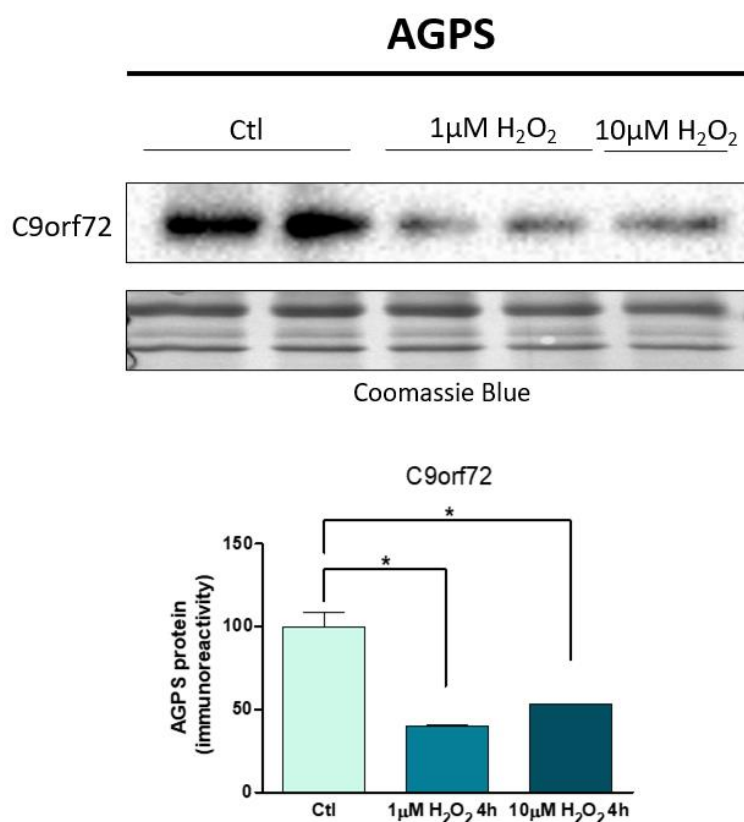
La quantificació obtinguda, tal i com s'ha observat anteriorment, mostra una disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules tractades tant a  $1\mu\text{M}$  com a  $10\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen i a  $0.4\text{M}$  de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 113A). En el nucli però aquesta disminució solament es produeix sota el tractament a  $0.4\text{M}$  de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 113B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats en el citosol disminueix també sota tots els tractaments utilitzats respecte les control (Figura 113C) i en el nucli, disminueix únicament sota el tractament amb sorbitol (Figura 113C).



**Figura 113.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears d'AGPS sota l'estrès oxidatiu i osmòtic induït amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament en les cèl·lules de la línia C9orf72. Anàlitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat d'AGPS en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS en el nucli de les cèl·lules tractades a  $0.4\text{M}$  de sorbitol durant 4h respecte les control. **(C)** Disminució

significativa de la intensitat dels agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules sota tots els tractaments utilitzats respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats d'AGPS en el nucli de les cèl·lules tractades a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

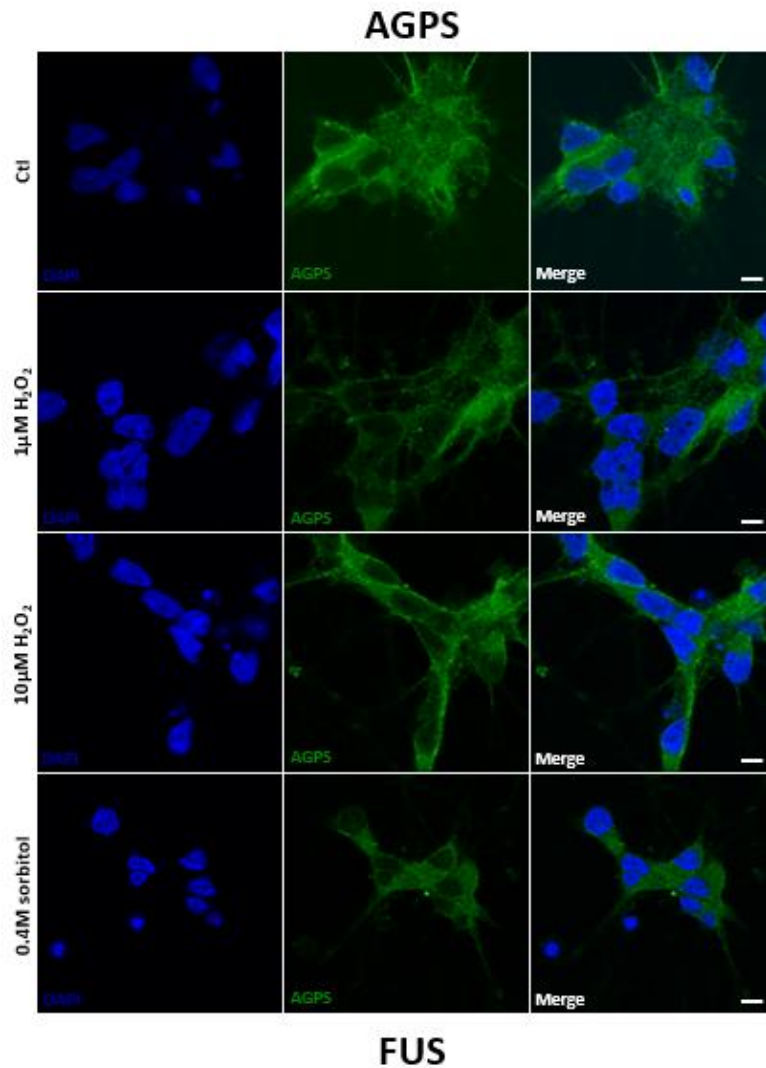
A més a més, es va realitzar un Western Blot per tal de corroborar l'observat anteriorment. Els resultats obtinguts mostren una disminució significativa dels nivells de la proteïna en les cèl·lules tractades tant a  $1\mu\text{M}$  com a  $10\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen respecte les control (Figura 114).



**Figura 114.** Alteració en els nivells d'AGPS sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia C9orf72. Analitzat per Western Blot en la línia C9orf72 sota l'estrès amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  durant 4h de tractament. Els anàlisis densitomètrics es mostren sota la transferència del Western després de la normalització amb tinció de blau Coomassie. Disminució significativa dels nivells d'AGPS en les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen durant 4h respecte les control. (n=2 per les control i  $10\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i n=1 per les  $1\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). \* Indica  $p < 0.05$  per one-way ANOVA.

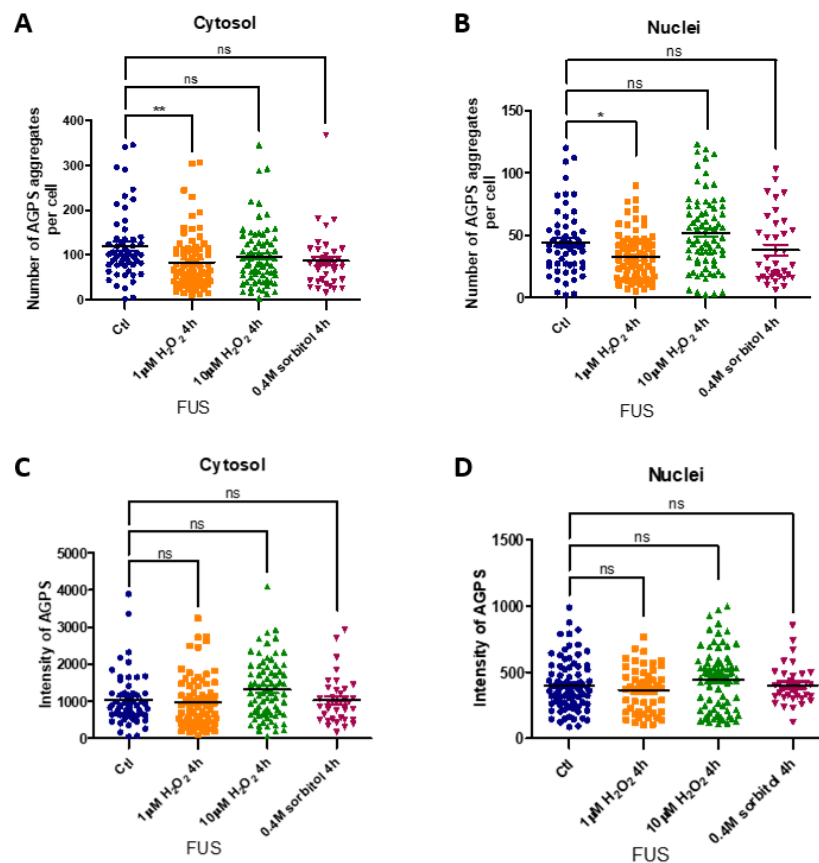
### 5.4.2.1.3. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació d'AGPS en les cèl·lules de la línia FUS

Les imatges obtingudes per microscopia confocal d'AGPS mostren una disminució del nombre d'agregats de la proteïna en les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen i a  $0.4\text{M}$  de sorbitol durant 4h respecte les control (Figura 115).



**Figura 115.** Agregació d'AGPS sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia FUS. Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats d'AGPS en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) i sorbitol ( $0.4\text{M}$ ) durant 4h. Barres amb una longitud de  $5\mu\text{M}$ .

Els resultats obtinguts en la quantificació mostren una disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS tant en el citosol com en el nucli de les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen durant 4h respecte les control (Figura 116A i 116B). Pel que fa la intensitat d'aquests agregats no es detecten canvis significatius ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control (Figura 116C i 116D).

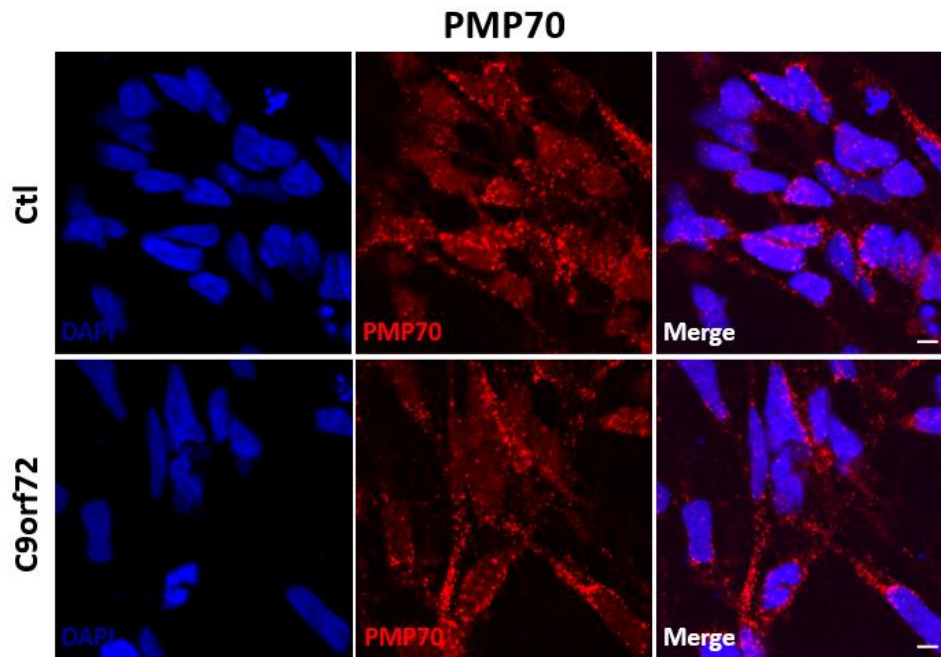


**Figura 116. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears d'AGPS sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia FUS.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat d'AGPS en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 4h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats d'AGPS en el nucli de les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 4h respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats d'AGPS en el citosol de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats d'AGPS en el nucli de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  per one-way ANOVA.



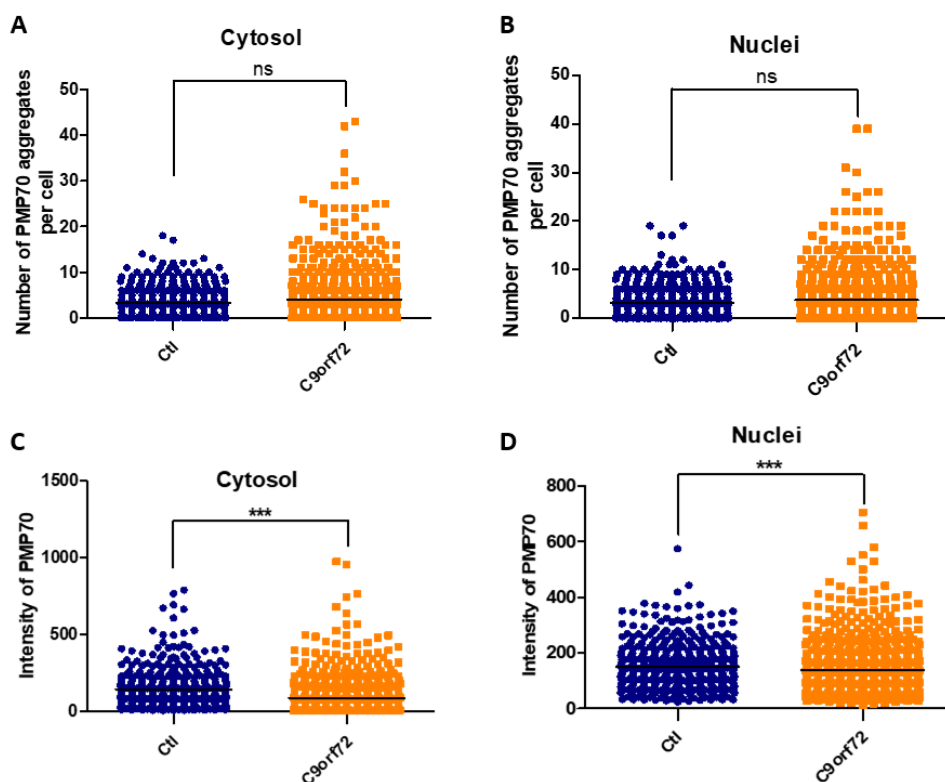
### 5.4.2.2. PMP70

Pel que fa a PMP70 les imatges obtingudes per microscopia confocal no mostren diferències en el nombre d'agregats de la proteïna en les cèl·lules de la línia C9orf72 respecte la control (Figura 117).



**Figura 117. Agregació d'AGPS en les cèl·lules de la línia control i C9orf72.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de PMP70 en les cèl·lules de la línia control i C9orf72. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda no mostra diferències significatives en el nombre d'agregats de la proteïna ni en el citosol ni en el nucli de les cèl·lules de la línia C9orf72 respecte la control (Figura 118A i 118B). Pel que fa a la intensitat dels agregats en canvi, si es produeix una disminució significativa en ambdós compartiments cel·lulars en la línia C9orf72 respecte la control (Figura 118C i 118D).



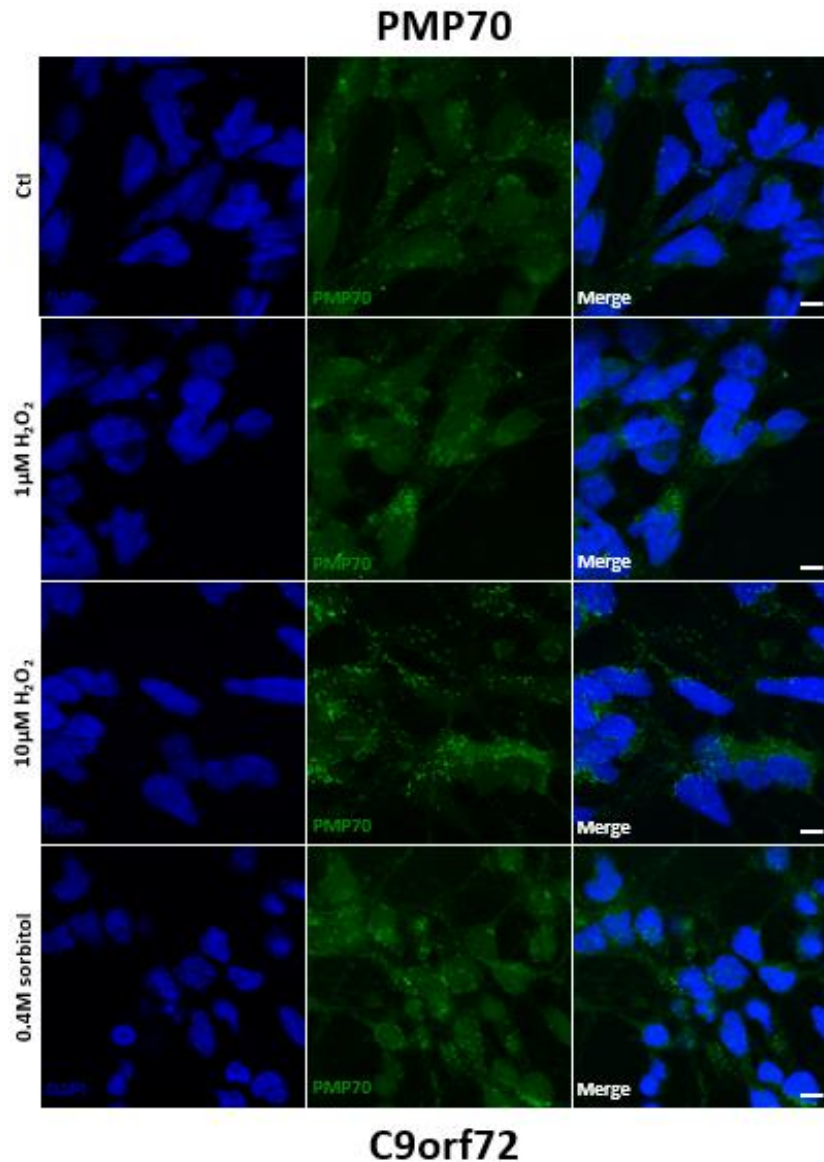
**Figura 118.** No es detecten canvis en el nombre d'agregats de PMP70 en les cèl·lules de la línia C9orf72. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de PMP70 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PMP70 en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 respecte la control. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de PMP70 en el nucli de les cèl·lules de la línia C9orf72 respecte la control. **(C)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de PMP70 en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 respecte la control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de PMP70 en el nucli de les cèl·lules de la línia C9orf72 respecte la control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

S'ha analitzat també PMP70 sota estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen a  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$  durant 4h i sota estrès osmòtic induït amb sorbitol a  $0.4\text{M}$  durant 4h de tractament. S'ha analitzat la proteïna en la línia cel·lular C9orf72.

#### 5.4.2.2.1. Efecte de l'estrès oxidatiu i osmòtic sobre l'agregació de PMP70 en les cèl·lules de la línia C9orf72

Les imatges obtingudes per microscopia confocal mostren un augment dels agregats de PMP70 sota tots els tractaments utilitzats, tant a  $1\mu\text{M}$  com a  $10\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen

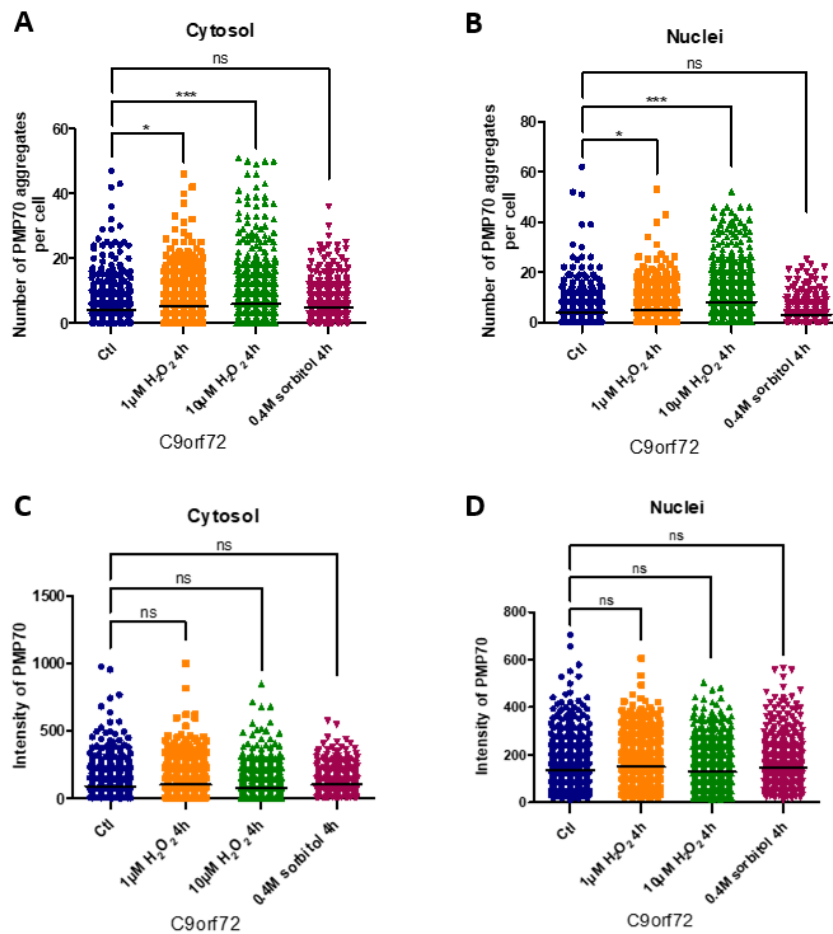
com a 0.4M de sorbitol durant 4h respecte les control. A més a més, sembla que és dosi dependent ja que en el cas del  $H_2O_2$  on s'observen més agregats és a la màxima concentració, 10 $\mu$ M (Figura 119).



**Figura 119. Agregació de PMP70 sota l'estrès oxidatiu i osmòtic en les cèl·lules de la línia C9orf72.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de PMP70 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) i sorbitol (0.4M) durant 4h. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de PMP70 en el citosol i en el nucli de les cèl·lules sota ambdues concentracions de peròxid d'hidrogen, 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M, durant 4h respecte les control (Figura 120A i 120B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats no es

detecten canvis significatius en cap dels dos compartiments cel·lulars sota cap dels tractaments utilitzats respecte les control (Figura 120C i 120D).



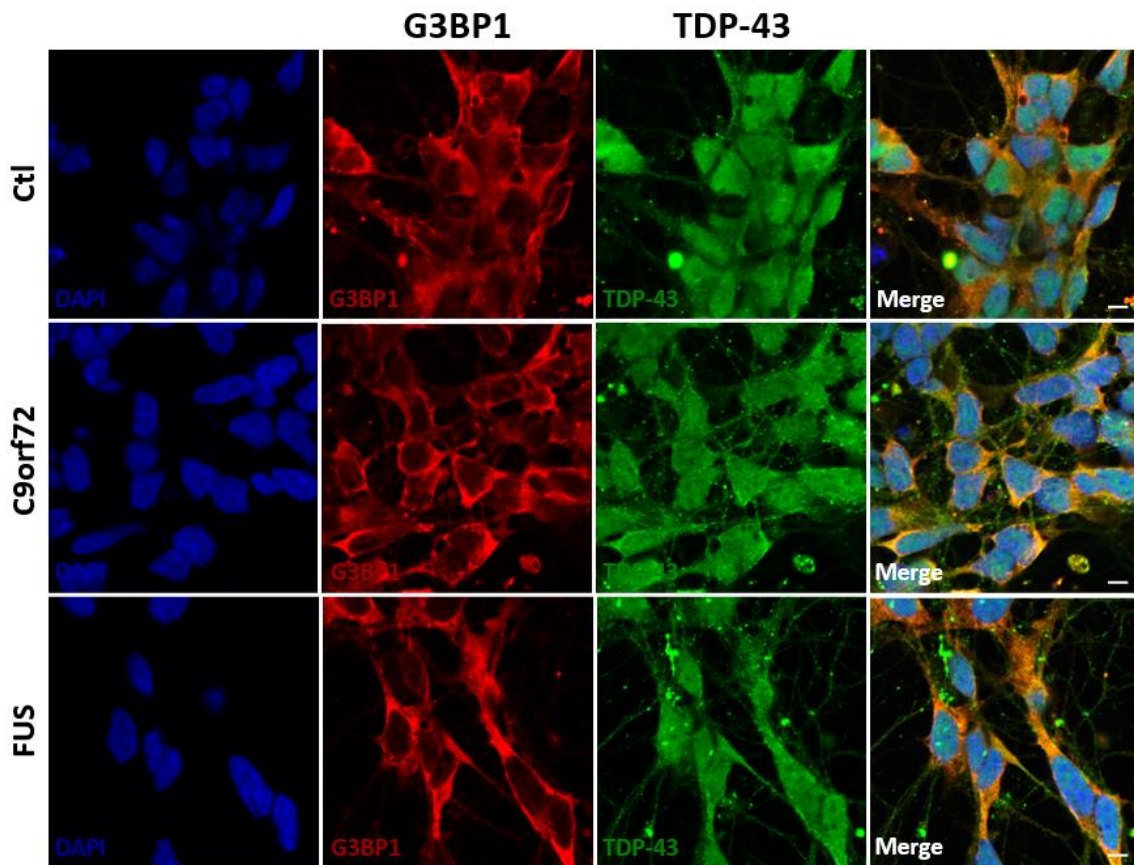
**Figura 120.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de PMP70 sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia C9orf72. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de PMP70 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de PMP70 en el citosol de les cèl·lules tractades a 1μM i 10μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 4h respecte les control. **(B)** Augment significatiu del nombre d'agregats de PMP70 en el nucli de les cèl·lules tractades a 1μM i 10μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 4h respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PMP70 en el citosol de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de PMP70 en el nucli de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. ns Indica p>0.05, \* p<0.05, \*\*\*p<0.001 per one-way ANOVA.

## 5.5. Alteració en proteïnes presents en grànuls d'estrès

S'han analitzat el nombre d'agregats i la intensitat de G3BP1 i TDP-43, proteïnes presents en grànuls d'estrès, en tres línies de motoneurons derivades de pacients: en la línia control, en la línia C9orf72 i en la línia FUS.

### 5.5.1. Anàlisi en el model cel·lular de motoneurons derivades de pacients

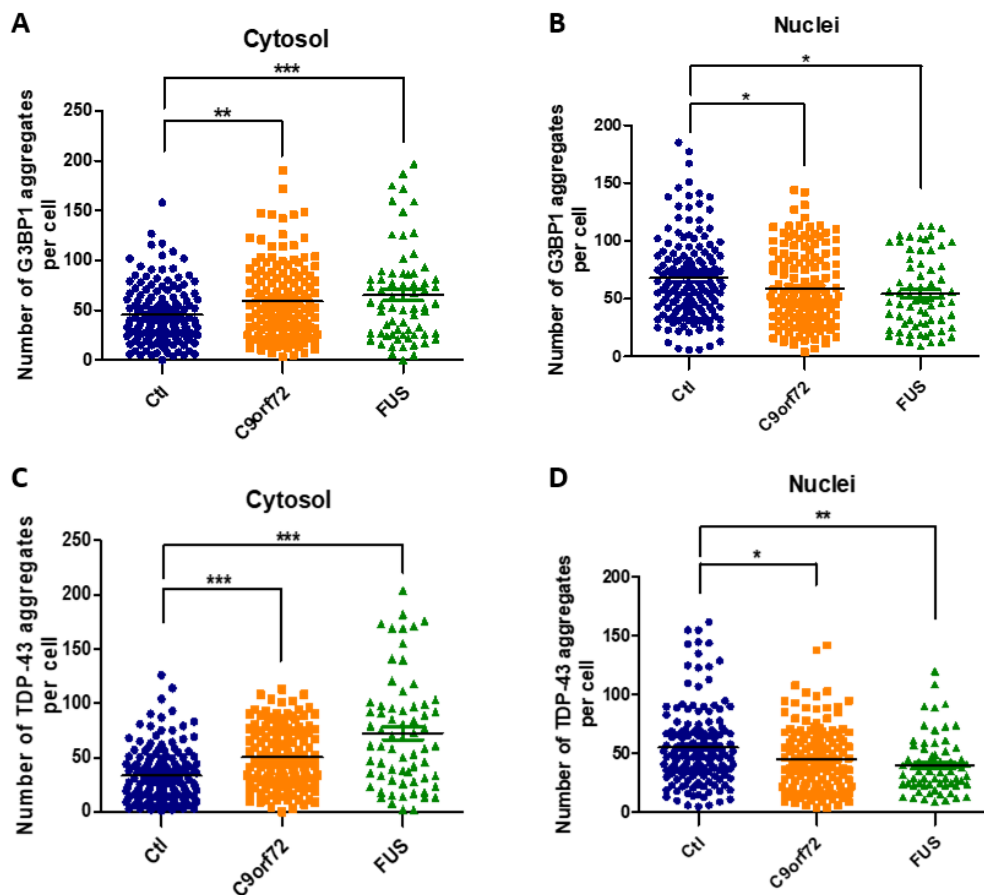
Les imatges obtingudes per microscopia confocal de G3BP1 i TDP-43 mostren un augment d'ambdues proteïnes en les cèl·lules tant de la línia C9orf72 com de la línia FUS respecte la control (Figura 121).



**Figura 121. Agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia control, C9orf72 i FUS. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules

de la línia C9orf72 i FUS respecte la control (Figura 122A) i en canvi, en el nucli el nombre d'agregats disminueix en ambdues línies respecte la control (Figura 122B). Pel que fa a TDP-43, el nombre d'agregats també augmenta significativament en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control (Figura 122C), i en el nucli en canvi disminueix tant en les cèl·lules de la línia C9orf72 com en la FUS respecte la control (Figura 122D).



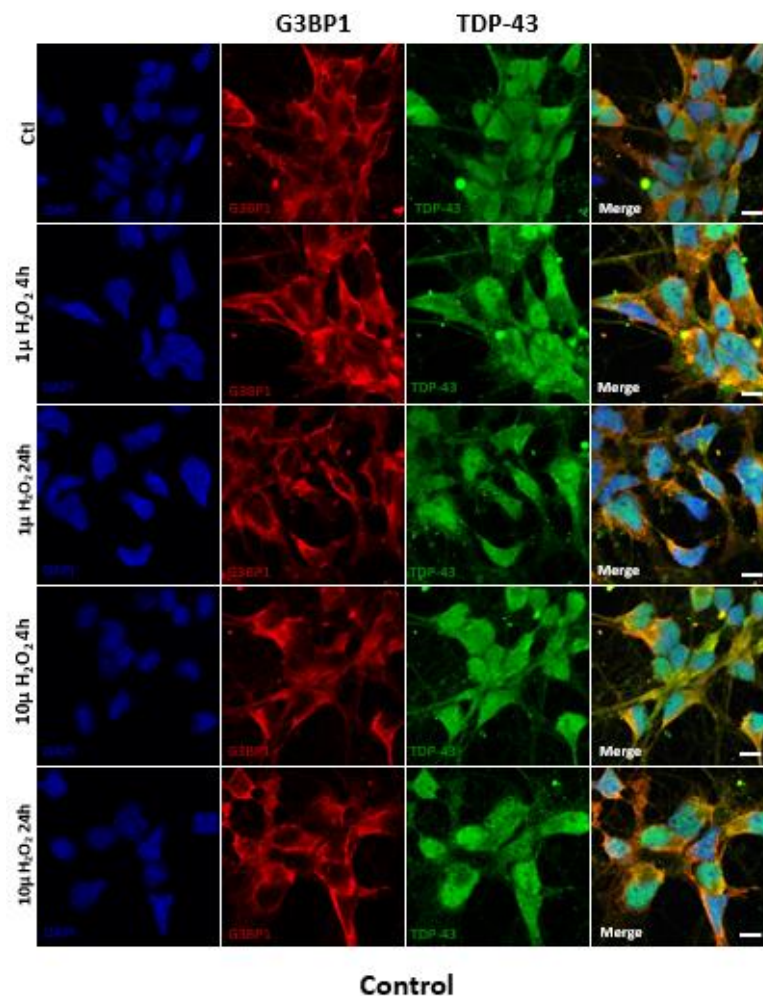
**Figura 122. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de G3BP1 i TDP-43 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(C)** Augment significatiu del nombre d'agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. **(D)** Disminució significativa del nombre d'agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules de la línia C9orf72 i FUS respecte la control. \* Indica  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

A més a més, s'ha analitzat també el nombre d'agregats, tant de G3BP1 com de TDP-43, sota una situació d'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen i sota un estrès per ARN forà induït amb poly-IC. Ambdós tractaments s'han realitzat a dos temps, a 4h i a 24h, i en les tres línies cel·lulars.

### 5.5.1.1. Línia control

#### 5.5.1.1.1. Efecte de l'estrès oxidatiu sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia control

Les imatges obtingudes per microscopia confocal de G3BP1 i TDP-43, mostren un augment del nombre d'agregats d'ambdues proteïnes sota totes les concentracions utilitzades de peròxid d'hidrogen,  $1\mu\text{M}$  i  $10\mu\text{M}$ , i a ambdós temps de tractament, 4h i 24h respecte les control (Figura 123).



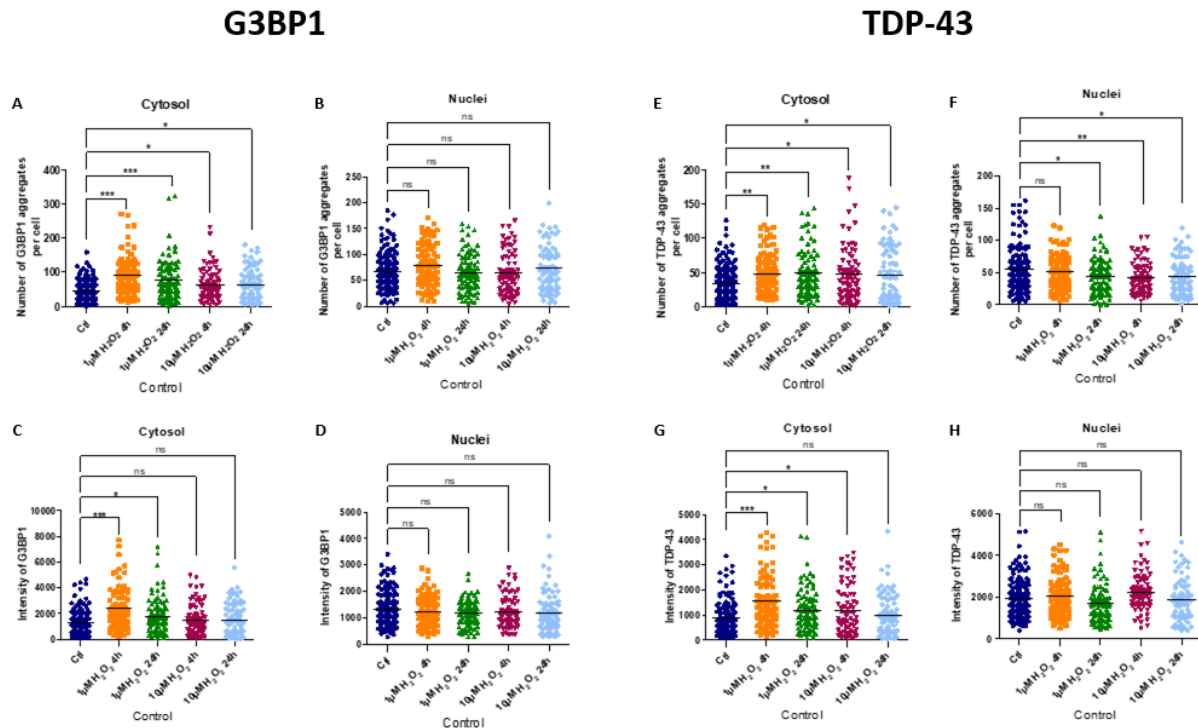
**Figura 123. Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia control.**

Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) durant 4h i 24h. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades, 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M, durant 4h i 24h respecte les control (Figura 124A), en el nucli però no es detecten canvis en cap de les concentracions utilitzades (Figura 124B). La intensitat d'aquests agregats també augmenta en el citosol de les cèl·lules tractades a 1 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a ambdós temps respecte les control (Figura 124C) i en el nucli no es produeixen canvis (Figura 124D).

Pel que fa a TDP-43, es produeix també un augment significatiu del nombre d'agregats en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades, 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M, durant 4h i 24h respecte les control (Figura 124E) i en el nucli es produeix una disminució significativa del nombre d'aquests agregats en les cèl·lules tractades a 1 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 4h i a 10 $\mu$ M durant 4h i 24h respecte les control (Figura 124F). La intensitat d'aquests agregats també augmenta en el citosol de les cèl·lules tractades a 1 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a ambdós temps i a 10 $\mu$ M durant 4h respecte les control (Figura 124G) i en el nucli no es detecten canvis significatius (Figura 124H).

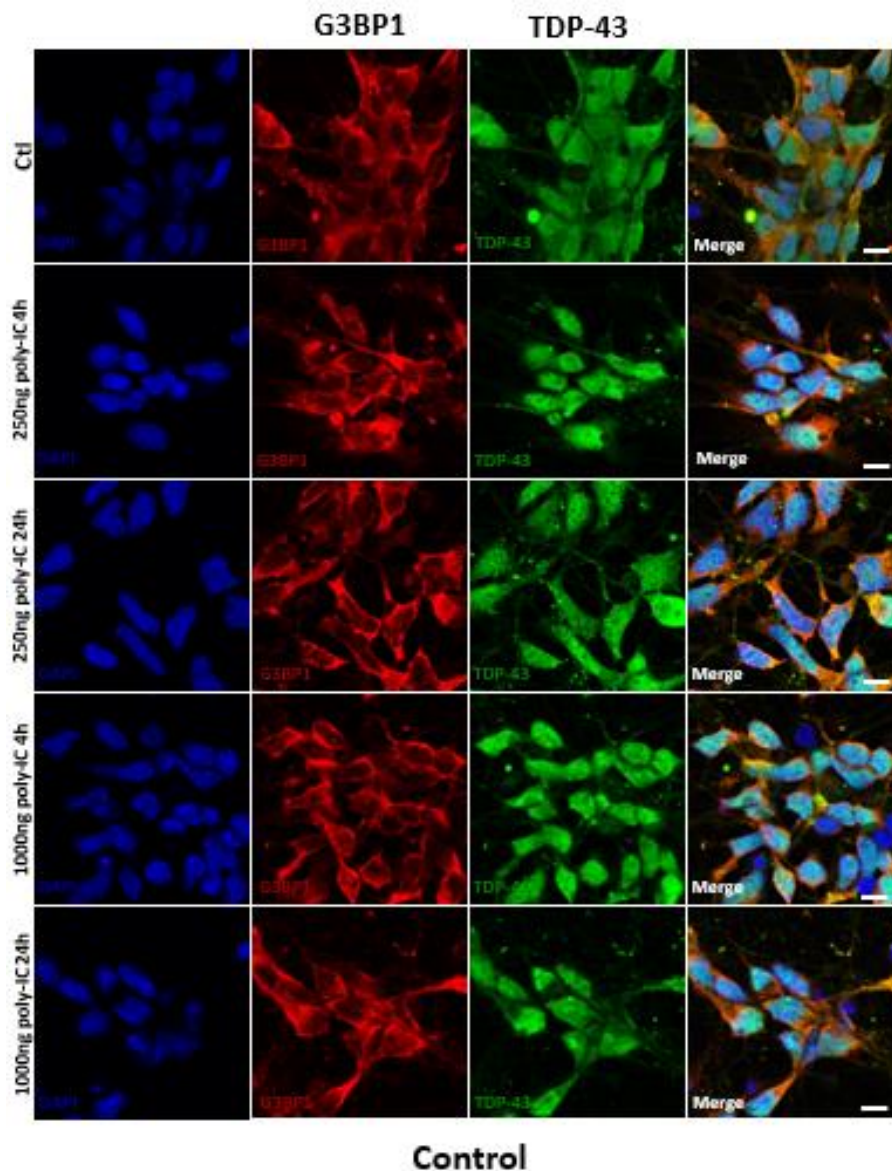




**Figura 124.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de G3BP1 i en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de TDP-43 sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia control. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de G3BP1 i TDP-43 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades durant 4h i 24h respecte les control. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades respecte les control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules tractades a 1µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 4h i 24h respecte les control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades respecte les control. **(E)** Augment significatiu del nombre d'agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades durant 4h i 24h respecte les control. **(F)** Disminució significativa del nombre d'agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules tractades a 1µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 24h i a 10µM durant 4h i 24h respecte les control. **(G)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules tractades a 1µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 4h i 24h i a 10µM durant 4h respecte les control. **(H)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades respecte les control. ns Indica p>0.05, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 per one-way ANOVA.

### 5.5.1.1.2. Efecte de l'estrès per ARN forà sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia control

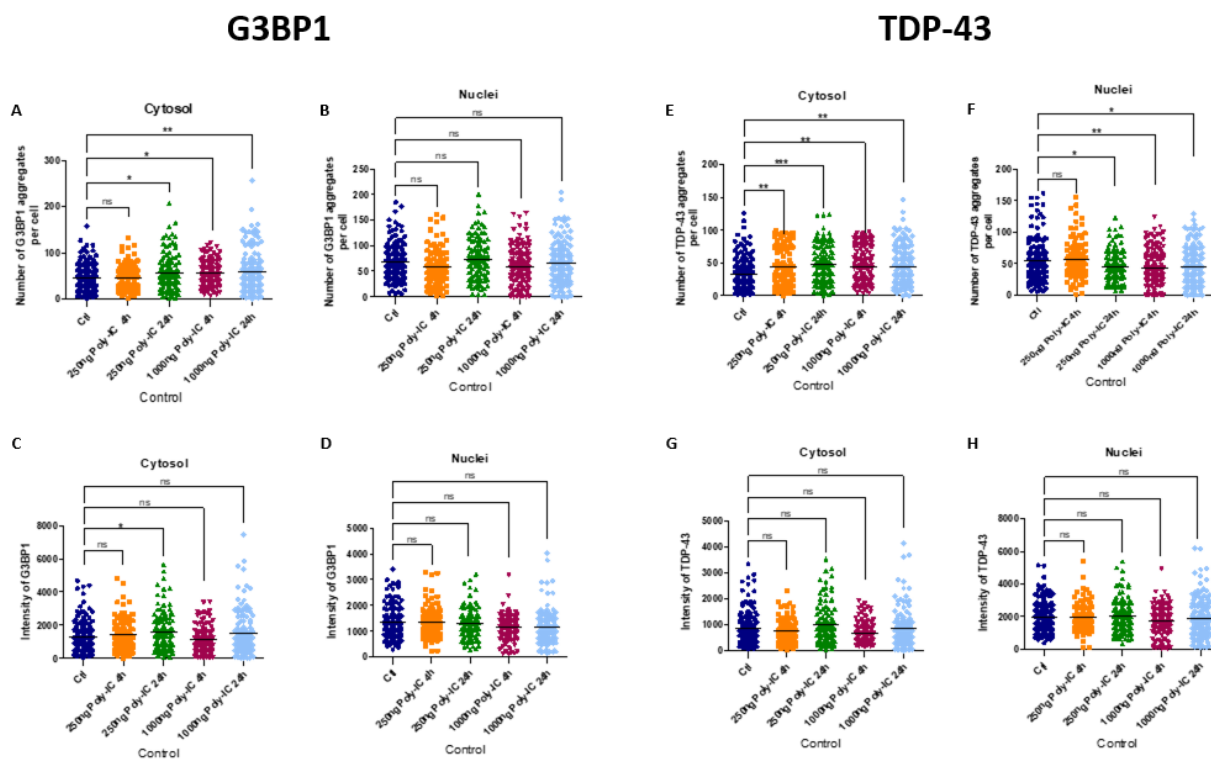
Les imatges obtingudes per microscopia confocal de G3BP1 i TDP-43, mostren un augment del nombre d'agregats tant de G3BP1 com de TDP-43 sota totes les concentracions de poly-IC utilitzades, 250ng i 1000ng, durant 4h i 24h respecte les control (Figura 125).



**Figura 125.** Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès per ARN forà en les cèl·lules de la línia control. Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules exposades a poly-IC (250ng, 1000ng) durant 4h i 24h. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 24h i a 1000ng durant 4h i 24h respecte les control (Figura 126A), en el nucli però no es detecten canvis significatius (Figura 126B). La intensitat d'aquests agregats també augmenta en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 24h respecte les control (Figura 126C) i en el nucli no es detecten canvis significatius en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades respecte les control (Figura 126D).

Pel que fa a TDP-43, es produeix un augment significatiu del nombre d'agregats en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de poly-IC utilitzades, 250ng i 1000ng, durant 4h i 24h, respecte les control (Figura 126E) i en el nucli es produeix una disminució significativa del nombre d'aquests agregats en les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 4h i a 1000ng a ambdós temps respecte les control (Figura 126F). En la intensitat d'aquests agregats però, no s'observen canvis significatius ni en el citosol ni en el nucli en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades respecte les control (Figura 126G i 126H).

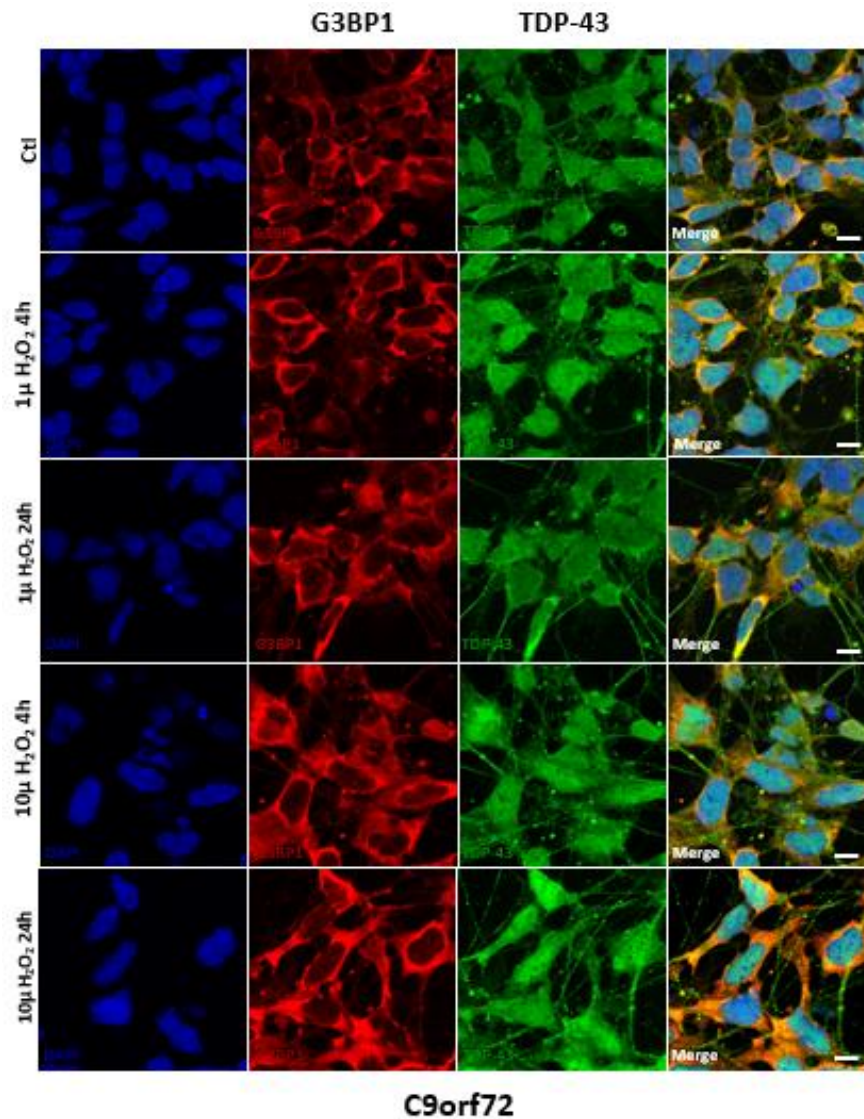


**Figura 126. Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de G3BP1 i en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de TDP-43 sota l'estrès per ARN forà induït amb Poly-IC en les cèl·lules de la línia control.** Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de G3BP1 i TDP-43 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 24h i a 1000ng durant 4h i 24h respecte les control. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades respecte les control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 24h respecte les control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades respecte les control. **(E)** Augment significatiu del nombre d'agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de poly-IC utilitzades durant 4h i 24h respecte les control. **(F)** Disminució significativa del nombre d'agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 4h i a 1000ng durant 4h i 24h respecte les control. **(G)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades respecte les control. **(H)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

### 5.5.1.2. Línia C9orf72

#### 5.5.1.2.1. Efecte de l'estrès oxidatiu sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia C9orf72

Les imatges obtingudes per microscopia confocal de G3BP1 i TDP-43, mostren un augment del nombre d'agregats d'ambdues proteïnes sota el tractament a 10 $\mu$ M de peròxid d'hidrogen durant 4h i 24h respecte les control (Figura 127).

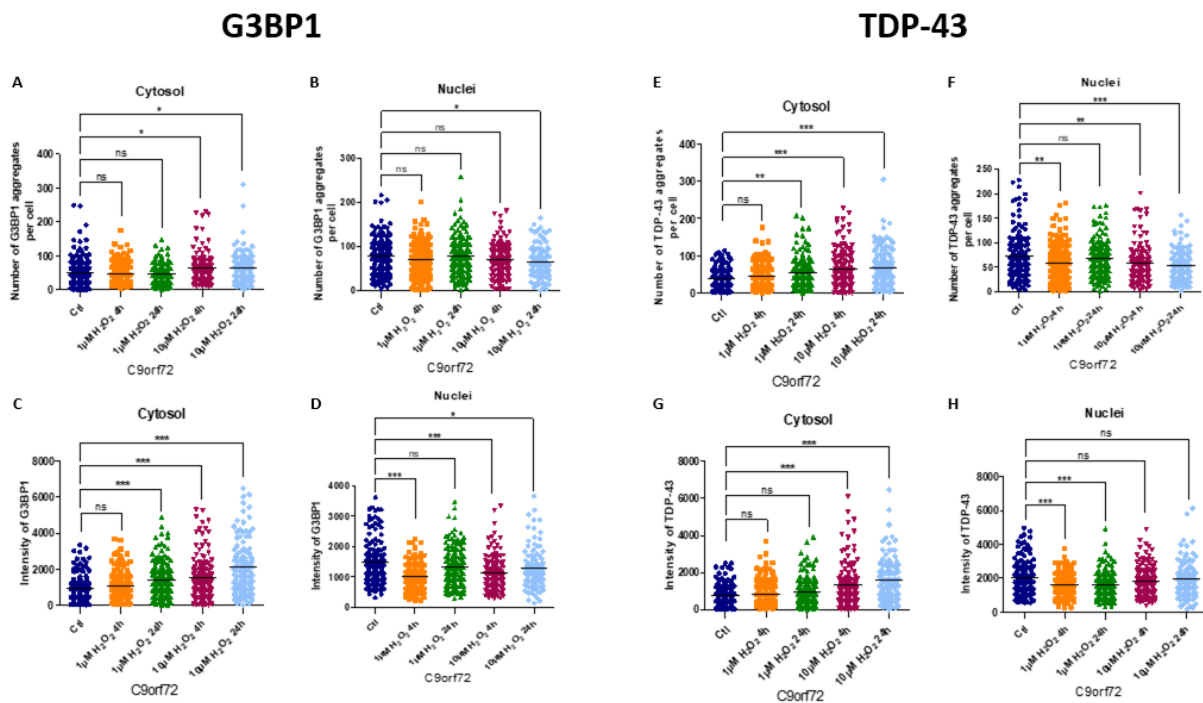


**Figura 127. Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia C9orf72.** Analtzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1µM, 10µM) durant 4h i 24h. Barres amb una longitud de 5µM.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules tractades a 10µM de peròxid d'hidrogen durant 4h i 24h respecte les control (Figura 128A), en canvi en el nucli es produeix l'efecte contrari, disminueix el nombre d'aquests agregats en les cèl·lules tractades a 10µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 24h (Figura 128B). La intensitat d'aquests agregats també augmenta en el citosol de les cèl·lules tractades a 1µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 24h i a 10µM a ambdós temps respecte les control (Figura 128C). En el nucli en canvi disminueix

la intensitat en les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 4h i a  $10\mu\text{M}$  durant 4h i 24h respecte les control (Figura 128D).

Pel que fa a TDP-43, es produeix un augment significatiu del nombre d'agregats en el citosol de les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de peròxid d'hidrogen durant 24h i a  $10\mu\text{M}$  a ambdós temps respecte les control (Figura 128E) i en el nucli disminueix en les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 4h i a  $10\mu\text{M}$  durant 4h i 24h respecte les control (Figura 128F). La intensitat d'aquests agregats augmenta en el citosol amb el tractament a  $10\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a ambdós temps respecte les control (Figura 128G) i en el nucli disminueix a  $1\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 4h i 24h respecte les control (Figura 128H).

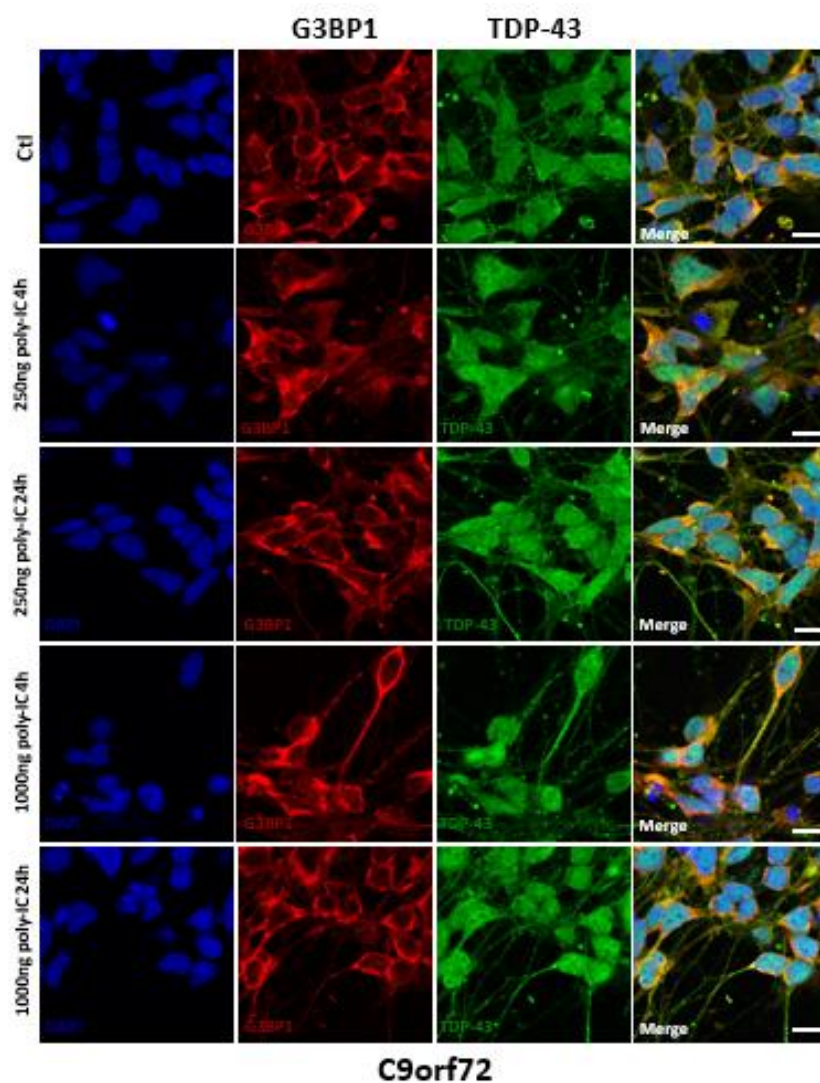


**Figura 128.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlic i nuclears de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia C9orf72. Analtitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de G3BP1 i TDP-43 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules tractades a  $10\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 4h i 24h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules tractades a  $10\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 24h respecte les control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 24h i a  $10\mu\text{M}$  durant 4h i 24h respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 4h i a  $10\mu\text{M}$  durant 4h i 24h respecte les control. **(E)** Augment significatiu del nombre d'agregats de TDP-43 en el citosol de les

cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 24h i a  $10\mu\text{M}$  durant 4h i 24h respecte les control. **(F)** Disminució significativa del nombre d'agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 4h i a  $10\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 4h i 24h respecte les control. **(G)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules tractades a  $10\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 4h i 24h respecte les control. **(H)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules tractades a  $1\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durant 4h i 24h respecte les control. ns Indica  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  per one-way ANOVA.

### 5.5.1.2.2. Efecte de l'estrès per ARN forà sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia C9orf72

Les imatges obtingudes per microscopia confocal de G3BP1 i TDP-43, mostren un augment del nombre d'agregats tant de G3BP1 com de TDP-43 sota la màxima concentració de poly-IC, 1000ng, i a ambdós temps de tractament, 4h i 24h, respecte les control (Figura 129).



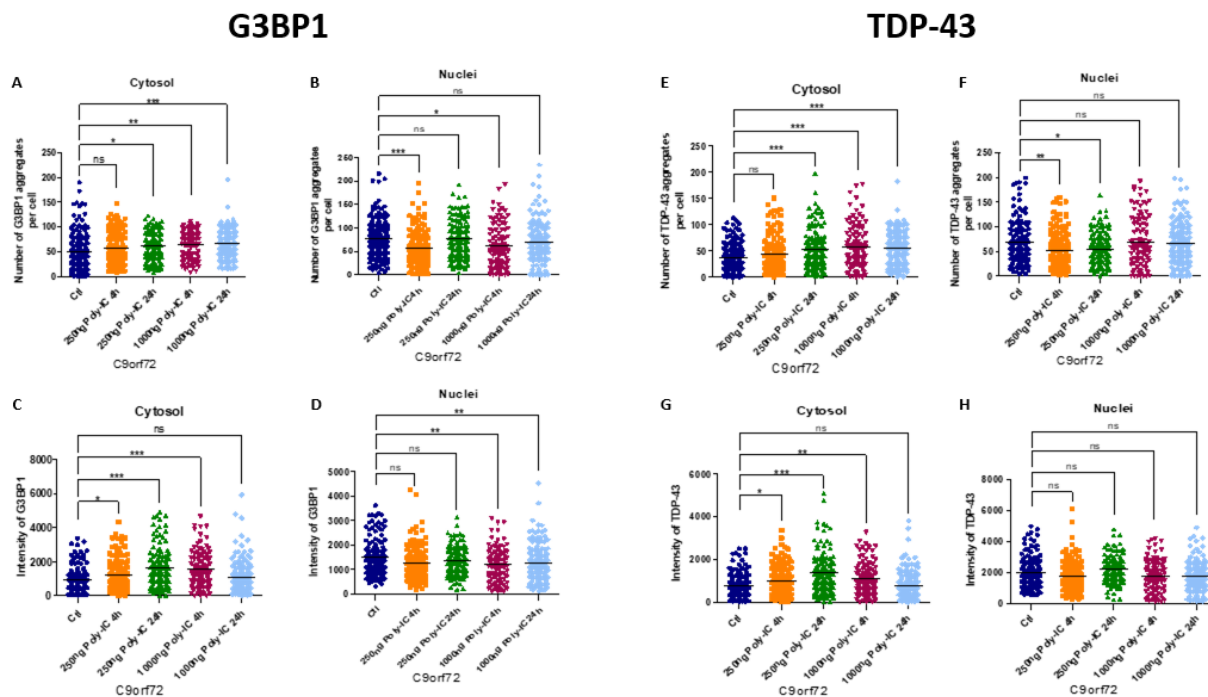
**Figura 129. Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès per ARN forà en les cèl·lules de la línia C9orf72.**

Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules exposades a poly-IC (250ng, 1000ng) durant 4h i 24h. Barres amb una longitud de 5µM.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 24h i a 1000ng durant 4h i 24h respecte les control (Figura 130A), en el nucli en canvi es produeix una disminució significativa del nombre d'agregats en les cèl·lules tractades a 250ng i 1000ng de poly-IC durant 4h respecte les control (Figura 130B). La intensitat d'aquests agregats augmenta en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC a ambdós temps i a 1000ng durant 4h respecte les control (Figura 130C) i en el nucli en canvi disminueix en les cèl·lules tractades a 1000ng de poly-IC a ambdós respecte les control (Figura 130D).

Pel que fa a TDP-43, es produeix un augment significatiu del nombre d'agregats en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 24h i a 1000ng durant 4h i 24h respecte les control (Figura 130E). En canvi, en el nucli disminueix solament sota el tractament a 250ng de poly-IC durant 4h i 24h respecte les control (Figura 130F). La intensitat d'aquests agregats augmenta significativament en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC a ambdós temps i a 1000ng durant 4h respecte les control (Figura 130G), en el nucli no es detecten canvis en la intensitat en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades (Figura 130H).



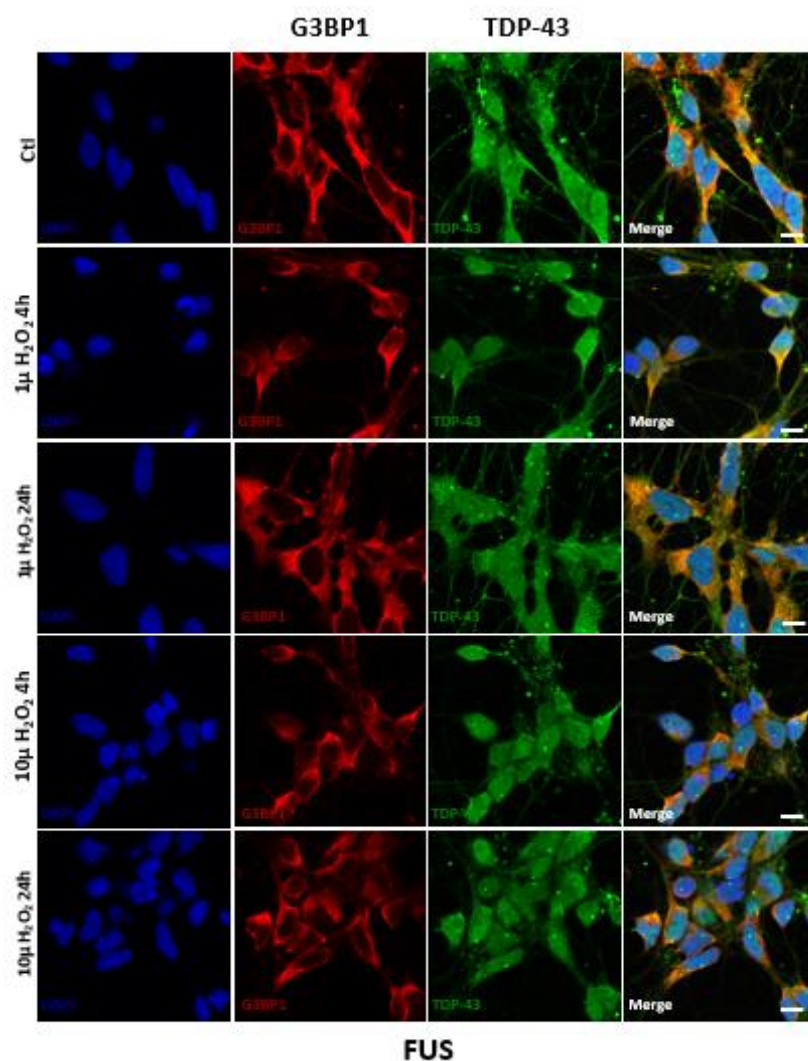


**Figura 130.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics i nuclears de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès per ARN forà induït amb Poly-IC en les cèl·lules de la línia C9orf72. Analtzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de G3BP1 i TDP-43 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Augment significatiu del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 24h i a 1000ng durant 4h i 24h respecte les control. **(B)** Disminució significativa del nombre d'agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules tractades a 250ng i 1000ng de poly-IC durant 4h respecte les control. **(C)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 4h i 24h i a 1000ng durant 4h respecte les control. **(D)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules tractades a 1000ng de poly-IC durant 4h i 24h respecte les control. **(E)** Augment significatiu del nombre d'agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 24h i a 1000ng durant 4h i 24h respecte les control. **(F)** Disminució significativa del nombre d'agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 4h i 24h respecte les control. **(G)** Augment significatiu de la intensitat dels agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules tractades a 250ng de poly-IC durant 4h i 24h i a 1000ng durant 4h respecte les control. **(H)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

### 5.5.1.3. Línia FUS

#### 5.5.1.3.1. Efecte de l'estrès oxidatiu sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia FUS

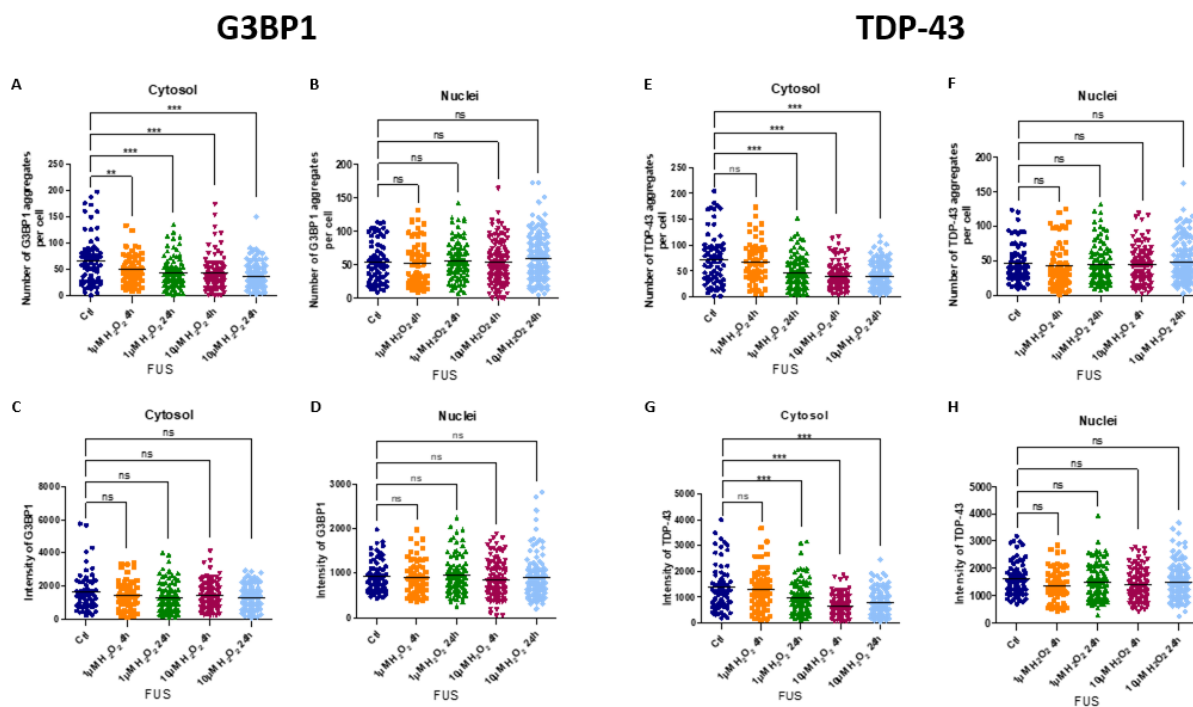
Les imatges obtingudes per microscopia confocal de G3BP1 i TDP-43, mostren una disminució del nombre d'agregats d'ambdues proteïnes sota totes les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades, 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M, i a ambdós temps de tractament, 4h i 24h, respecte les control (Figura 131).



**Figura 131.** Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès oxidatiu en les cèl·lules de la línia FUS. Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules exposades a peròxid d'hidrogen (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) durant 4h i 24h. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra un augment significatiu del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de peròxid d'hidrogen utilitzades, 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M, durant 4h i 24h respecte les control (Figura 132A), en el nucli en canvi no es detecten canvis significatius en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 132B). Pel que fa a la intensitat d'aquets agregats, no es detecten canvis ni en el citosol ni en el nucli en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades respecte les control (Figura 132C i 132D).

Pel que fa a TDP-43, es produeix una disminució significativa del nombre d'agregats en el citosol de les cèl·lules tractades a 1 $\mu$ M de peròxid d'hidrogen durant 24h i a 10 $\mu$ M a ambdós temps respecte les control (Figura 132E) i en el nucli en canvi no s'observen diferències en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 132F). La intensitat d'aquests agregats disminueix en el citosol de les cèl·lules tractades a 1 $\mu$ M de peròxid d'hidrogen durant 24h i a 10 $\mu$ M a ambdós temps respecte les control (Figura 132G) i en el nucli tampoc es produeixen canvis significatius en cap de les concentracions utilitzades respecte les control (Figura 132H).

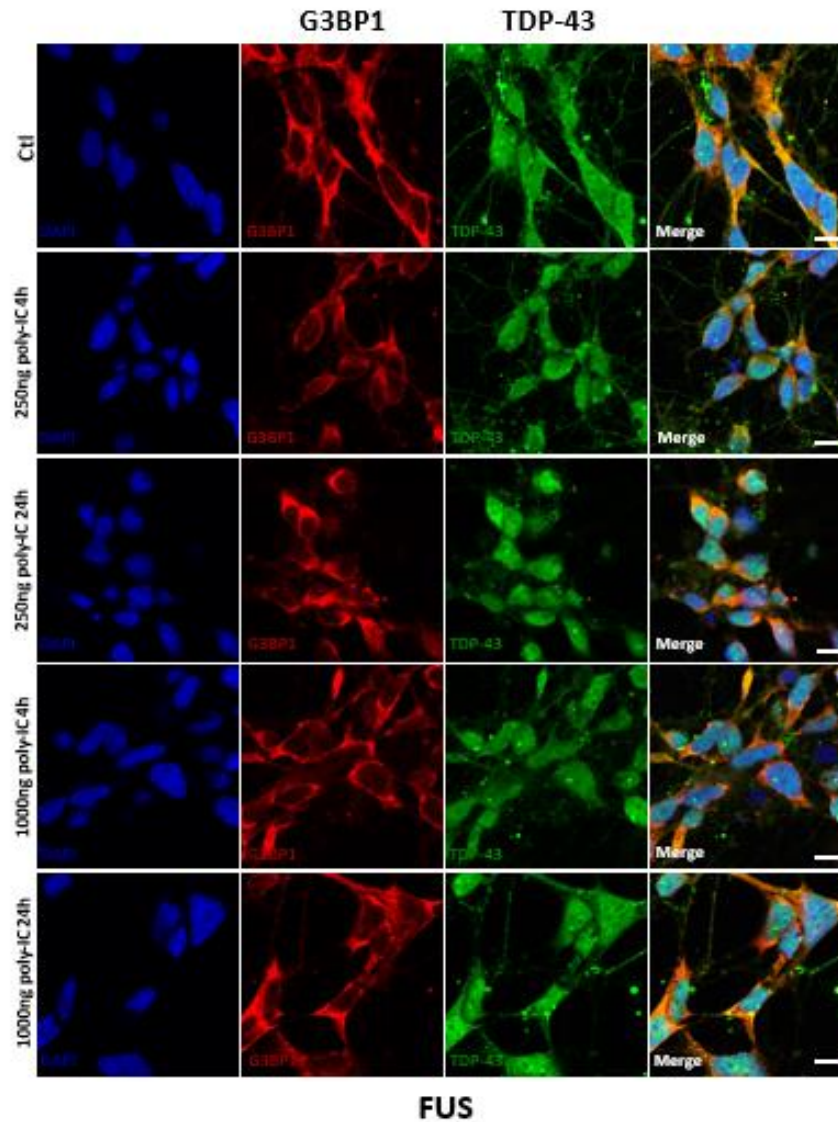


**Figura 132.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen en les cèl·lules de la línia FUS. Analtzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de G3BP1 i TDP-43 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Disminució

significativa del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades durant 4h i 24h respecte les control. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades respecte les control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades respecte les control. **(E)** Disminució significativa del nombre d'agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules tractades a 1μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 24h i a 10μM durant 4h i 24h respecte les control. **(F)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades respecte les control. **(G)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules tractades a 1μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 24h i a 10μM durant 4h i 24h respecte les control. **(H)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilitzades respecte les control. ns Indica p>0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 per one-way ANOVA.

#### **5.5.1.3.2. Efecte de l'estrès per ARN forà sobre l'agregació de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules de la línia FUS**

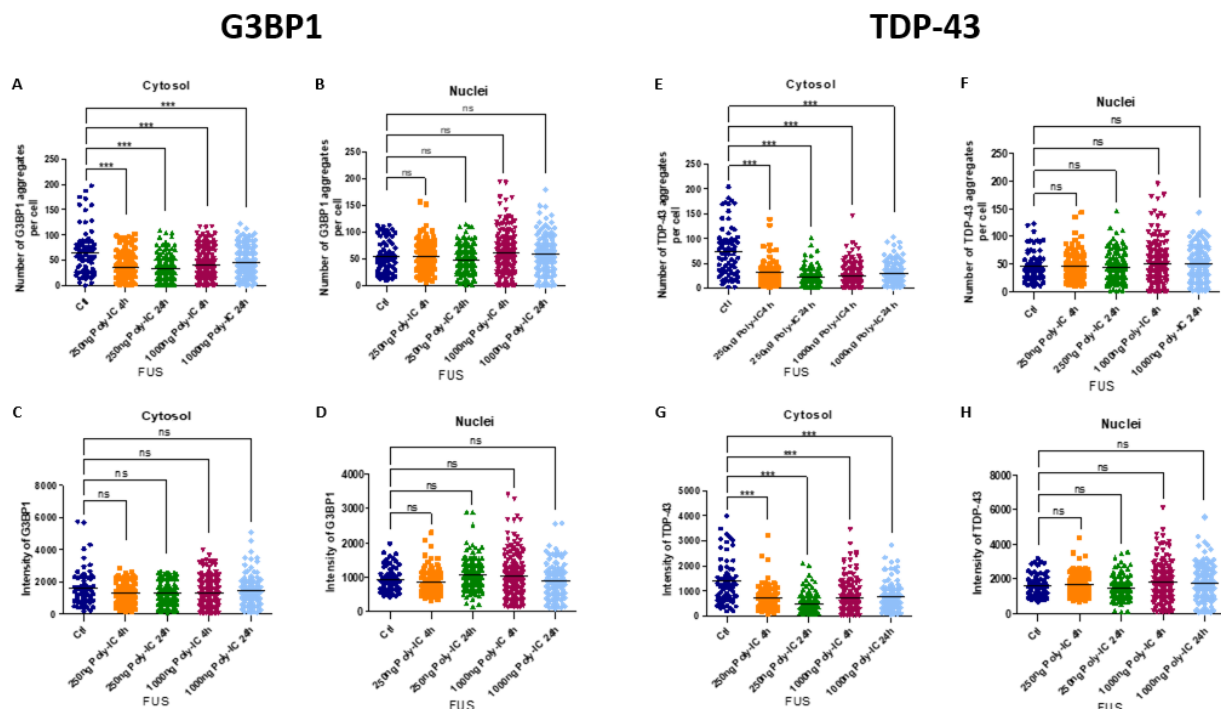
Les imatges obtingudes per microscopia confocal de G3BP1 i TDP-43, mostren una disminució del nombre d'agregats d'ambdues proteïnes sota totes les concentracions de poly-IC utilitzades, 250ng i 1000ng, i a ambdós temps de tractament, 4h i 24h, respecte les control (Figura 133).



**Figura 133. Agregació de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès per ARN forà en les cèl·lules de la línia FUS.** Analitzat per microscopia confocal, es mostra una imatge representativa dels agregats de G3BP1 i TDP-43 en les cèl·lules exposades a poly-IC (250ng, 1000ng), durant 4h i 24h. Barres amb una longitud de 5 $\mu$ M.

La quantificació obtinguda a partir de l'experiment que representen les imatges anteriors mostra una disminució significativa del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de poly-IC utilitzades, 250ng i 1000ng, durant 4h i 24h respecte les control (Figura 134A), en el nucli en canvi no es detecten canvis significatius en cap de les concentracions (Figura 134B). Pel que fa a la intensitat d'aquests agregats tampoc es produeixen canvis ni en el citosol ni en el nucli en cap de les concentracions de poly-IC respecte les control (Figura 134C i 134D).

Pel que fa a TDP-43, es produeix una disminució significativa del nombre d'agregats en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de poly-IC utilitzades durant 4h i 24h respecte les control (Figura 134E). En el nucli no es detecten canvis significatius en cap de les concentracions (Figura 134F). La intensitat d'aquests agregats disminueix en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de poly-IC utilitzades a ambdós temps respecte les control (Figura 134G) i en el nucli no es detecten canvis significatius (Figura 134H).



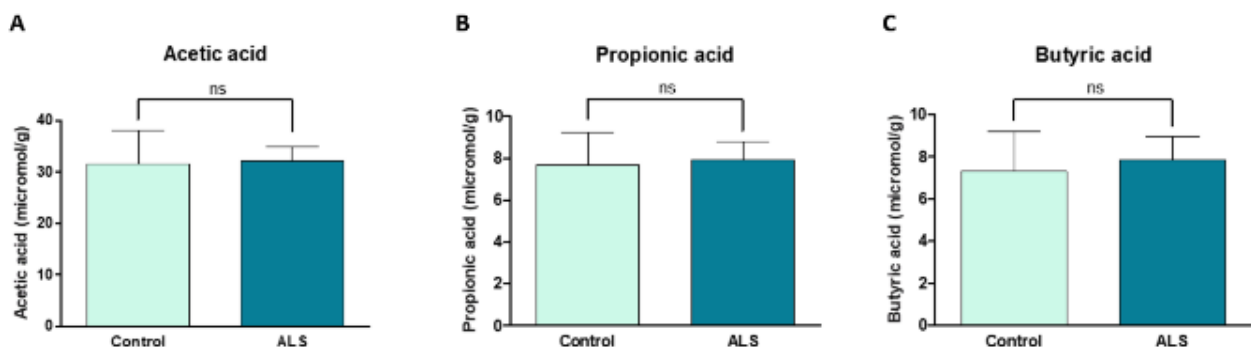
**Figura 134.** Alteració en el nombre d'agregats citosòlics de G3BP1 i TDP-43 sota l'estrès per ARN forà induït amb Poly-IC en les cèl·lules de la línia FUS. Analitzat a partir de la quantificació del nombre d'agregats i de la intensitat de G3BP1 i TDP-43 en el citosol i nucli de les cèl·lules a partir de línies cel·lulars de motoneurons derivades de pacients, per microscopia confocal. **(A)** Disminució significativa del nombre d'agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de poly-IC utilitzades durant 4h i 24h respecte les control. **(B)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades respecte les control. **(C)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de G3BP1 en el citosol de les cèl·lules en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades respecte les control. **(D)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de G3BP1 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades respecte les control. **(E)** Disminució significativa del nombre d'agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de poly-IC utilitzades durant 4h i 24h respecte les control. **(F)** No es detecten canvis significatius en el nombre d'agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules en cap de les concentracions de poly-IC utilitzades respecte les control. **(G)** Disminució significativa de la intensitat dels agregats de TDP-43 en el citosol de les cèl·lules sota totes les concentracions de poly-IC utilitzades durant 4h i 24h respecte

les control. **(H)** No es detecten canvis significatius en la intensitat dels agregats de TDP-43 en el nucli de les cèl·lules en cap dels tractaments utilitzats respecte les control. ns Indica  $p > 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  per one-way ANOVA.

## 5.6. Anàlisi d'àcids grassos de cadena curta

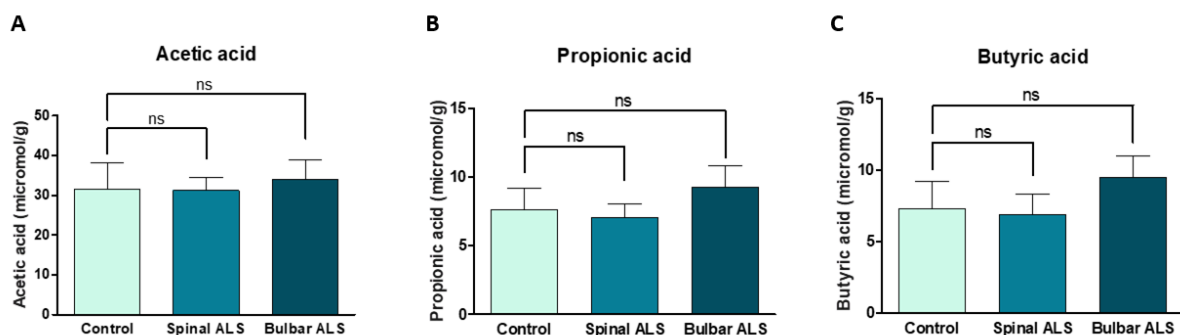
Totes les dades anteriors suggereixen que poden existir canvis individuals que afectin la patogènesi de la malaltia, ja que segons la mutació (FUS o C9orf72), o segons els estímuls d'estrès poden haver-hi respostes diferencials en termes d'agregació proteica. Atesa la importància de la neuroinflamació en la patogènesi de la malaltia (Hooten et al., 2015; Philips & Robberecht, 2011; Weydt & Möller, 2005) i tenint en compte que els AGCC poden ésser moduladors de la neuroinflamació (C. H. Kim et al., 2014; J.-M. Li et al., 2019; Vinolo et al., 2011), s'ha analitzat els nivells dels tres AGCC més predominants, àcid acètic, propiònic i butíric, a partir de les mostres de femta de pacients d'ELA i controls. Anàlisi realitzat a partir de 12 mostres control: 6 dones, 4 homes i 2 sense determinar. 11 mostres d'ELA espinal de les quals 5 són dones amb una edat promig de  $68.8 \pm 8.25$ , un pes promig de  $62.32\text{kg} \pm 11.05$ , una altura promig de  $1.54\text{m} \pm 0.06$ , un IMC promig de  $26.51 \pm 6.22$  i una durada de la malaltia en mesos de  $47.2 \pm 39.88$ . 6 homes d'ELA espinal amb una edat promig de  $63.16 \pm 12.25$ , un pes promig de  $82.43 \pm 8.67$ , una altura promig de  $1.7 \pm 0.1$ , un IMC promig de  $28.47 \pm 3.16$  i una durada de la malaltia de  $68.4 \pm 38.55$ . 6 mostres d'ELA bulbar de les quals 5 són dones amb una edat promig de  $64.8 \pm 10.75$ , un pes promig de  $65.12 \pm 11.11$ , una altura promig de  $1.61 \pm 0.09$ , un IMC promig de  $24.94 \pm 2.48$  i una durada de la malaltia de  $41.4 \pm 23.8$  i 1 home de 66 anys, amb pes de 71kg, altura de 1.64m, IMC de 23.6 i durada de 30 mesos.

Els resultats obtinguts en la quantificació dels nivells d'àcid acètic, propiònic i butíric no mostren diferències significatives en els pacients d'ELA analitzats respecte els controls emprant les anàlisis estadístiques habituals (Figura 135A, 135B i 135C).



**Figura 135.** Els nivells d'àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric no es troben alterats en l'ELA. Analitzat a partir de les mostres de femta per cromatografia líquida. **(A)** No es detecten canvis significatius en els nivells d'àcid acètic en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** No es detecten canvis significatius en els nivells d'àcid propiònic en els pacients d'ELA respecte els controls. **(C)** No es detecten canvis significatius en els nivells d'àcid butíric en els pacients d'ELA respecte els controls. (n=12 pacients control, n=17 pacients d'ELA). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test.

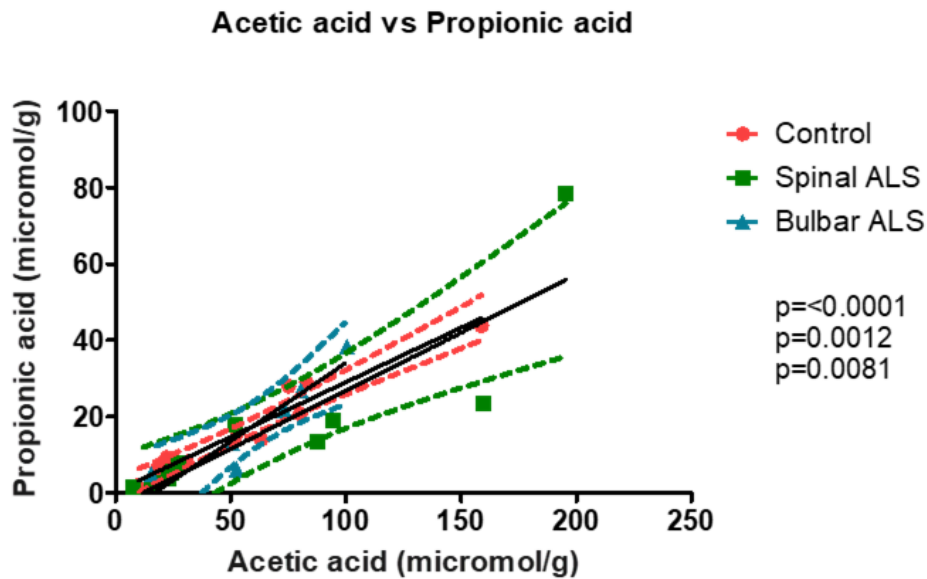
A més a més, s'ha procedit a fer un anàlisi estadístic per estudiar les diferències d'aquests tres àcids grassos entre els dos fenotips de l'ELA, l'espinal i el bulbar. Els resultats obtinguts no mostren diferències significatives ni en els nivells d'àcid acètic, ni en l'àcid propiònic ni en l'àcid butíric en els pacients d'ELA respecte els controls. Tot i així, es pot observar una certa tendència a augmentar en el fenotip bulbar de la malaltia en els tres AGCC, a diferència del fenotip espinal on no es detecten canvis respecte els controls (Figura 136A, 136B i 136C).



**Figura 136.** Els nivells d'àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric no es troben alterats en cap dels fenotips de l'ELA. Analitzat a partir de les mostres de femta per cromatografia líquida. **(A)** No es detecten canvis significatius en els nivells d'àcid acètic ni en els pacients d'ELA espinal ni en l'ELA bulbar respecte els controls. **(B)** No es detecten canvis significatius en els nivells d'àcid propiònic ni en els pacients d'ELA espinal ni en l'ELA bulbar respecte els controls. **(C)** No es detecten canvis significatius en els nivells d'àcid butíric ni en els pacients d'ELA espinal ni en l'ELA bulbar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p > 0.05$  per one-way ANOVA.

S'ha realitzat també un anàlisi de regressió lineal per tal de determinar si hi ha una correlació entre l'àcid acètic i l'àcid propiònic en els controls, l'ELA espinal i l'ELA bulbar. Els resultats obtinguts mostren una correlació significativa entre els dos àcids grassos en els tres grups analitzats amb unes  $r^2$  properes a 1 (Figura 137).





**Figura 137. Correlació entre els nivells d'àcid acètic i àcid propiònic en els controls, pacients d'ELA espinal i ELA bulbar.** Els nivells d'àcid acètic i àcid propiònic són analitzats per cromatografia líquida. L'anàlisi de regressió lineal mostra una bona correlació entre els nivells d'àcid acètic i àcid propiònic en el grup control, ELA espinal i ELA bulbar. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar).  $r^2 = 0.9365$  i  $p < 0.0001$  per control,  $r^2 = 0.7519$  i  $p = 0.0012$  per ELA espinal,  $r^2 = 0.8567$  i  $p = 0.0081$  per ELA bulbar per regressió lineal.

## 5.7. Anàlisi de la microbiota intestinal

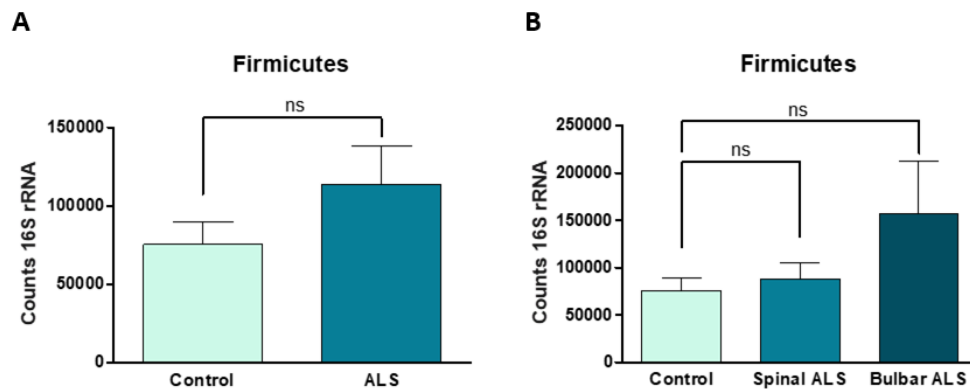
S'ha analitzat la microbiota intestinal a partir de mostres de femta de pacients d'ELA i controls sans. Per determinar l'abundància dels bacteris presents en les mostres es realitza a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr, per fílum, classe, família, gènere i espècie. Els resultats en aquest treball es centren en el taxó fílum, família, gènere i espècie ja que són els més analitzats en els treballs bibliogràfics. Els resultats obtinguts per tots els bacteris no van arribar al nivell de significança, tot i així, en tots ells es mostra una tendència a presentar alteracions en la seva abundància en els pacients d'ELA respecte els controls.

### 5.7.1. Abundància de bacteris a nivell de fílum

Els resultats obtinguts, tot i no ser significatius, presenten una certa tendència a mostrar alteracions en l'abundància de bacteris del fílum *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* i *Fusobacteria*.

### 5.7.1.1. Firmicutes

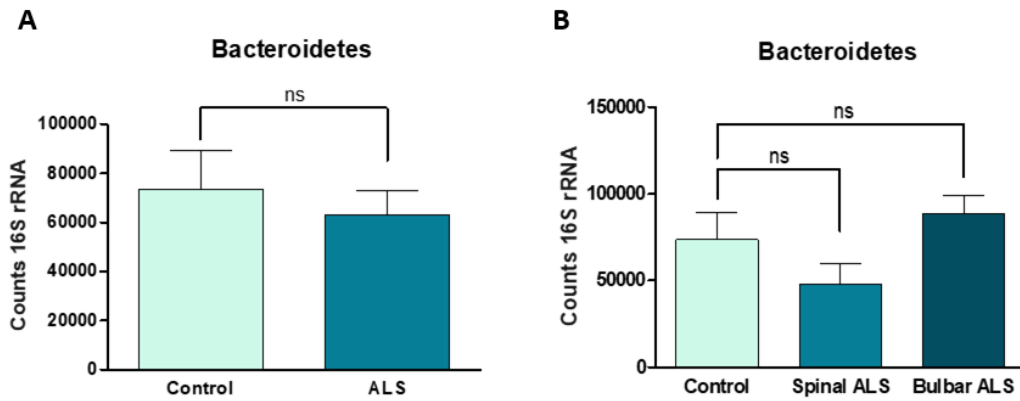
Pel que fa a l'abundància de bacteris del fílum *Firmicutes*, els resultats obtinguts mostren una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 138A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a augmentar es produeix tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls (Figura 138B).



**Figura 138. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum Firmicutes en l'ELA.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris del fílum Firmicutes presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris del fílum Firmicutes presenta una tendència a augmentar tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

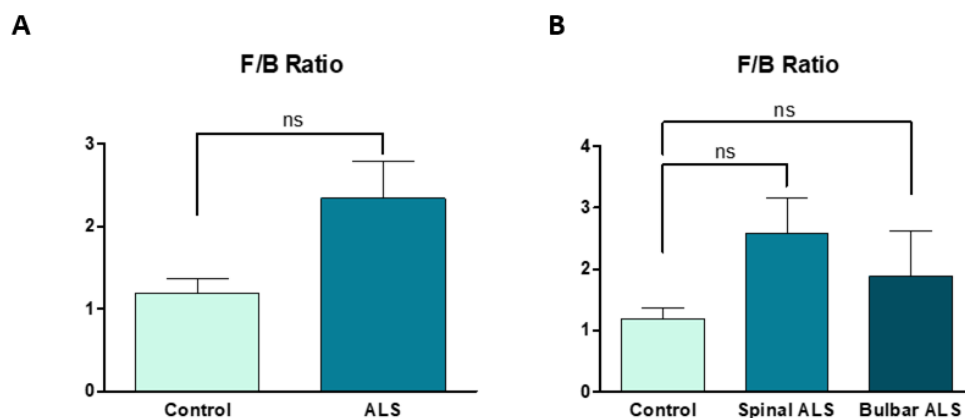
### 5.7.1.2. Bacteroidetes

Pel que fa a l'abundància de bacteris del fílum *Bacteroidetes*, els resultats obtinguts mostren una tendència a disminuir en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 139A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a disminuir es produeix en els pacients d'ELA espinal respecte els controls i en canvi en l'ELA bulbar es produeix un augment (Figura 139B).



**Figura 139. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum Bacteroidetes en l'ELA.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris del fílum Bacteroidetes presenta una tendència a disminuir en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris del fílum Bacteroidetes presenta una tendència a disminuir en els pacients d'ELA espinal respecte els controls. En els pacients d'ELA bulbar s'observa una tendència a augmentar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

Un cop analitzada l'abundància de *Firmicutes* i *Bacteroidetes* s'ha analitzat el rati *Firmicutes/Bacteroidetes*. Els resultats obtinguts, tot i no ser significatius, mostren una tendència en augment del rati en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 140A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a augmentar es produeix tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls (Figura 140B).

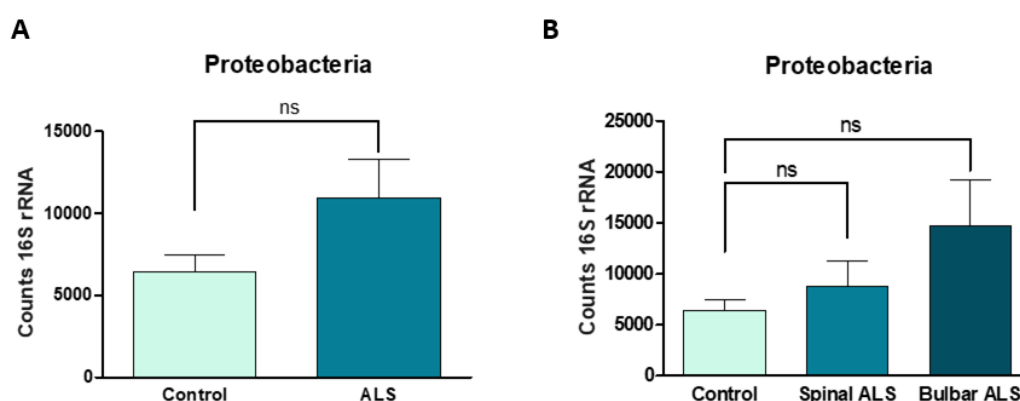


**Figura 140. No es detecten canvis en el rati Firmicutes/Bacteroidetes en l'ELA.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** El rati Firmicutes/Bacteroidetes presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** El rati Firmicutes/Bacteroidetes presenta una tendència a augmentar tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els

controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p>0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

### 5.7.1.3. Proteobacteria

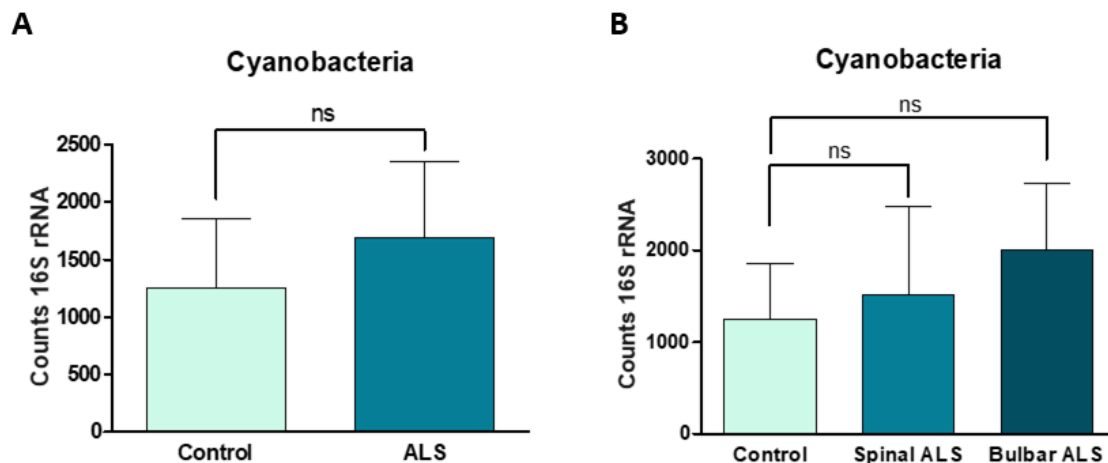
Pel que fa a l'abundància de bacteris del fílum *Proteobacteria*, els resultats obtinguts mostren una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 141A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a augmentar es produeix tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls (Figura 141B).



**Figura 141. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum Proteobacteria en l'ELA.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris del fílum Proteobacteria presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris del fílum Proteobacteria presenta una tendència a augmentar tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p>0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

### 5.7.1.4. Cyanobacteria

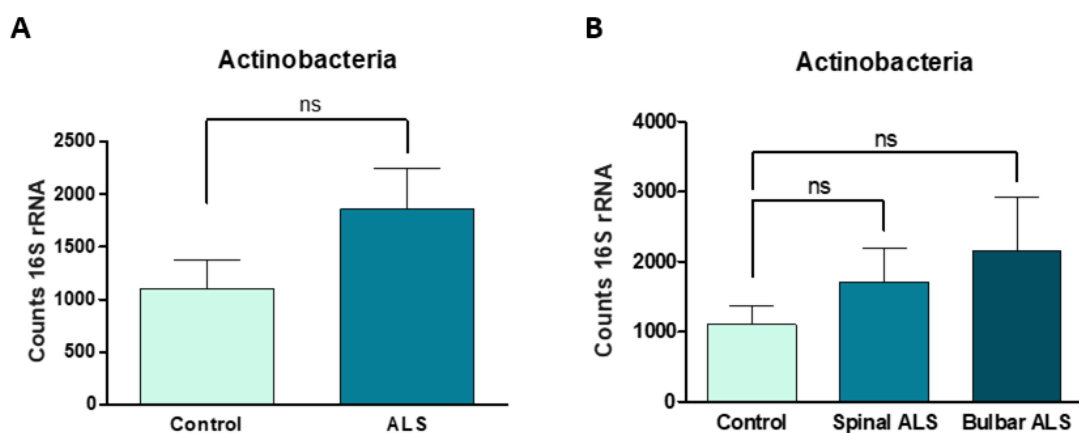
Pel que fa a l'abundància de bacteris del fílum *Cyanobacteria*, els resultats obtinguts mostren una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 142A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a augmentar es produeix tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls (Figura 142B).



**Figura 142.** No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum *Cyanobacteria* en l'ELA. Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris del fílum *Cyanobacteria* presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris del fílum *Cyanobacteria* presenta una tendència a augmentar tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p>0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

### 5.7.1.5. Actinobacteria

Pel que fa a l'abundància de bacteris del fílum *Actinobacteria*, els resultats obtinguts mostren una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 143A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a augmentar es produeix tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls (Figura 143B).

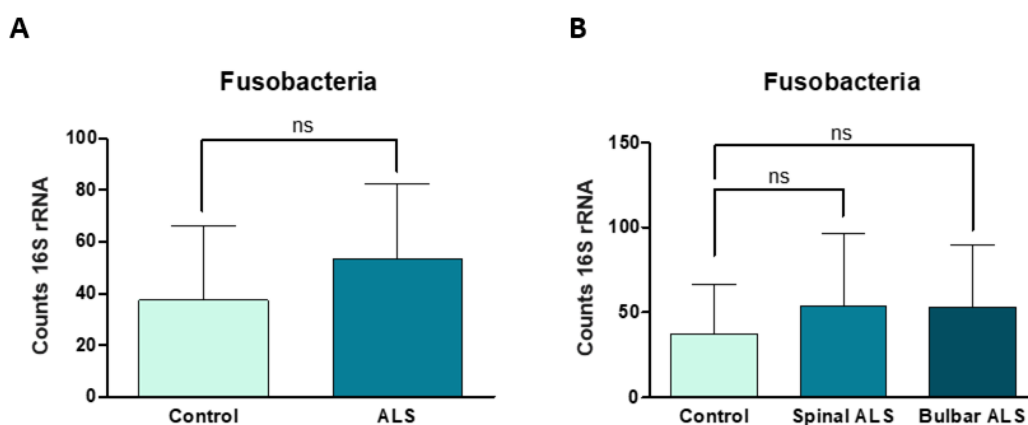


**Figura 143.** No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum *Actinobacteria* en l'ELA. Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris del fílum

Actinobacteria presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris del fílum Actinobacteria presenta una tendència a augmentar tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p>0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

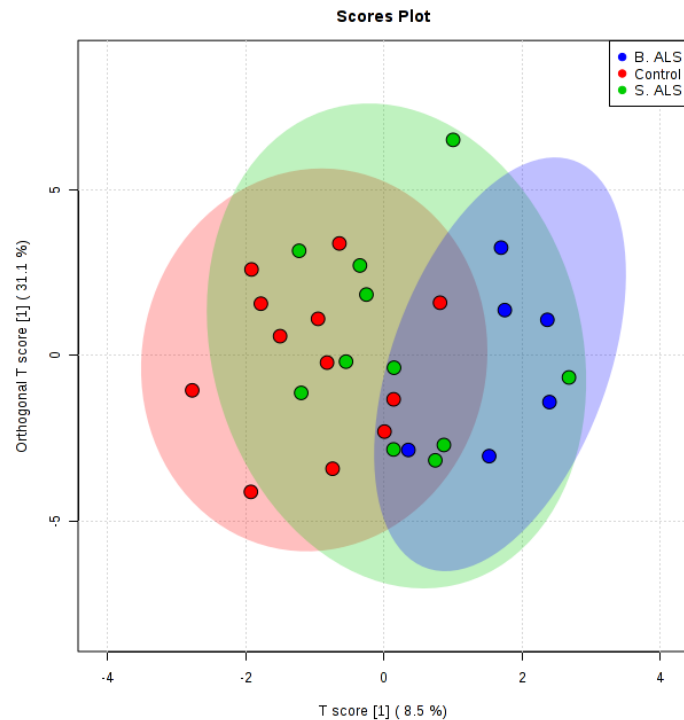
### 5.7.1.6. Fusobacteria

Pel que fa a l'abundància de bacteris del fílum *Fusobacteria*, els resultats obtinguts mostren una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 144A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a augmentar es produeix tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls (Figura 144B).



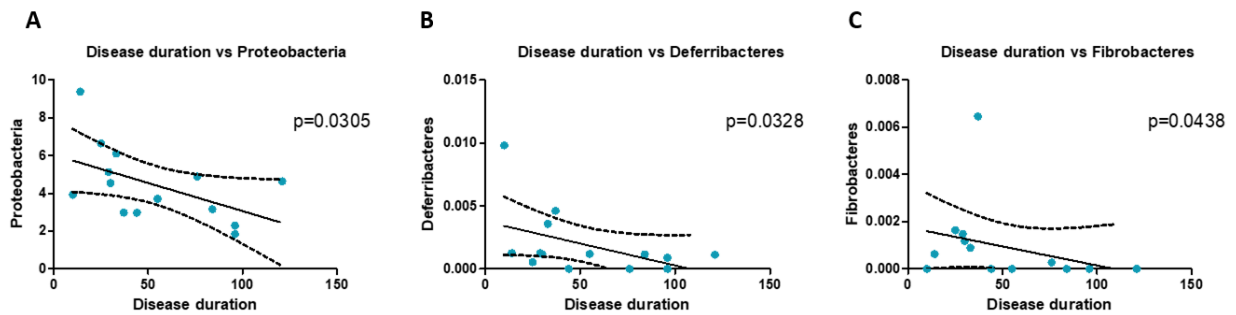
**Figura 144.** No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del fílum *Fusobacteria* en l'ELA. Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris del fílum *Fusobacteria* presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris del fílum *Fusobacteria* presenta una tendència a augmentar tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p>0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

El gràfic ortho-PLSDA obtingut, on s'analitza tots els bacteris trobats en les mostres de femta dels pacients i controls, tot i no ser estadísticament significatiu, mostra una bona separació dels fílums de bacteris entre els pacients d'ELA espinal (punts verds), ELA bulbar (punts blaus) i controls (punts vermells) (Figura 145).



**Figura 145. Separació per fílum dels bacteris presents en la microbiota dels pacients d'ELA espinal i ELA bulbar.** Analitzat a partir de l'algoritme ortho-PLSDA que utilitza tots els bacteris trobats en les mostres de femta dels pacients i controls sans. Tot i no ser estadísticament significatiu, s'observa una bona separació per fílum dels bacteris entre els pacients d'ELA espinal (punts verds), ELA bulbar (punts blaus) i controls (punts vermells).

A més a més, s'han realitzat anàlisis de regressió lineal per tal d'analitzar si existeix una correlació entre la durada de la malaltia (espinal i bulbar) i l'abundància d'alguns dels bacteris a nivell de fílum presents en la microbiota. Els resultats obtinguts mostren una relació inversa entre la duració de la malaltia i l'abundància de *Proteobacteria* (Figura 146A), *Deferribacteres* (Figura 146B) i *Fibrobacteres* (Figura 146C). A major abundància d'aquests fílums de bacteris, la duració de la malaltia, és a dir, la supervivència, és menor.



**Figura 146. Correlació entre la durada de la malaltia i l'abundància de bacteris del fílum Proteobacteria, Deferribacteres i Fibrobacteres.** La durada de la malaltia és calculada en mesos des de la data d'inici fins la data d'èxitus. L'abundància dels bacteris és analitzada a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** A major abundància de bacteris del fílum Proteobacteria es redueixen els mesos de la malaltia. **(B)** A major abundància de bacteris del fílum Deferribacteres es redueixen els mesos de la malaltia. **(C)** A major abundància de bacteris del fílum Fibrobacteres es redueixen els mesos de la malaltia. (n=11 pacients ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar).  $p=0.0305$ ,  $p=0.0328$  i  $p=0.0438$  respectivament per regressió lineal.

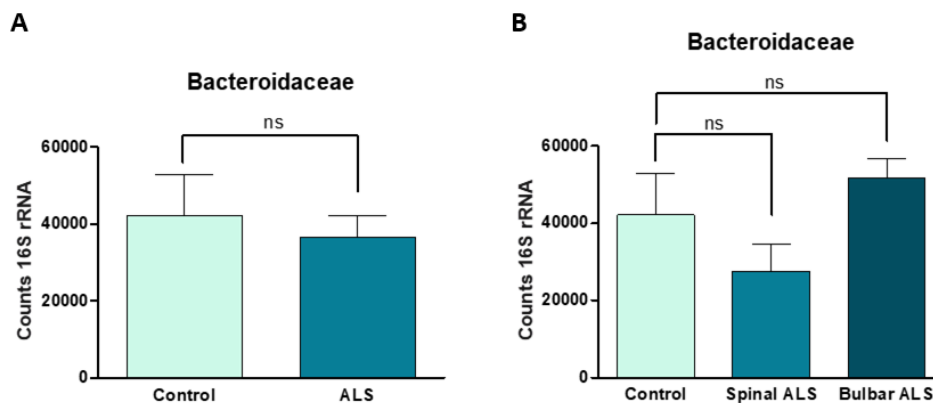
### 5.7.2. Abundància de bacteris a nivell de família

Els resultats obtinguts, tot i no ser significatius, presenten una certa tendència a mostrar alteracions en l'abundància de bacteris de la família *Bacteroidaceae* i *Ruminococcaceae*.

#### 5.7.2.1. Bacteroidaceae

Pel que fa a l'abundància de bacteris de la família *Bacteroidaceae*, els resultats obtinguts mostren una tendència a disminuir en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 147A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a disminuir es produeix en els pacients amb ELA espinal respecte els controls i en canvi en l'ELA bulbar es produeix un augment (Figura 147B).

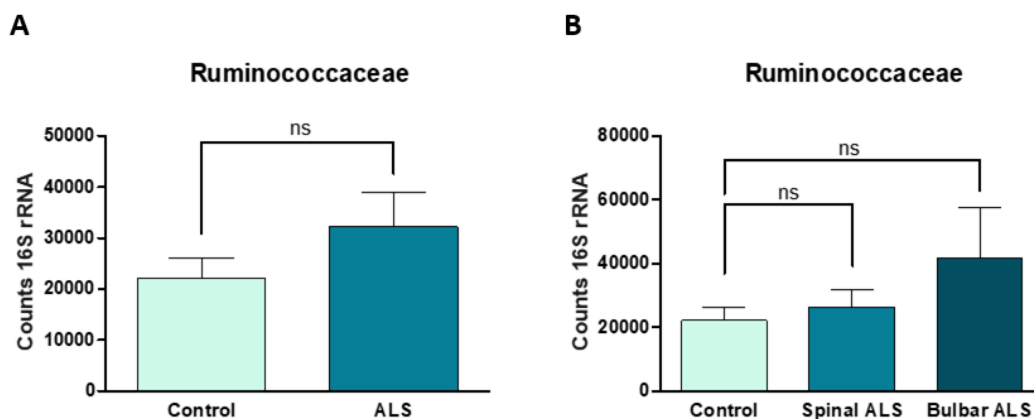




**Figura 147. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris de la família Bacteroidaceae en l'ELA.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris de la família Bacteroidaceae presenta una tendència a disminuir en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris de la família Bacteroidaceae presenta una tendència a disminuir en els pacients d'ELA espinal respecte els controls. En els pacients d'ELA bulbar s'observa una tendència a augmentar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p>0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

### 5.7.2.2. Ruminococcaceae

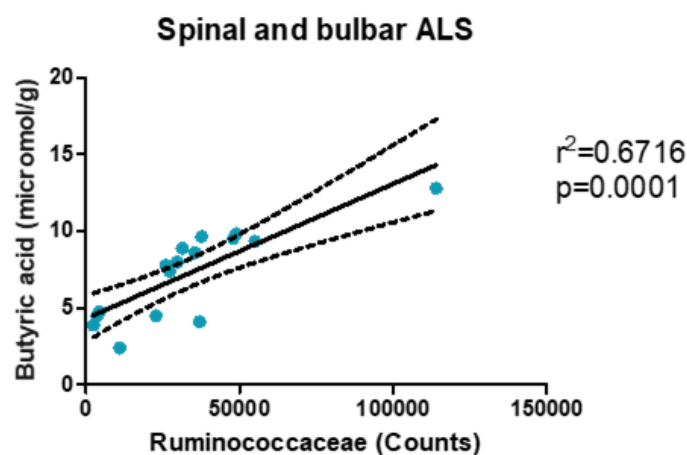
Pel que fa a l'abundància de bacteris de la família *Ruminococcaceae*, els resultats obtinguts mostren una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 148A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a augmentar es produeix tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls (Figura 148B).



**Figura 148. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris de la família Ruminococcaceae en l'ELA.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris de la família Ruminococcaceae presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)**

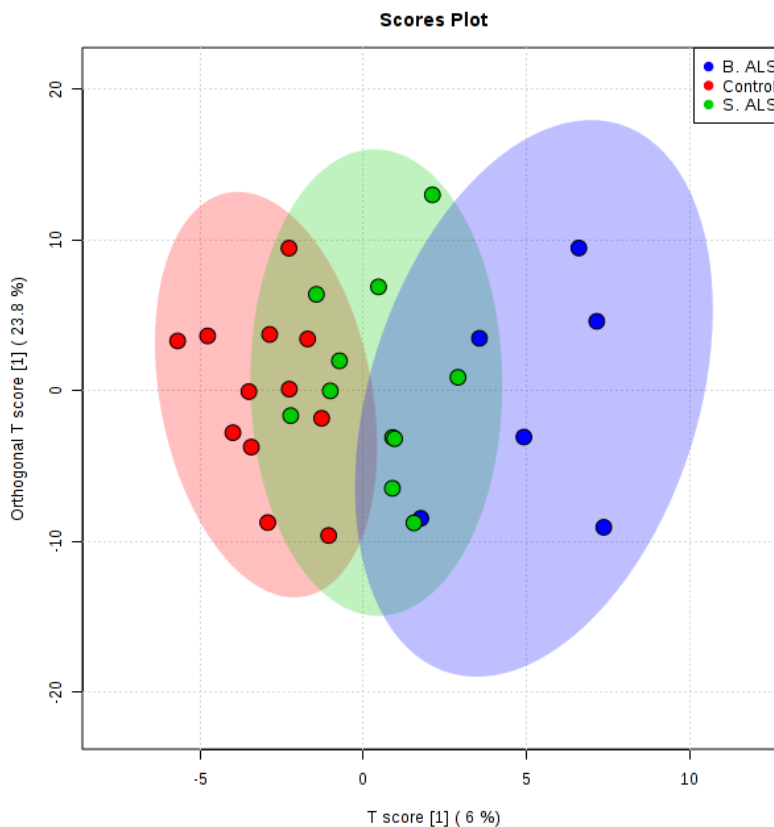
L'abundància de bacteris de la família Ruminococcaceae presenta una tendència a augmentar tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

S'ha realitzat un anàlisi de regressió lineal per tal de determinar si hi ha una correlació entre l'abundància d'aquests bacteris i els nivells d'àcid butíric en ambdós fenotips. Els resultats obtinguts mostren una correlació directa entre l'abundància de *Ruminococcaceae* i els nivells d'àcid butíric. Tot i que la  $r^2$  no s'aproxima a 1 si que és estadísticament significatiu. Es pot observar com a major abundància d'aquest bacteri els nivells d'àcid butíric són majors (Figura 149).



**Figura 149.** Correlació entre l'abundància de Ruminococcaceae i els nivells d'àcid butíric en els pacients d'ELA espinal i ELA bulbar. L'abundància dels bacteris és analitzada a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr i l'àcid butíric per cromatografia líquida. L'anàlisi de regressió lineal mostra com l'abundància de Ruminococcaceae està relacionada directament amb una major producció d'àcid butíric en els pacients d'ELA espinal i ELA bulbar. (n=11 pacients ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar).  $r^2=0.6716$  i  $p=0.0001$  per regressió lineal.

El gràfic ortho-PLSDA obtingut, on s'analitza tots els bacteris trobats en les mostres de femta dels pacients i controls, tot i no ser estadísticament significatiu, mostra una bona separació de les famílies de bacteris entre els pacients d'ELA espinal (punts verds), ELA bulbar (punts blaus) i controls (punts vermells) (Figura 150).



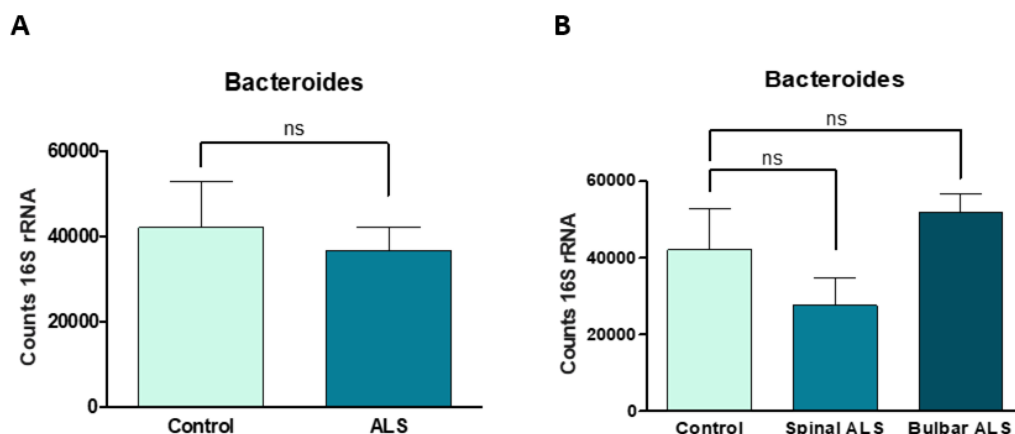
**Figura 150. Separació per família dels bacteris presents en la microbiota dels pacients d'ELA espinal i ELA bulbar.** Analitzat a partir de l'algoritme ortho-PLSDA que utilitza tots els bacteris trobats en les mostres de femta dels pacients i controls sans. Tot i no ser estadísticament significatiu, s'observa una bona separació dels bacteris per família entre els pacients d'ELA espinal (punts verds), ELA bulbar (punts blaus) i controls (punts vermells).

### 5.7.3. Abundància de bacteris a nivell de gènere

Els resultats obtinguts, tot i no ser significatius, presenten una certa tendència a mostrar alteracions en l'abundància de bacteris del gènere *Bacteroides*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Veillonella* i *Butyrivibrio*.

#### 5.7.3.1. Bacteroides

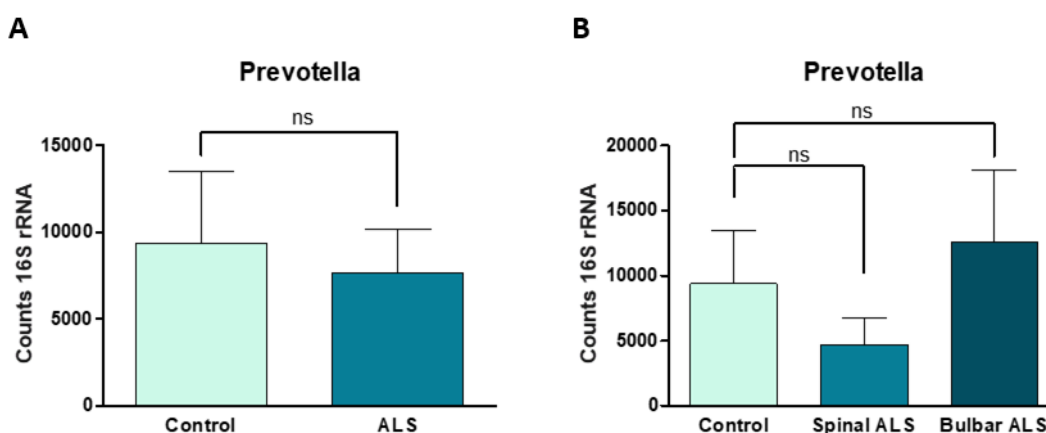
Pel que fa a l'abundància de bacteris del gènere *Bacteroides*, els resultats obtinguts mostren una tendència a disminuir en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 151A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a disminuir es produeix en els pacients d'ELA espinal respecte els controls i en canvi en l'ELA bulbar es produeix un augment (Figura 151B).



**Figura 151. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del gènere Bacteroides en l'ELA.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris del gènere Bacteroides presenta una tendència a disminuir en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris del gènere Bacteroides presenta una tendència a disminuir en els pacients d'ELA espinal respecte els controls. En els pacients d'ELA bulbar s'observa una tendència a augmentar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

### 5.7.3.2. Prevotella

Pel que fa a l'abundància de bacteris del gènere *Prevotella*, els resultats obtinguts mostren una tendència a disminuir en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 152A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a disminuir es produeix en els pacients d'ELA espinal respecte els controls i en canvi en l'ELA bulbar es produeix un augment (Figura 152B).

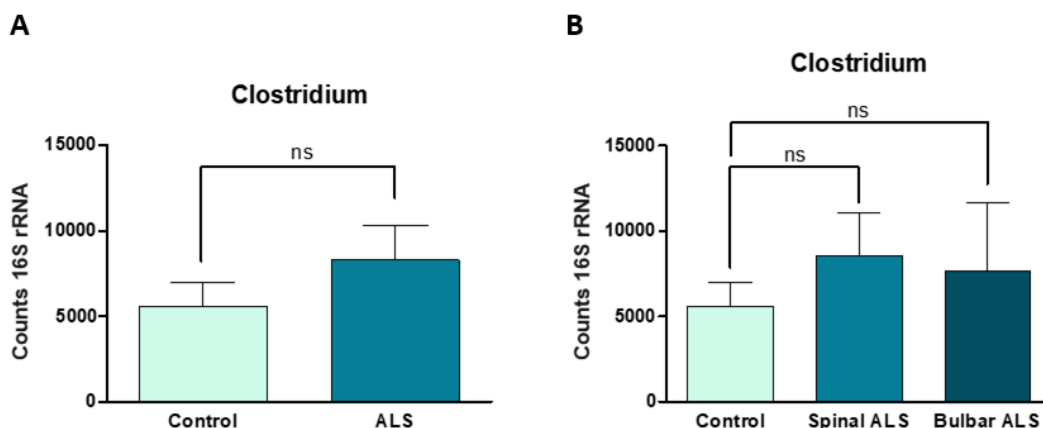


**Figura 152. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del gènere Prevotella en l'ELA.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris del gènere

Prevotella presenta una tendència a disminuir en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris del gènere Prevotella presenta una tendència a disminuir en els pacients d'ELA espinal respecte els controls. En els pacients d'ELA bulbar s'observa una tendència a augmentar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

### 5.7.3.3. Clostridium

Pel que fa a l'abundància de bacteris del gènere *Clostridium*, els resultats obtinguts mostren una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 153A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a augmentar es produeix tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls (Figura 153B).

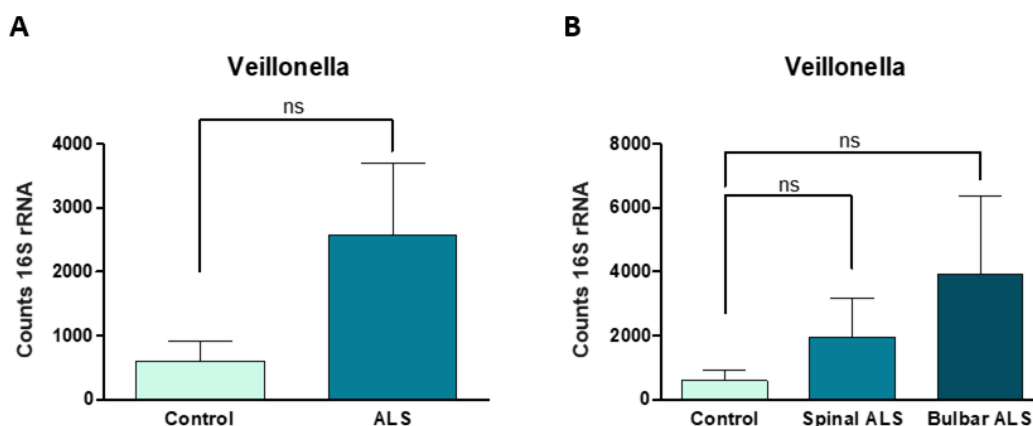


**Figura 153.** No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del gènere *Clostridium* en l'ELA. Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris del gènere *Clostridium* presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris del gènere *Clostridium* presenta una tendència a augmentar tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

### 5.7.3.4. Veillonella

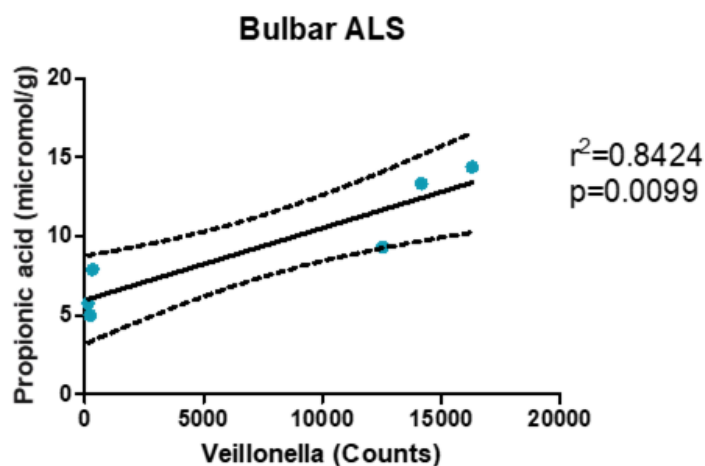
Pel que fa a l'abundància de bacteris del gènere *Veillonella*, els resultats obtinguts mostren una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 154A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència

a augmentar es produeix tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls (Figura 154B).



**Figura 154.** No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del gènere *Veillonella* en l'ELA. Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris del gènere *Veillonella* presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris del gènere *Veillonella* presenta una tendència a augmentar tant en els pacients d'ELA espinal com en l'ELA bulbar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

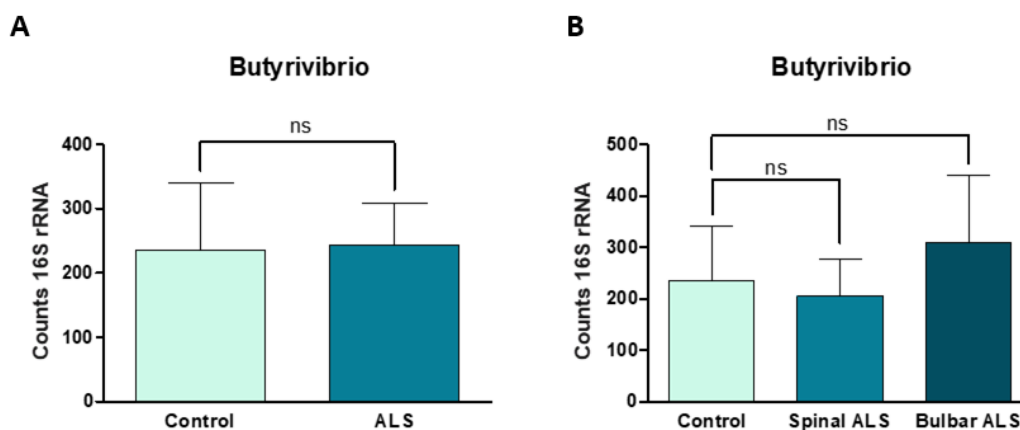
Degut a que el fenotip bulbar és el que presenta un augment en aquest gènere de bacteris s'ha realitzat un anàlisi de regressió lineal per tal de determinar si hi ha una correlació entre l'abundància d'aquests bacteris i els nivells d'àcid propiònic. Els resultats obtinguts mostren una correlació directa entre l'abundància de *Veillonella* i els nivells d'àcid propiònic amb una  $r^2$  propera a 1. Es pot observar com a major abundància d'aquest bacteri els nivells d'àcid propiònic són majors (Figura 155).



**Figura 155. Correlació entre l'abundància de Veillonella i els nivells d'àcid propiònic en els pacients d'ELA bulbar.** L'abundància dels bacteris és analitzada a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr i l'àcid propiònic per cromatografia líquida. L'anàlisi de regressió lineal mostra com l'abundància de Veillonella està directament relacionada amb una major producció d'àcid propiònic en els pacients d'ELA bulbar. (n=6 pacients d'ELA bulbar).  $r^2=0.8424$  i  $p=0.0099$  per regressió lineal.

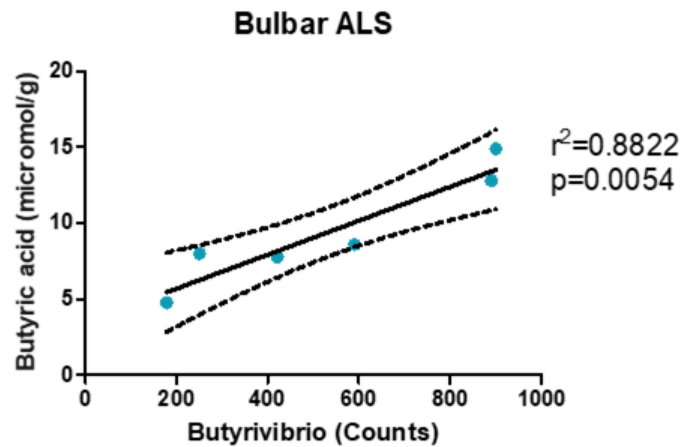
### 5.7.3.5. Butyrivibrio

Pel que fa a l'abundància de bacteris del gènere *Butyrivibrio*, els resultats obtinguts no mostren diferències en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 156A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa una tendència a augmentar en el fenotip bulbar respecte els control (Figura 156B).



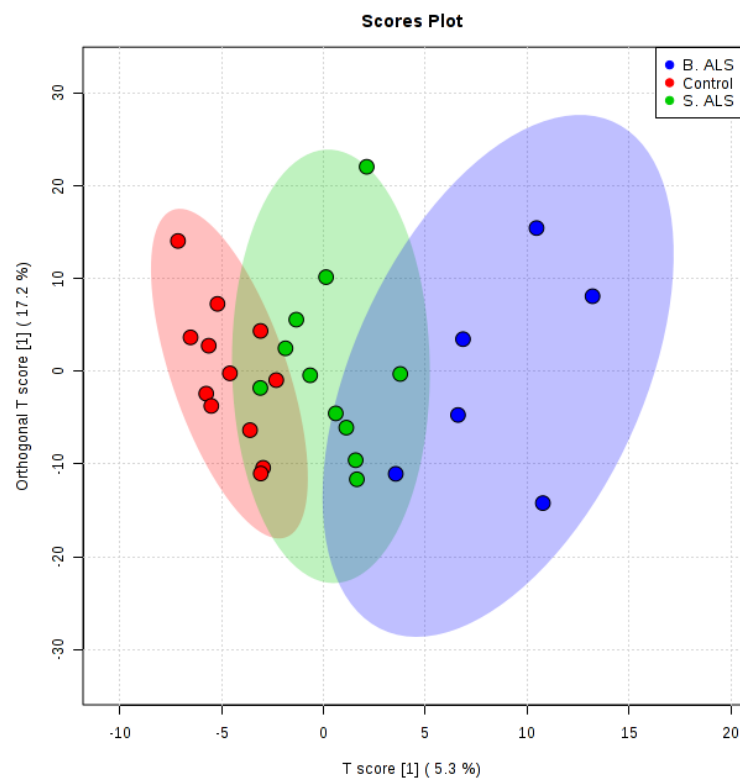
**Figura 156. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris del gènere Butyrivibrio en l'ELA.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris del gènere *Butyrivibrio* no es troba alterada en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris del gènere *Butyrivibrio* presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA bulbar respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p>0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

Degut a que el fenotip bulbar és el que presenta un augment en aquest gènere de bacteris s'ha realitzat un anàlisi de regressió lineal per tal de determinar si hi ha una correlació entre l'abundància d'aquests bacteris i els nivells d'àcid butíric. Els resultats obtinguts mostren una correlació directa entre l'abundància de *Butyrivibrio* i els nivells d'àcid butíric amb una  $r^2$  propera a 1. Es pot observar com a major abundància d'aquest bacteri els nivells d'àcid butíric són majors (Figura 157).



**Figura 157. Correlació entre l'abundància de Butyrvibrio i els nivells d'àcid butíric en els pacients d'ELA bulbar.** L'abundància dels bacteris és analitzada a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr i l'àcid butíric per cromatografia líquida. L'anàlisi de regressió lineal mostra com l'abundància de Butyrvibrio està relacionada directament amb una major producció d'àcid butíric en els pacients d'ELA bulbar. (n=6 pacients d'ELA bulbar).  $r^2=0.8822$  i  $p=0.0054$  per regressió lineal.

El gràfic ortho-PLSDA obtingut, on s'analiza tots els bacteris trobats en les mostres de femta dels pacients i controls, tot i no ser estadísticament significatiu, mostra una bona separació dels gèneres de bacteris entre els pacients d'ELA espinal (punts verds), ELA bulbar (punts blaus) i controls (punts vermells) (Figura 158).





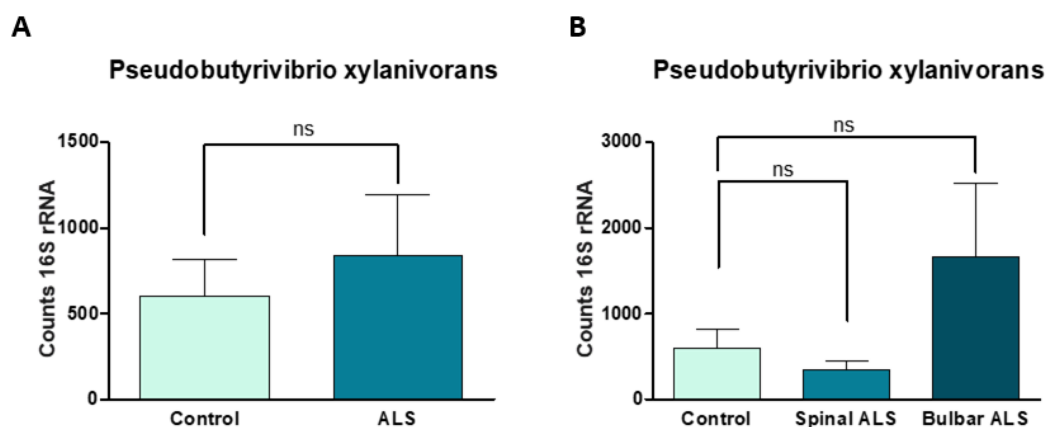
**Figura 158. Separació per gènere dels bacteris presents en la microbiota dels pacients d'ELA espinal i ELA bulbar.** Analitzat a partir de l'algoritme ortho-PLSDA que utilitza tots els bacteris trobats en les mostres de femta dels pacients i controls sans. Tot i no ser estadísticament significatiu, s'observa una bona separació per gènere dels bacteris entre els pacients d'ELA espinal (punts verds), ELA bulbar (punts blaus) i controls (punts vermells).

#### 5.7.4. Abundància de bacteris a nivell d'espècie

Els resultats obtinguts, tot i no ser significatius, presenten una certa tendència a mostrar alteracions en l'abundància de bacteris de l'espècie *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* i *Blautia Wexlerae*.

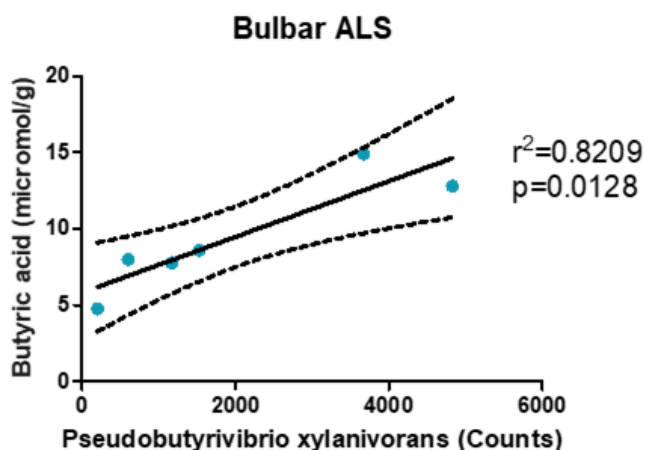
##### 5.7.4.1. *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*

Pel que fa a l'abundància de bacteris de l'espècie *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*, els resultats obtinguts mostren una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 159A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a augmentar es produeix en els pacients d'ELA bulbar respecte els controls i en l'ELA espinal es produeix una disminució (Figura 159B).



**Figura 159. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris de l'espècie *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* en l'ELA.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris de l'espècie *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris de l'espècie *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA bulbar respecte els controls. En els pacients d'ELA espinal s'observa una tendència a disminuir respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

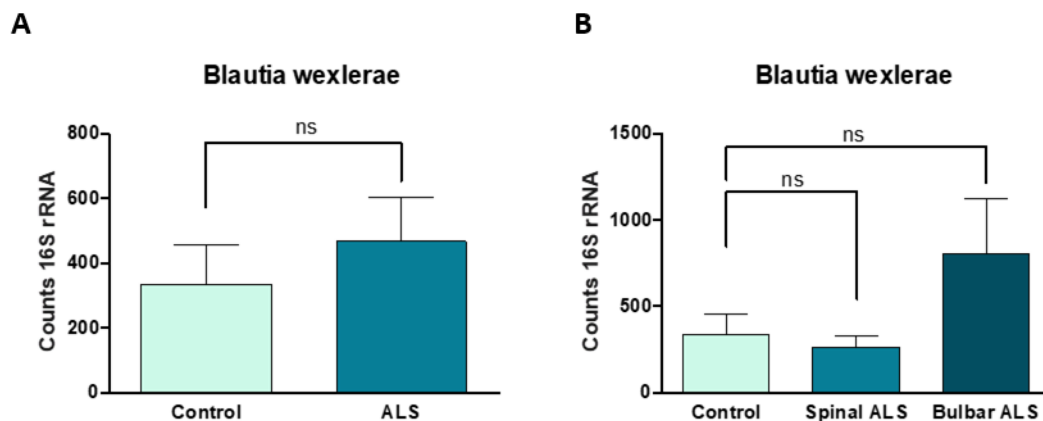
Degut a que el fenotip bulbar és el que presenta un augment en aquesta espècie de bacteris s'ha realitzat un anàlisi de regressió lineal per tal de determinar si hi ha una correlació entre l'abundància d'aquests bacteris i els nivells d'àcid butíric. Els resultats obtinguts mostren una correlació directa entre l'abundància de *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* i els nivells d'àcid butíric amb una  $r^2$  propera a 1. Es pot observar com a major abundància d'aquest bacteri els nivells d'àcid butíric són majors (Figura 160).



**Figura 160.** Correlació entre l'abundància de *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* i els nivells d'àcid butíric en els pacients d'ELA bulbar. L'abundància dels bacteris és analitzada a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr i l'àcid butíric per cromatografia líquida. L'anàlisi de regressió lineal mostra com l'abundància de *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* està relacionada directament amb una major producció d'àcid butíric en els pacients d'ELA bulbar. (n=6 pacients d'ELA bulbar).  $r^2=0.8209$  i  $p=0.0128$  per regressió lineal.

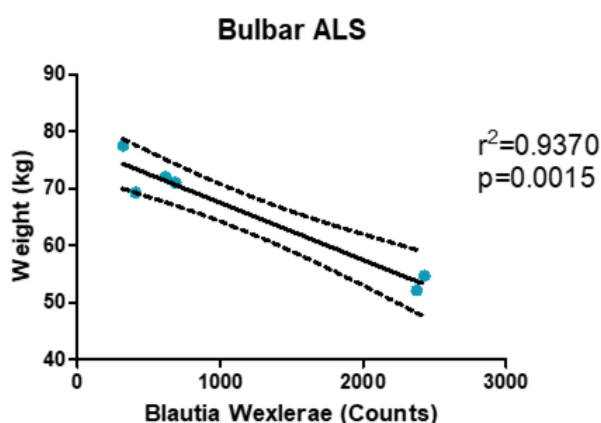
#### 5.7.4.2. *Blautia Wexlerae*

Pel que fa a l'abundància de bacteris de l'espècie *Blautia Wexlerae*, els resultats obtinguts mostren una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 161A). Quan s'analitza segons l'origen de l'ELA, ja sigui espinal o bulbar, s'observa que aquesta tendència a augmentar es produeix en els pacients d'ELA bulbar respecte els controls i en l'ELA espinal es produeix una disminució (Figura 161B).



**Figura 161. No es detecten canvis en l'abundància de bacteris de l'espècie *Blautia Wexlerae* en l'ELA.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr. **(A)** L'abundància de bacteris de l'espècie *Blautia Wexlerae* presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** L'abundància de bacteris de l'espècie *Blautia Wexlerae* presenta una tendència a augmentar en els pacients d'ELA bulbar respecte els controls. En els pacients d'ELA espinal s'observa una tendència a disminuir respecte els controls. (n=12 pacients control, n=11 pacients d'ELA espinal i n=6 pacients d'ELA bulbar). ns Indica  $p > 0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.

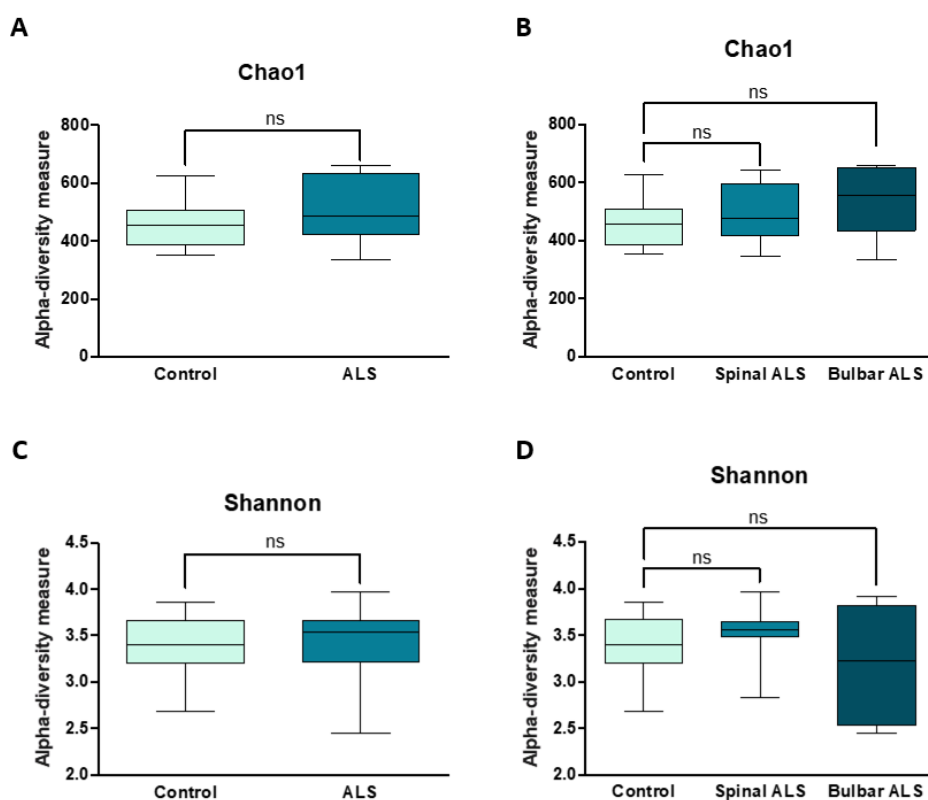
A partir de la informació dels pesos dels pacients d'ELA bulbar s'ha realitzat un anàlisi de correlació del pes amb l'abundància de *Blautia Wexlerae*. Els resultats obtinguts mostren una correlació directa entre l'abundància d'aquest bacteri i el pes dels pacients amb una  $r^2$  propera a 1. Es pot observar com a major abundància d'aquest bacteri el pes dels pacients és menor, per tant, es confirma que és un bon predictor de pèrdua de pes (Figura 162).



**Figura 162. Correlació entre l'abundància de *Blautia Wexlerae* i la pèrdua de pes en els pacients d'ELA bulbar.** Analitzat a partir de la seqüenciació del gen 16S ARNr i el pes dels pacients. L'anàlisi de regressió lineal mostra com l'abundància de *Blautia Wexlerae* està relacionada directament amb la

pèrdua de pes dels pacients d'ELA bulbar. (n=6 pacients d'ELA bulbar).  $r^2=0.9370$  i  $p=0.015$  per regressió lineal.

Per últim s'ha calculat la diversitat alfa (riquesa d'espècies d'una comunitat particular) per l'índex Chao1 i el Shannon. Els resultats obtinguts no mostren diferències significatives en la diversitat d'espècies calculat per l'índex Chao1 en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 163A), ni en cap dels dos fenotips de la malaltia (Figura 163B). Per l'índex Shannon tampoc es produeixen canvis significatius en els pacients d'ELA respecte els controls (Figura 163C) ni tampoc en el fenotip espinal ni en el bulbar (Figura 163D).



**Figura 163. La diversitat d'espècies no es troba alterada en l'ELA.** Analitzat a partir de l'índex Chao1 i Shannon. **(A)** Per l'índex Chao1, no es detecten canvis significatius en la diversitat d'espècies en els pacients d'ELA respecte els controls. **(B)** Per l'índex Chao1, no es detecten canvis significatius en la diversitat d'espècies en els pacients d'ELA espinal ni en l'ELA bulbar respecte els controls. **(C)** Per l'índex Shannon, no es detecten canvis significatius en la diversitat d'espècies en els pacients d'ELA respecte els controls. **(D)** Per l'índex Shannon, no es detecten canvis significatius en la diversitat d'espècies en els pacients d'ELA espinal ni en l'ELA bulbar respecte els controls. ns Indica  $p>0.05$  per Student's t-test i one-way ANOVA.





## DISCUSSION



# 6. DISCUSSIÓ

Es discutiran els diferents resultats considerats separats d'acord a l'organització general de la tesi. D'una banda, es discuteixen els resultats derivats de l'aplicació de biologia cel·lular, fonamentalment centrades a establir les potencials alteracions relacionades amb la formació d'agregats intracel·lulars, en la síntesi de lípids basada en reticle endoplasmàtic, el peroxisoma i en els llocs de contacte entre membranes, i com aquesta podria repercutir en el tràfic endosomal, dependent de la composició membranar (Bissig & Gruenberg, 2013).

## 6.1. Determinants moleculars en la fisiopatologia de la malaltia

Els grànuls d'estrès són compartiments cel·lulars sense membrana que es formen al citosol en resposta a una situació d'estrès (Ivanov et al., 2019). S'encarreguen de la regulació de la traducció, emmagatzematge i estabilització d'ARNm i en la senyalització cel·lular durant l'estrès (Marcelo et al., 2021). Diferents estudis impliquen a centenars de proteïnes com part d'aquests grànuls però encara se'n desconeix el mecanisme d'assemblatge (Jain et al., 2016; Khong et al., 2017).

G3BP1 és una de les proteïnes fonamentals en la formació d'aquests GS en regular la separació de fases líquid-líquid necessària per la seva formació (Taylor & Cleveland, 2017). En els resultats obtinguts d'aquesta tesi, s'objectiva un augment citosòlic de G3BP1 en les cèl·lules de la línia cel·lular C9orf72 i FUS respecte la control. Ambdues línies, cadascuna amb les seves mutacions pertinents, es troben sota una situació d'estrès, C9orf72 per acumulació tòxica de DPR i FUS per la neurotoxicitat. Així doncs, les cèl·lules d'aquestes línies, de forma adaptativa, estarien intentant respondre augmentant els nivells de G3BP1 per poder formar més grànuls d'estrès necessaris per fer front a l'estrès i per la supervivència cel·lular. Malgrat això, aquest augment d'expressió de G3BP1 podria estar jugant un paper dual, ja que una situació d'estrès crònic podria induir a la formació citotòxica de GS patològics. Per tant, en primera instància l'augment de G3BP1 podria estar ajudant a la cèl·lula a l'adaptació enfront l'estrès cel·lular però l'acumulació perllongada de



la proteïna estaria contribuint en agreujar la situació d'estrès degut a l'acumulació tòxica d'aquets agregats.

En canvi, els resultats obtinguts sota situacions d'estrès induïdes per peròxid d'hidrogen i poly-IC varien segons la línia cel·lular en qüestió. Poly-IC, tal i com s'ha explicat anteriorment, és un anàleg sintètic d'ARN de doble cadena i agonista del receptor TLR-3. Aquest compost activa el sistema immunitari innat amb la conseqüent regulació de la immunitat adaptativa (Chin et al., 2010; M. Matsumoto & Seya, 2008). A més, diferents estudis han demostrat que podria activar l'apoptosi en algunes cèl·lules (Cheng & Xu, 2010).

En la línia control i en la C9orf72, els nivells de G3BP1 augmenten encara més en el citosol en la majoria de concentracions i temps d'ambdós estressos, reforçant el possible paper patogènic de l'acumulació dels GS. En canvi, a la línia FUS, el nombre d'agregats de G3BP1 disminueixen tant sota el tractament amb peròxid d'hidrogen com amb poly-IC. Aquesta línia, per motius desconeguts, podria haver perdut la capacitat de sintetitzar G3BP1 i per tant aquesta haploinsuficiència estaria generant una disminució de la formació de GS amb la conseqüent falta de resposta davant de l'estrès induït, agreujant la neurodegeneració. Fus és un component rellevant en la resposta a diversos estímuls implicats en la generació de GS, com l'estrès osmòtic. Reforçant la complexitat de la resposta a l'estrès, la redistribució de Fus al citosol en condicions normals només es dona en resposta a estrès osmòtic (i no a l'estrès oxidatiu per arsenit, peròxid d'hidrogen, taspigargina o estrès tèrmic, estímuls que generen GS en altres contextos (Sama et al., 2013). Altres troballes reforcen la independència de les respostes a l'estrès cel·lular en termes de deslocalització de Fus (Krokowski et al., 2022).

Com s'ha introduït, TDP-43 és fonamental en múltiples funcions cel·lulars, com en la regulació del metabolisme i transport de l'ARN. A més a més, també és molt important en la formació dels GS (Prasad et al., 2019). En les cèl·lules sanes, TDP-43 es troba principalment al nucli, mentre que en els pacients amb ELA, quasi totes les neurones presenten inclusions en el citoplasma disminuint doncs el TDP-43 nuclear (Davidson et al., 2016; MacKenzie et al., 2013). En aquesta tesi s'ha observat un augment del nombre d'agregats citosòlics de TDP-43 en les cèl·lules tant de la línia C9orf72 com de la línia FUS respecte la control demostrant doncs que les inclusions citoplasmàtiques de TDP-43 representen una de les característiques

patològiques de l'ELA més importants, i reforçant la validesa del model motoneuronal exposat. Aquests agregats estarien contribuint a la neurodegeneració de les cèl·lules d'aquestes línies. No solament la presència citosòlica d'aquests agregats agreugen la situació sinó que a més, degut a la translocació de TDP-43 del nucli cap al citosol, es podrien perdre les seves funcions nuclears, entre elles el metabolisme i transport d'ARN i la formació de GS.

Després d'induir estrès a aquestes cèl·lules, tant amb peròxid d'hidrogen com amb poly-IC, el nombre d'agregats citosòlics de TDP-43 augmenten encara més, i conseqüentment, van disminuint els nuclears, en la majoria de casos, tant en la línia control com en la C9orf72. Un cop més, degut a la pèrdua nuclear de TDP-43 aquest no podria dur a terme les seves funcions i en aquest escenari, una correcta formació de GS es pot interpretar com una resposta fisiològica per fer front i eliminar les alteracions derivades del peròxid d'hidrogen i poly-IC. Per tant, en absència de formació dels grànuls, aquests compostos podrien contribuir a la neurodegeneració. A més, l'agregació de TDP-43 en inclusions citoplasmàtiques també estarien agreujant la situació d'estrès en la que es troba la cèl·lula, creant un cercle de retroalimentació positiva.

En canvi, per la línia FUS d'aquest treball el nombre d'agregats citosòlics de TDP-43 es troben disminuïts i en el nucli no es detecten canvis, tant sota l'estrès oxidatiu induït amb peròxid d'hidrogen com sota l'estrès per ARN forà induït amb poly-IC. De nou es manifesta el comportament diferencial de la línia FUS respecte les altres. En aquest cas, les cèl·lules estarien responnent intentant mantenir els nivells nuclears de TDP-43, per tant, aquest es trobaria en la seva correcta localització cel·lular i podria dur a terme les seves funcions, entre elles la formació de GS. Així doncs, gràcies a la presència d'aquests es podria fer front a l'estrès eliminant el peròxid d'hidrogen i poly-IC exogen administrat i a més a més, s'estaria evitant l'acumulació citotòxica dels agregats de TDP-43. Es pot hipotetitzar que la mutació FUS, mantinguda de forma continuada en tota la gènesi de les motoneurons, hauria induït una pressió selectiva per a estímuls de resposta a estrès cel·lular: és a dir, només les cèl·lules que expressin un nivell adequat de proteïnes de mecanismes de rescat de la viabilitat (autofàgia, xaperonització, bioenergètica favorable, transport nucleocitosòlic apropiat) podrien sobreviure, i per tant, estem veient en part un fenotip de rescat enfront de la pèrdua de funció de FUS. Tanmateix, aquests mateixos mecanismes poden operar *in*

*vivo*, i també podrien esser expressats per les altres formes avaluades (C9orf72). Eventualment, aquests resultats remarquen la necessitat d'estudiar de forma multivariada la resposta cel·lular, i subratllen l'exigència d'una adequada individualització, a nivell molecular, dels pacients d'ELA. A més a més, part d'aquests resultats es contrasten amb els resultats obtinguts per (Sidibé et al., 2021) on van concloure a partir de la seva investigació que els nivells nuclears de G3BP1 es troben disminuïts en l'ELA, fet que comporta un augment de les inclusions citoplasmàtiques de TDP-43 i una depleció nuclear.

Per tal d'avaluar si les alteracions provocades per l'agregació proteica poden estendre's a un model més complex de la malaltia, el del G93A, i en coordinació amb la resta d'activitats del nostre grup de recerca, es va avançar estudiant la resposta als mecanismes d'estrès cel·lular i la composició lipídica en el model del ratolí.

Tal i com s'ha explicat anteriorment, una desregulació del metabolisme dels lípids és una part important en la patogènesi de l'ELA (Agrawal et al., 2022) ja que són diferents estudis que demostren que nivells elevats d'alguns dels lípids estan associats a la disfunció i mort de les motoneurons (H. Lee et al., 2021). Addicionalment, l'homeòstasi de les membranes cel·lulars requereix d'una adequada síntesi lipídica. Diferents troballes del grup (Cacabelos et al., 2016; Torres et al., 2020) i per altres autors (Arima et al., 2015; O'Reilly et al., 2020; Zárata et al., 2017) apunten a l'homeòstasi dels àcids grassos poliinsaturats com a rellevant en l'etiopatogenia de la malaltia. Per tant, degut a aquests motius, s'han analitzat en el present treball diferents proteïnes que es troben involucrades en el metabolisme dels lípids, com l'enzim peroxisomal SCP2, la desaturasa FADS2, i dos proteïnes implicades en la senyalització mediada per lípids: PKC $\beta$ II i PLC $\beta$ 1.

Per una banda, en el model ratolí s'ha analitzat SCP2 i FADS2. Pel que fa a SCP2 juga un paper important en el tràfic i metabolisme del colesterol intracel·lular (Colles et al., 1995; Stolowich et al., 1999) i dels hidroperòxids de colesterol (Kriska et al., 2010). Tot i així, també es troba involucrada en el transport i metabolisme d'altres lípids (N. C. Li et al., 2016), ja que esdevé important en la part de  $\beta$ -oxidació necessària en els últims passos de la síntesi de determinats àcids grassos poliinsaturats. Pel que fa a FADS2 participa en la biosíntesi d'àcids grassos altament insaturats a partir de PUFA, particularment en la síntesi del DHA, component molt important en les membranes cel·lulars. Per tant, tant un com

l'altre són altament importants en l'homeòstasi lipídica ja que controlen diferents punts del metabolisme dels lípids.

Tant per SCP2 com per FADS2 en aquest treball es va observar un augment dels seus nivells en els ratolins G93A de 150 dies d'edat respecte els no transgènics. Fins aquestes dades, no s'havia explorat el paper de SCP2/SCPx i FADS2 en l'etiopatogenia de l'ELA i els seus models. SCP2 podria tenir un paper dual, podria estar augmentant els fosfolípids i èsters de colesterol necessaris per les neurones motores, però també podria trobar-se implicat en l'acumulació dels seus subproductes tòxics i oxidats i estar contribuint en la fisiopatologia de la malaltia en aquests ratolins (Girotti & Kriska, 2015; Kriska et al., 2010). De la mateixa forma podria estar passant amb FADS2, l'augment de la seva expressió i per tant de la seva activitat, estaria contribuint en una síntesi del DHA alterada, aquest es podria estar acumulant a les cèl·lules. Dades recents suggereixen que FADS2 pot augmentar la sensibilitat a la ferroptosi en models cel·lulars (Y.-L. Li et al., 2020; Yamane et al., 2022). De nou, per bé que els àcids grassos poliinsaturats són importants per l'organisme una síntesi aberrant d'ells i per tant, una acumulació, estaria jugant un paper tòxic per la cèl·lula, confirmant doncs la toxicitat d'alguns lípids en aquest model. Per altra banda, tant per SCP2 com per FADS2, l'acumulació dels seus agregats citosòlics estaria contribuint en agreujar la situació, per tant, s'estaria generant estrès tant per acumulació tòxica de lípids com d'agregats proteics.

Per aquest motiu, s'ha analitzat la potencial acumulació d'aquestes proteïnes en els models de motoneurones derivades de pacients on també es va observar un augment dels nivells de SCP2 en les línies cel·lulars C9orf72 i FUS (reforçant les troballes als ratolins). Seguint la mateixa línia, SCP2 podria trobar-se incrementat per tal de poder sintetitzar fosfolípids i colesterol necessaris per diferents funcions cel·lulars i a la vegada podria estar contribuint a la toxicitat que aquests poden generar si s'acumulen de forma aberrant a la cèl·lula. Així com també l'agregació d'ambdues proteïnes estaria contribuint en la neurotoxicitat.

Quan les cèl·lules són estressades amb peròxid d'hidrogen i sorbitol els nivells d'expressió de SCP2 també augmenten en les tres línies. Aquest augment sota condicions d'estrès oxidatiu i osmòtic podria estar indicant que, SCP2 està contribuint en expandir els danys ja causats per l'estrès exogen a l'augmentar la síntesi i tràfic de colesterol i hidroperòxids de colesterol que s'acumularien a la cèl·lula (Girotti & Kriska, 2015; Kriska et al., 2010). Estaria

difonent doncs els seus efectes citotòxics, ja no solament per l'acumulació tòxica de lípids sinó que també, tal i com s'ha comentat anteriorment, per la presència d'agregats proteics.

Així doncs, aquestes troballes podrien suggerir que l'homeòstasi tant de SCP2 com de FADS2 és important en l'etiopatogenia de l'ELA ja que és necessari que els seus nivells d'expressió es mantinguin per evitar acumulacions tòxiques de lípids dels quals participen en la seva biosíntesis. Desregulacions en els dos gens, en aquest cas, per un augment de funció, estaria contribuint a l'acumulació tòxica dels seus subproductes.

SCP2/SCPx són proteïnes peroxisomals: la proteïna SCPx és una tiolasa associada al peroxisoma que està implicada en l'oxidació d'àcids grassos de cadena ramificada, necessària per la síntesi de lípids poliinsaturats, mentre que es creu que la proteïna SCP2 és una proteïna de transferència de lípids intracel·lular. El pas final de la via d'oxidació  $\beta$  peroxisòmica està catalitzat per la proteïna portadora d'esterols (SCPx), que està codificada pel gen SCP2. Per tal d'esbrinar si els canvis que s'han objectivat en SCP2, en aquest treball s'han analitzat també dues proteïnes que es troben en els peroxisomes ja que són òrgans molt importants en la biosíntesi de fosfolípids d'èter i en el metabolisme d'espècies reactives d'oxigen (Delille et al., 2006), dos processos que es troben alterats en l'ELA i que per tant, podria ser degut a alteracions en proteïnes que es troben a les seves membranes. Prèviament, s'han descrit alteracions peroxisomals en la malaltia (Fernández-Eulate et al., 2020; Fransen et al., 2013; Ramírez-Nuñez et al., 2021).

Per una banda, AGPS és un gen que juga un paper molt important en la producció de plasmalògens (Stazi et al., 2019). Aquests fosfolípids són essencials ja que es troben en les membranes cel·lulars i ajuden a protegir les cèl·lules de l'estrès oxidatiu quan s'acumulen radicals lliures i també participen en la transmissió de senyals químiques (Braverman & Moser, 2012). De forma prèvia, no s'havien descrit alteracions a AGPS en models d'ELA.

Per l'altra banda, PMP70 és un transportador de la família ABC amb la funció de transportar a través de la membrana peroxisomal una àmplia varietat de substrats, entre ells lípids (Gottesman & Pastan, 1993; C. F. Higgins, 1992). Mostra especificitat de substrat àmplia ja que es troba involucrat en el transport d'àcids grassos de cadena mitja i llarga (Van Roermund et al., 2014).

En el model del ratolí, tant els nivells d'AGPS com de PMP70 disminueixen en els ratolins G93A respecte els no transgènics als 150 dies d'edat. Tot i així, els resultats obtinguts en el WB per ambdues proteïnes a l'edat de 90 dies i 120 dies no mostren diferències ni per AGPS ni per PMP70, indicant doncs que la pèrdua d'expressió i per tant la pèrdua de funció, podria ser un fet lligat al temps i evolució de la malaltia. Els nostres resultats contrasten amb els ja publicats en un estudi realitzat al 2003 on van observar també que la disminució de PMP70 era un fet lligat a l'edat dels ratolins (H. S. Ilieva et al., 2003).

La pèrdua d'expressió amb la conseqüent pèrdua de funció d'AGPS estaria agreujant la situació d'estrès en els ratolins G93A, que ja tenen degut a la mutació en SOD1, ja que la pèrdua de funció d'AGPS podria estar provocant una disminució dels nivells de plasmalògens i per tant, aquests no podrien estar formant part de les membranes cel·lulars i no les estaria protegint davant la situació d'estrès, conduint a la mort cel·lular d'elles.

Per altra banda, la pèrdua de PMP70 podria ser la base de la disminució de les funcions peroxisomals i en conseqüència de l'augment de l'estrès oxidatiu present en l'ELA tal i com també s'indica en (H. S. Ilieva et al., 2003). En absència o reducció de les funcions dels peroxisomes aquests no podran metabolitzar les ROS presents i per tant, s'agreuja la situació d'estrès. A més a més, possiblement no es podrien estar transportant els lípids a través de la membrana peroxisomal, generant una acumulació d'aquests, que tal i com s'ha comentat anteriorment, una acumulació excessiva de lípids pot arribar a ser tòxica per les cèl·lules i encara més amb presència de les ROS, que oxidaran aquests lípids generant-se un cercle de retroalimentació positiva.

Els ratolins als 90 dies i 120 dies d'edat tot i ser portadors de la mutació encara no es troben en les fases més avançades de la malaltia, sobretot als 90 dies que és una fase clínica presimptomàtica. Per aquest motiu, encara poden estar preservades algunes de les seves funcions cel·lulars, com la transcripció d'aquests dos gens i per tant, la síntesi d'AGPS i PMP70. Ambdues proteïnes doncs podrien dur a terme la seva funció i mantenir l'homeòstasi lipídica i fer front a l'estrès oxidatiu que pateixen degut a la mutació al gen SOD1 que en són portadors. Ja a les fases més avançades de la malaltia, com seria als 150 dies d'edat, que és una fase clínica simptomàtica, gran part de les funcions cel·lulars es

troben afectades com seria el procés de transcripció gènica, i en conseqüència, la síntesi de proteïnes generant una haploinsuficiència d'AGPS i PMP70.

Pel que fa al model de motoneurons derivades de pacients els nivells d'AGPS disminueixen en les línies cel·lulars C9orf72 i FUS respecte la control i encara disminueix més després de la inducció d'estrès oxidatiu i osmòtic, reforçant la pèrdua d'aquesta proteïna com a potencial nova diana terapèutica. La pèrdua d'expressió d'AGPS i per tant de la seva funció podria estar contribuint a agreujar la situació d'estrès, ja que les cèl·lules no estarien produint nivells suficients de plasmalògens, necessaris per les membranes cel·lulars, i en conseqüència no les podria estar protegint de l'estrès al qual se les està sotmetent, accelerant el procés de neurodegeneració.

Per altra banda, pel que fa a PMP70 en aquest treball no es detecten canvis entre la línia control i la línia C9orf72, tot i així, quan s'indueix un estrès oxidatiu els nivells dels agregats de la proteïna augmenten. Les cèl·lules al detectar aquest estrès induït amb peròxid d'hidrogen podrien respondre de forma adaptativa augmentant els nivells de PMP70 per tal de mantenir la funció peroxisomal i així poder fer front a l'estrès que se'ls hi està induït i ajudar en el transport d'àcids grassos a través de les membranes per evitar la seva acumulació i que aquests no esdevinguin tòxics per les cèl·lules. Tot i així, aquest augment de PMP70 podria estar jugant un paper dual, ja que estaria generant agregats proteics els quals són tòxics i per tant, no estaria contribuint a fer front a l'estrès oxidatiu sinó que possiblement n'estaria induït encara més.

En el context d'analitzar alteracions de proteïnes implicades en el metabolisme de lípids es va tenir l'oportunitat d'analitzar PKC $\beta$ II i PLC $\beta$ 1 en mostres de medul·la espinal de ratolins a tres edats diferents, 90, 120 i 150 dies, tant per IF com per WB. La motivació d'aquesta elecció de proteïnes té a veure amb troballes d'altres investigadors (Lanius et al., 1995; Lucke-Wold et al., 2015; Tury et al., 2014). PKC $\beta$ II i PLC $\beta$ 1 participen en una gran varietat de processos cel·lulars, entre ells la proliferació cel·lular i la supervivència/mort cel·lular (Mochly-Rosen et al., 2012) i també en el metabolisme del diacilglicerol (Ngoh et al., 2014; Spyridakis et al., 2010). A més a més, anteriors estudis ja van destacar una desregulació significativa d'altres isoenzims de PKC, com PKC $\alpha$  i PKC $\delta$ , a les motoneurons dels pacients amb ELA i en G93A (Dave et al., 2005; Tury et al., 2014).

Tant per PKC $\beta$ II com per PLC $\beta$ 1 s'observa una disminució de l'expressió de la proteïna en els ratolins G93A de 150 dies d'edat respecte els controls de la mateixa edat. En canvi, per 90 dies i 120 dies no es detecten canvis. Per tant, la pèrdua d'expressió d'ambdues proteïnes és un fenomen que es produeix a les etapes finals de la malaltia, en les fases clíniques simptomàtiques. La pèrdua d'expressió i per tant, la pèrdua de funció podrien estar contribuint en agreujar la malaltia, ja que es produiran alteracions en el metabolisme dels lípids, concretament del diacilglicerol, del qual en són responsables del seu metabolisme, així com particularment la senyalització secundària. El DAG és un component important de les membranes cel·lulars i a més és intermediari en el metabolisme d'altres lípids (Carrasco & Mérida, 2007). Per tant, la pèrdua de funció de PKC $\beta$ II i PLC $\beta$ 1 amb la consegüent deficiència en la síntesi de DAG i alteracions en el metabolisme d'altres lípids, estaria afectant de forma directa a la neurodegeneració, per falta de DAG a les membranes cel·lulars entre altres causes i/o per acumulació tòxica de certes espècies lipídiques. En canvi, als 90 dies i 120 dies d'edat, no s'observen canvis en els nivells d'expressió d'aquestes proteïnes, indicant que al ser fases més inicials de la malaltia, encara es troben preservades certes funcions cel·lulars, entre elles la síntesi de PKC $\beta$ II i PLC $\beta$ 1 i per tant, pel moment, es mantindria l'homeòstasi del metabolisme del DAG i d'altres lípids, fet que ajudaria a mantenir les cèl·lules en bon estat. A mesura que evoluciona la malaltia, aquesta síntesi de PKC $\beta$ II i PLC $\beta$ 1 es pot veure compromesa donant lloc ja a alteracions en el metabolisme.

Com s'ha explicat anteriorment, les proteïnes VAP (VAPA i VAPB) es troben localitzades a la superfície citosòlica del RE i actuen reclutant una gran varietat de proteïnes a la seva superfície (Dudás et al., 2021; Lev et al., 2008; S. E. Murphy & Levine, 2016). Per tant, aquestes proteïnes serveixen de pont per connectar el RE amb pràcticament tots els orgànuls, entre ells els mitocondris, aparell de Golgi, peroxisomes i endosomes (James & Kehlenbach, 2021). El RE, a través dels contactes amb aquestes altres membranes, intervé en la síntesi lipídica i en d'altres funcions afectades potencialment en l'ELA (Bosc et al., 2020; Manfredi & Kawamata, 2016).

Per aquest motiu, en el present treball s'han volgut analitzar aquestes dues proteïnes, tant en model ratolí G93A com en el model de motoneurons derivades de pacients ja que anys enrere es va descobrir una mutació en VAPB que causa una forma de ELAf (ALS8) (Y. min Sun et al., 2017; van Blitterswijk et al., 2012). Per tant, aquest fet indica que aquestes dues



proteïnes podrien estar jugant un paper important en la fisiopatologia de l'ELA i degut a que són essencials per la comunicació interorgànica, alteracions en elles es podrien traslladar en problemes en altres orgànuls i en les seves funcions.

Els resultats obtinguts en aquest treball no han mostrat alteracions en els nivells ni de VAPA ni de VAPB en els ratolins G93A respecte els no transgènics als 150 dies d'edat. Si que s'observa que els nivells de VAPA són més elevats respecte els de VAPB, resultat demostrat anteriorment (Cabukusta et al., 2020). Aquesta diferència en els nivells de les dues proteïnes podria ser degut a que VAPA desenvolupa alguna funció essencial encara desconeguda que no realitza VAPB.

Pel que fa al model de motoneurons derivades de pacients augmenta el nombre d'agregats tant per la proteïna VAPA com per la proteïna VAPB en el citosol de les cèl·lules de la línia C9orf72 i de la línia FUS respecte la control i disminueixen en el nucli. Aquestes dues línies cel·lulars, amb les seves respectives mutacions, es troben sota situacions patològiques, per acumulació de productes tòxics que generen neurotoxicitat i la cèl·lula ha de fer front a ells eliminant-los. Aquest augment dels agregats proteics de VAPA i VAPB en el citosol, compatible amb una potencial pèrdua de funció d'ambdues, podrien provocar una insuficiència en el reclutament de diferents proteïnes del RE per generar ponts i establir contacte amb altres orgànuls, entre ells, endosomes. Així doncs, la cèl·lula no estaria sent capaç de fer aquestes unions amb la consegüent falta d'eliminació de les partícules tòxiques i contribuint en la fisiopatologia de la malaltia. Per contra, la cèl·lula estaria intentant respondre de forma compensatòria a aquesta haploinsuficiència augmentant la síntesi de VAPA i VAPB però de retruc estaria contribuint en agreujar la situació patològica degut a un augment tòxic d'agregats proteics.

Les cèl·lules sota situacions d'estrès, oxidatiu i osmòtic, presenten també un augment general dels agregats citosòlics de VAPA i disminueixen en el nucli. Pel que fa a VAPA en la línia control i en la línia C9orf72 augmenten els agregats en el citosol tant amb el tractament amb peròxid d'hidrogen com amb sorbitol. En la línia FUS però no es detecten canvis sota el tractament amb peròxid d'hidrogen. De nou reproduïm el patró que s'ha objectivat en el cas dels GS, on la línia FUS té un comportament marcadament diferents a les altres cèl·lules. Seguint el mateix argument, si la proteïna es troba reclutada formant agregats aberrants, no

podria dur a terme la seva funció ni podria contribuir a la unió del RE amb altres orgànuls, com els endosomes, en aquest cas molt importants per tal d'eliminar el peròxid d'hidrogen i sorbitol que se'ls hi ha administrat a les cèl·lules.

Degut a que VAPA i VAPB funcionen conjuntament i una podria estar reclutant l'altra els resultats obtinguts per VAPB són similars als anteriors. Tant en la línia C9orf72 com en la línia FUS es produeix un augment dels agregats citosòlics de la proteïna i una disminució en el nucli sota situacions d'estrès oxidatiu i osmòtic generats a partir de peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament. En canvi, per FUS tampoc s'observen canvis en les immunofluorescències. Per aquesta proteïna es va tenir l'oportunitat de corroborar els resultats per WB en el línia C9orf72 i FUS, confirmant l'augment dels nivells de la proteïna sota el tractament amb peròxid d'hidrogen, també per FUS que en la IF no s'arriben a veure diferències significatives. Una de les explicacions davant aquestes diferències entre els resultats obtinguts en la immunofluorescència i en el WB és que l'anticòs no hagués penetrat bé dins les cèl·lules durant la immunofluorescència.

Així doncs, com VAPA i VAPB són importants en la comunicació entre orgànuls, si aquestes es troben reclutades en agregats possiblement no poden dur a terme la seva funció agreujant la situació d'estrès de les cèl·lules, fet que empitjora encara més quan se'ls hi administra diferents estressos de forma exògena. Les nostres dades donen suport a un model en què la pèrdua de funció d'ambdues donen lloc a una disminució de l'ancoratge de diferents proteïnes amb el RE i provoquen la degeneració de la motoneurona tal i com també es va demostrar en un altre estudi realitzat prèviament (Teuling et al., 2007). No es podrien unir, per exemple, a endosomes, per eliminar aquestes partícules que s'aniran acumulant a la cèl·lula contribuint a la neurodegeneració. A més, VAPA i VAPB treballen conjuntament, una està reclutant a l'altra, i per tant, no es trobaria cap de les dues disponibles a la seva localització habitual per tal de poder fer la seva funció. I no solament s'estaria agreujant la situació d'estrès a conseqüència de la haploinsuficiència, sinó que també degut a la resposta compensatòria de les cèl·lules a augmentar la síntesi d'ambdues proteïnes, comportaria una acumulació tòxica d'agregats, que encara agreujaria més la fisiopatologia.

Per tal de veure si les alteracions al lipidoma, secundàries a canvis en SCP2/SCP2x, FADS2 i la resta de proteïnes avaluades, poden implicar a canvis en la funció cel·lular, s'ha estudiat els canvis en el tràfic endosomal. Aquest és un dels determinants de l'homeòstasi de l'agregació proteica, ja que els lisosomes són rellevants en la resposta de proteòlisi per a impedir l'acumulació dels agregats proteics (Root et al., 2021).

En aquest treball s'ha analitzat Rab5 i Rab7 tant en model ratolí G93A com en motoneurons derivades de pacients. En els ratolins els resultats obtinguts mostren un augment de la proteïna en els ratolins G93A respecte els no transgènics als 150 dies d'edat, quan la malaltia ja està avançada, en la fase clínica simptomàtica terminal. Aquest augment en els ratolins G93A, afectats per la malaltia, podria ser degut que sota aquesta situació patològica, on existeix cert estrès cel·lular, es necessiten més endosomes per tal de poder eliminar o degradar les proteïnes modificades que estan generant aquest estrès. Per aquest motiu, Rab5 i Rab7 augmentarien probablement perquè ambdues proteïnes participen en la formació dels endosomes primerencs i tardans respectivament i d'aquesta manera les cèl·lules formarien més endosomes per tal d'activar la via endocítica i fer front a aquest estrès tal i com es demostra en els anàlisis per immunofluorescència. En canvi, en el WB, realitzat en mostres de 90 dies i 120 dies d'edat del ratolí, quan la malaltia encara no està tant avançada, no es produeix aquest augment ni de Rab5 ni de Rab7, tot i que els resultats mostren una tendència a augmentar, sobretot als 120 dies d'edat, sent aquesta també una fase simptomàtica de la malaltia en el model ratolí.

Pel que fa al model de motoneurons derivades de pacients, s'ha observat que els nivells de Rab5 i Rab7 augmenten tant en la línia C9orf72 com en la línia FUS respecte la línia control, suggerint que el increment de Rab5 i Rab7 podria ésser una resposta homeostàtica a l'estrès secundari a la presència de C9orf72 i a la mutació de FUS. Pel que fa a la línia C9orf72 es podrien estar plantejant dos escenaris diferents, totalment oposats l'un de l'altre. Per una banda, un dels mecanismes de la fisiopatologia de l'ELA causada per C9orf72 pot ser degut a la traducció RAN que produeix cinc DPR, els quals s'acumulen i són tòxics per les cèl·lules tal i com s'ha explicat anteriorment (Ash et al., 2013; Josephs et al., 2011). Per aquest motiu, l'augment tant de Rab5 i Rab7 en aquesta línia podria ser degut a que, igual que en el cas dels ratolins, es necessita activar tota la via endocítica i augmentar la biogènesis d'endosomes per tal de fer front a aquests DPR tòxics i poder així, eliminar-los de la cèl·lula.

En canvi, per altra banda, un dels altres mecanismes patològics de C9orf72 seria el seu guany tòxic de funció, provocant una acumulació d'ARN sentit i antisentit (GGGGCC)<sub>n</sub> el qual es plega adoptant unes estructures secundàries molt estables que poden segrestar o alterar la funció de certes proteïnes (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Gendron et al., 2013; Zu et al., 2013). En aquest cas, l'augment dels agregats de Rab5 i Rab7 podria ser degut a aquestes estructures secundàries que segresten i alteren ambdues proteïnes, provocant una haploinsuficiència d'ambdues, i per tant, no podrien iniciar la biogènesi d'endosomes. La cèl·lula, per intentar compensar aquesta haploinsuficiència intentaria sintetitzar més Rab5 i Rab7 per tal de compensar-ho, generant encara més agregats aberrants i agreujant la situació patològica d'estrès.

Per altra banda, les motoneurons de la línia FUS, amb mutacions en aquest gen, presenten neurotoxicitat i per tant, degeneració de les motoneurons per un guany tòxic de funció (Sharma et al., 2016). Per aquest motiu, també es podria trobar augmentat tant Rab5 i Rab7 per fer front a aquesta neurotoxicitat a través de la via endocítica i posterior formació de lisosomes.

Pel que fa als experiments on es va induir estrès oxidatiu i osmòtic amb peròxid d'hidrogen i sorbitol respectivament s'ha observat en les quantificacions que els nivells de Rab5 augmenten de forma generalitzada en el citosol sota el tractament amb sorbitol i disminueixen en el nucli en les tres línies cel·lulars analitzades: control, C9orf72 i FUS, reforçant el seu increment com a potencial biomarcador d'estrès cel·lular. Seguint la mateixa línia, els nivells de Rab5 augmenten en el citosol de les cèl·lules (on es realitza la via endocítica) per un possible inici de la biogènesi d'endosomes i així eliminar el sorbitol que els hi està generant l'estrès. Sota l'estrès amb peròxid d'hidrogen en les IF no s'arriben a observar diferències significatives, possiblement s'hauria d'augmentar la concentració de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o el temps de tractament. En el cas de la línia C9orf72, al WB realitzat si augmenten els nivells de Rab5 sota l'estrès amb peròxid d'hidrogen de forma dosi dependent, ja que es produeix més augment de la proteïna a més concentració de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donant més pes a la hipòtesis de que les cèl·lules al detectar l'estrès que se'ls hi està induint podrien necessitar activar la via endocítica. Per contra, en la línia C9orf72, tal i com s'ha comentat anteriorment, l'augment de Rab5 en el citosol podria ser en forma d'agregats aberrants,

amb la consegüent pèrdua de funció de la proteïna i per tant, no es podria iniciar la biogènesi d'endosomes i aquests no podrien contribuir en l'eliminació de l'estrès.

Per Rab7 també augmenten els seus nivells en el citosol de les cèl·lules de les tres línies i disminueix en el nucli sota l'estrès osmòtic induït amb sorbitol. A més a més, en dues de les línies, concretament la control i la C9orf72 també s'arriba a veure un augment en el citosol sota el tractament amb peròxid d'hidrogen, així com també en el WB realitzat en la línia C9orf72. D'igual forma que per Rab5, els nivells de Rab7 podrien veure's augmentats de forma adaptativa per tal de fer front al peròxid d'hidrogen i sorbitol exogen que se'ls hi ha administrat a les cèl·lules. Rab7 participa en les fases final de l'endocitosi i també en la formació dels lisosomes, per això és una proteïna important per poder eliminar aquests compostos. O també podria estar-se produint totalment la situació oposada, degut a les estructures estables d'ARN que genera el guany tòxic de funció de C9orf72, estarien segrestant Rab7 en el citosol, augmentant els agregats proteics que estarien contribuint a agreujar la situació d'estrès, no solament per la haploinsuficiència de Rab7, sinó que també per l'acumulació tòxica d'aquests agregats com a resposta compensatòria.

Per tant, tant Rab5 i Rab7 es troben augmentades en la línia C9orf72 i FUS sense condicions d'estrès ja que de per si, la mutació que presenten ja els hi està generant estrès, i a més, quan se'ls hi genera un estrès exogen, els nivells d'ambdues proteïnes encara augmenten més. O per contra, en el cas de C9orf72, s'estaria produint un segrest d'ambdues proteïnes, provocant una pèrdua funcional d'elles, i per tant, no podrien contribuir en iniciar la via endocítica, agreujant la situació d'estrès. Tant un mecanisme com l'altre, estarien corroborant que Rab5 i Rab7 són necessàries sota aquestes situacions per tal d'activar la via endocítica. Les nostres troballes en els nostres cultius de motoneurons ajudarien a confirmar que la disfunció en el tràfic endosomal (mediat per les Rab) es trobaria implicat en la neurodegeneració i la patogènesi de L'ELA (Parakh et al., 2018).

## **6.2. El microbioma i el seu metabolisme com a determinant fisiopatològic**

Entre els factors que poden conduir a diferències en la progressió de la malaltia destaca la neuroinflamació, que té capacitat de generar alteracions cel·lulars a les motoneurons i també a les cèl·lules que les envolten (com l'astrogliosi, la infiltració microglial, entre

d'altres). Com s'ha demostrat en les imatges de microscopia confocal en el model G93A, i d'acord amb troballes prèvies (Loving & Bruce, 2020) existeixen canvis compatibles amb infiltració microglial de forma concurrent a les alteracions en les proteïnes implicades en el manteniment del lipidoma. Com que la neuroinflamació és clarament influenciable, en el cas dels humans, per la microbiota, al segon bloc de la discussió s'interpretaran els resultats de l'estudi pilot d'anàlisi del microbioma i de part del seu metaboloma (àcids grassos de cadena curta) en el context de la malaltia.

Com s'ha introduït prèviament, els àcids grassos de cadena curta poden donar lloc a alteracions en la susceptibilitat a la neuroinflamació (J. Park et al., 2019; L. Song et al., 2022). Cal tenir en compte la limitació que només hem determinat els àcids grassos en la mostra de la microbiota, i per tant la seva biodisponibilitat real pot esser variable, en particular en situacions com en l'ELA on poden haver-hi variacions de la permeabilitat intestinal (Boddy et al., 2021; Wu et al., 2015a). Els àcids grassos de cadena curta, representats en un 95% del total per àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric (Primec et al., 2017) són obtinguts majoritàriament a partir de la fermentació de carbohidrats per una gran varietat de microorganismes residents al llarg de l'intestí humà. Aquests, no solament serveixen com a font d'energia sinó que també per mantenir l'homeòstasi dels enteròcits (Torii et al., 2010). Per aquest motiu, alteracions en ells poden donar lloc a diferents patologies o contribuir en el seu desenvolupament i progressió.

En aquest treball no s'han trobat diferències significatives ni en els nivells d'àcid acètic, ni en l'àcid propiònic ni en l'àcid butíric en les mostres de femta de pacients d'ELA respecte els controls. Tot i així, pel propiònic i pel butíric si que s'observa una petita tendència a augmentar els seus nivells en els pacients d'ELA bulbar. El fenotip bulbar de la malaltia cursa amb una simptomatologia molt diferent, almenys en les fases inicials, com és la disfàgia. Al tenir problemes en la deglució, la seva alimentació s'haurà d'adaptar a les condicions de cada pacient i això pot repercutir de forma directa a la microbiota intestinal. Si es produeixen canvis en els bacteris responsables de la fermentació d'aquests àcids grassos en concret, possiblement es veuran afectats els seus nivells tal i com s'observa en els nostres resultats. Cal tenir present que les mostres són recollides a la primera visita i que per tant, la disfàgia podria estar en fases inicials, tot i així, només que es produeixin petites alteracions

en la deglució ja es podrien traduir en alteracions en la microbiota. Per aquest motiu, també s'ha procedit a analitzar la microbiota i la relació que pot tenir amb aquests àcids grassos.

Adicionalment, cal recordar, com s'ha indicat a la introducció, que l'eix microbiota-sistema digestiu-cervell és un dels factors que pot contribuir a la diversitat del fenotip en múltiples patologies (John F Cryan et al., 2019; Mayer et al., 2015).

Tal i com s'ha observat en els resultats anteriors, la correlació entre l'àcid acètic i propiònic es manté en la malaltia, tant en el fenotip espinal com en el bulbar. Aquest fet podria estar explicant que la major producció d'aquests dos àcids grassos són produïts per bacteris que no es troben alterats en la malaltia i per aquest motiu la correlació no es veu afectada.

S'ha analitzat els bacteris presents en la microbiota intestinal a partir de les mostres de femta a nivell de fílum, família, gènere i espècies. Els resultats que es mostren en aquest treball representen els grups de bacteris més predominants en el tracte gastrointestinal humà i que poden tenir una influència més important quan es produeixen canvis en ells.

A nivell de fílum s'ha analitzat l'abundància dels bacteris *Firmicutes* i *Bacteroidetes* així com també el rati. Aquests dos fílums comprenen la majoria del microbioma (Mariat et al., 2009) i el desequilibri en el rati *Firmicutes/Bacteroidetes* s'associa amb diferents problemes de salut (Tilg & Kaser, 2011). Fins al moment, no està del tot clar com es troba aquest rati en els pacients amb ELA, ja que hi ha diferents estudis que troben un rati augmentat mentre que d'altres, disminuït (Martin et al., 2022). En aquest treball, tot i no ser significatiu, s'ha observat una tendència en augment d'aquest rati respecte els controls sans, amb un augment dels *Firmicutes* i una disminució dels *Bacteroidetes*. Tot i així, quan s'analitza *Bacteroidetes* per fenotip s'observa que en el fenotip bulbar tendeix a augmentar. Tal i com s'ha comentat anteriorment, és necessari analitzar l'ELA diferenciant els dos fenotips, ja que els mecanismes microbians i per tant la disbiosi pot ser molt diferent d'un fenotip a l'altre. Es fan necessaris més estudis i amb una cohort major de pacients per acabar de determinar aquest rati, tenint en compte diferents variables que poden modificar l'abundància dels dos fílums de bacteris, ja sigui l'edat, l'alimentació, el pes o l'administració d'antibiòtics, pro, pre i post biòtics. Dades recents (Gong et al., 2023) evidencien que existiria canvis en el rati d'acord a l'alteració cognitiva dels pacients. Així es poden trobar comunitats microbianes intestinals alterades i una proporció més baixa de *Firmicutes/Bacteroidetes* al grup amb

alteració cognitiva, en comparació amb el grup preservat. A més, el mapatge de metabòlits no dirigit va revelar que 26 i 17 metabòlits van augmentar i disminuir significativament, respectivament, al grup d'empitjorament cognitiu, en comparació amb el grup no alterat. Aquests metabòlits es van assignar a les vies metabòliques associades als àcids biliars. Cal fer notar que s'ha proposat l'ús d'un dels àcids biliars, l'ursodeoxicòlic i derivats, com a potencial tractament a l'ELA (Elia et al., 2016; Parry et al., 2010).

Tenint en compte les nostres troballes de canvis en el peroxisoma, es assumible plantejar que la pèrdua peroxisomal, suggerida amb les troballes en els models preclínics, podrien tenir transcendència en la síntesi *in situ* d'aquests derivats del colesterol (Ferdinandusse et al., 2009).

En quant a l'anàlisi del fílum *Proteobacteria*, un estudi previ ja va observar un augment d'aquests tant en el fenotip espinal com en el fenotip bulbar respecte els controls sans (H. S. Kim et al., 2022). Per aquest motiu, en els nostres resultats, tot i no ser estadísticament significatiu, podríem afirmar que hi ha una tendència en augment d'aquest fílum en pacients d'ELA, tant espinal com bulbar, respecte els controls. *Proteobacteria* és dels filums de bacteris més predominants en el tracte gastrointestinal després dels *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. A més a més, es creu que *Proteobacteria* juga un paper important en la preparació del intestí per la colonització per part dels bacteris aeròbics estrictes necessaris per una funció intestinal saludable ja que consumeixen oxigen i redueixen el potencial redox en l'entorn intestinal (Shin et al., 2015). Per aquest motiu, no és d'estranyar que, al ser dels bacteris més predominants del tracte gastrointestinal i que ajuden a la correcta funció d'altres, alteracions en ells podrien tenir grans repercussions en l'homeòstasi del microbioma desencadenant diferents patologies.

Pel que fa a l'abundància del fílum *Cyanobacteria* en aquest treball, tot i no ser significatiu, s'observa una tendència a augmentar en els pacients amb ELA, tant espinal com bulbar, respecte els controls sans, augment observat també en un altre estudi (Di Gioia et al., 2020). Algunes espècies d'aquest fílum produeixen algunes neurotoxines, entre elles, la beta-metilamino-L-alanina, que introdueix desordres en l'estructura proteica, i ha estat associada amb l'ELA (Bradley et al., 2013). Es creu que, entre d'altres coses, aquesta toxina s'incorpora a la SOD1 desestabilitzant-la i promovent la formació d'agregats (Proctor et al., 2019). Al



2009 un grup d'investigadors ja va observar diversos casos d'ELA entre els residents d'Enfield, una ciutat envoltada per un llarg amb un historial de floracions de brots *Cyanobacteria* (Caller et al., 2009). Per tant, els nostres resultats estarien d'acord amb la possible influència de membres del fílum lligada al desenvolupament de l'ELA, ja que al trobar-se augmentada, podrien estar alliberant més. A més a més, es demostra també que factors ambientals, com l'aigua en mal estat, poden ser un factor de risc important a tenir en compte a l'hora de desenvolupar la malaltia, fet que suggereix l'alt nombre de factors que modularien la malaltia.

Per altra banda, l'abundància de membres del fílum *Actinobacteria*, tot i no ser significatiu, s'observa també una tendència a augmentar en els pacients amb ELA, tant en el fenotip espinal com en el bulbar, respecte els controls sans, observat també en un altre estudi (Casani-Cubel et al., 2021). L'augment d'*Actinobacteria* s'associa amb una millora de trastorns de l'estat d'ànim, com ara la depressió. La majoria de pacients amb ELA pateixen de depressió (N. Huang et al., 2019) que influeix en la progressió de la malaltia (Carelli et al., 2018). Així doncs, es podria hipotetitzar que l'augment observat en el fílum *Actinobacteria* podria contribuir a una millora en els símptomes de la depressió i conseqüentment estaria aportant beneficis en la progressió de la malaltia. Tanmateix, tant aquesta com les anteriors premisses sobre l'abundància de fílum concrets cal contextualitzar-les a l'entorn on s'han objectivat, i caldria la repetició d'aquestes troballes en una sèrie més àmplia de pacients.

Per últim, l'abundància de membres del fílum *Fusobacteria*, tot i no ser significatiu, també mostra una tendència a augmentar en els pacients amb ELA, tant en el fenotip espinal com en el bulbar, respecte els controls sans. *Fusobacteria* compren diversos membres amb capacitat de modular la permeabilitat epitelial, ajudant i facilitant la translocació d'altres microbis al medi intern. Així, poden alterar les unions entre les cèl·lules endotelials i per tant augmentar la permeabilitat dels vasos sanguinis (Fardini et al., 2011). Així doncs, un enriquiment de *Fusobacteria*, tal i com sembla mostrar el present treball, podria facilitar la translocació microbiana i contribuir a les manifestacions sistèmiques de la potencial disbiosi intestinal de l'ELA. Un altre grup d'investigadors al 2022 van afirmar que l'alta abundància de *Fusobacteria* es correlaciona positivament amb la translocació microbiana en l'ELA (H. S. Kim et al., 2022).

En els anàlisis de correlació entre la durada de la malaltia i l'abundància de bacteris a nivell de fílum s'objectiva una relació significativa entre l'abundància de *Proteobacteria*, *Deferribacteres* i *Fibrobacteres* i la durada, tant en l'ELA espinal com en pacients d'ELA bulbar. Amb totes les reserves derivades del fet que la mostra es va obtenir en moments probablement diferents dins la progressió de la malaltia pels diferents pacients, i de l'extrapolació que una durada de la malaltia major implicaria un curs menys agressiu de la patologia, es pot plantejar el paper modulador de membres d'aquests fílums. Així *Deferribacteres* i *Fibrobacteres* són fílums de bacteris que participen en el metabolisme dels carbohidrats i en la fermentació de la fibra dietètica (Forano et al., 2008; Kaznadzey et al., 2017). La relació inversa entre l'abundància d'aquests fílums de bacteris i supervivència no té una interpretació única, tot i que pot estar relacionada amb els canvis en el microbioma intestinal que s'ha observat en les persones amb aquesta malaltia ja que la disfunció del sistema nerviós central pot afectar a la microbiota intestinal (Castillo-Álvarez & Marzo-Sola, 2022). Alternativament, en un model de neurodegeneració, el ratolí *Cln<sup>1R151X</sup>* lligat a alteracions en enzims lisosomals, la ingesta d'aigua acidificada implica una millora en la malaltia, lligada a disminució en l'abundància de *Deferribacteres*, entre d'altres (Kovács et al., 2022). Aquests microorganismes també s'han lligat, en models preclínics, a una major capacitat proinflamatòria, ja que alguns dels seus membres exhibeixen activitat degradadora de mucina, i per tant, podrien facilitar la disbiosi (Selvanantham et al., 2016). En contraposició, les dades sobre *Fibrobacteres* apuntarien a que seria un factor potencialment protector. En dades recents, s'ha descrit que aquest fílum augmenta la seva abundància en tractar models de parkinsonisme amb levo-dopa (Sheng et al., 2023) o bé a l'hora de la resposta a probiòtics en models d'esquizofrènia (J. Xiao et al., 2020). Així doncs, no en totes les malalties funciona igual i no tots els canvis són senzills d'interpretar.

A nivell de família es destaca els obtinguts en l'abundància dels bacteris *Bacteroidaceae*. Els resultats obtinguts, tot i no ser significatius, mostren una tendència a disminuir en els pacients d'ELA respecte els controls. En canvi, quan s'analitza per separat els dos fenotips, l'espinal i el bulbar, s'observa que en l'ELA espinal tendeix a disminuir i en canvi en l'ELA bulbar tendeix a augmentar respecte els controls sans. Molts dels estudis publicats analitzen l'ELA com una sola malaltia, però en un estudi molt recent es va trobar diferents resultats entre fenotips recolzant diversos mecanismes microbians entre el fenotip espinal i el fenotip

bulbar (H. S. Kim et al., 2022). L'ELA espinal cursa amb un quadre simptomatològic molt diferent al de l'ELA bulbar, per aquest motiu, molt possiblement la disbiosi microbiana diferirà també entre els dos fenotips, i pot ser que en un fenotip un determinat bacteri es trobi disminuït mentre que en l'altre fenotip es trobi augmentat. El que sembla clar és que en la malaltia es produeix una disbiosi en aquests bacteris, i ja sigui per un augment o per una disminució, comportaria diferents conseqüències negatives que poden tenir influència en el desenvolupament o en la progressió de l'ELA. A d'altres patologies neurodegeneratives, com la malaltia d'Alzheimer, s'ha descrit un increment en la quantitat de *Bacteroidaceae* (P. Fang et al., 2020), tot i que també s'ha implicat a Parkinson (Chidambaram et al., 2022). En ambdós casos, fisiopatològicament, la disbiosi intestinal resultant alteraria la integritat de la barrera intestinal que condueix a l'entrada de patobionts i metabòlits tòxics a la circulació sistèmica provocant la desregulació de l'eix entero-cerebral. Posteriorment, la neuroinflamació crònica mitjançant l'activació immune desregulada desencadenaria l'acumulació de proteïnes (potser en forma de GS) amb capacitat neurotòxica dins i al voltant de les cèl·lules del SNC, contribuint a la mort neuronal.

En quant a l'anàlisi de *Ruminococcaceae*, tot i no ser significatiu, s'observa una tendència a augmentar en els pacients d'ELA, tant en el fenotip espinal com en el bulbar, respecte els controls. Molts dels bacteris productors d'àcid butíric són membres de la família *Ruminococcaceae* (Stø et al., 2022). Aquest augment de la seva abundància es correlaciona amb l'augment dels nivells d'àcid butíric observat també en aquest treball, demostrat amb l'anàlisi de regressió lineal on s'observa que a major abundància d'aquest bacteri majors són els nivells de butíric. Així doncs es corrobora que la potencial disbiosi podria contribuir en alteracions en la producció dels àcids grassos de cadena curta. Un altre estudi va trobar diferents proporcions de *Ruminococcaceae* entre els diferents pacients, indicant que d'una forma o d'una altra, hi ha una alteració en el microbioma en l'ELA (Brenner et al., 2018). A més a més, prèviament, aquesta família s'ha implicat en malaltia neurodegenerativa, en particular amb l'Alzheimer (Z. Chen et al., 2021). Cal recordar que els canvis en abundància d'aquesta família s'han associat a la neurodegeneració de l'ELA (Brenner et al., 2018; Di Gioia et al., 2020) i en part podria deure's a canvis en el metabolisme de derivats dels colesterol, com les esmentades sals biliars (Gong et al., 2023).

Pel que fa a l'anàlisi a nivell de gènere, es va analitzar l'abundància de *Bacteroides*. Els resultats obtinguts, tot i no ser significatius, mostren una tendència a disminuir en els pacients d'ELA respecte els controls sans, disminució que es contrasta també amb l'observada per altres investigadors (Boddy et al., 2021). *Bacteroides* és un dels microorganismes beneficiosos i està descrit que podria reduir els factors patògens del tracte gastrointestinal en la progressió del parasitisme intestinal (Löfmark et al., 2006; Salyers et al., 2004). Per aquest motiu, una disminució en representants d'aquest gènere podria estar contribuint a les diferents complicacions que es poden presentar durant el desenvolupament de la malaltia, com la pèrdua de pes, i per tant afectar en la progressió d'aquesta. D'igual forma que pel fílum *Bacteroidetes*, quan s'analitza *Bacteroides* per fenotip s'observa que en el fenotip bulbar tendeix a augmentar. Tal i com s'ha explicat anteriorment, és important realitzar l'anàlisi diferenciant els dos fenotips i no com una sola malaltia ja que s'ha demostrat que ambdós fenotips presenten diferents mecanismes microbians i la disbiosi present no necessàriament serà la mateixa.

Pel que fa al gènere *Prevotella*, en els nostres resultats tot i no ser significatius, es mostra una tendència a disminuir en els pacients amb ELA respecte els controls sans, tal i com també es va observar en un altre estudi (Hertzberg et al., 2022). *Prevotella* és un dels altres gèneres que es caracteritzen per ser potencialment beneficiosos pels pacients amb ELA (Casani-Cubel et al., 2021). Per tant, aquesta disminució podria estar contribuint en la progressió de la malaltia ja que *Prevotella* no estaria aportant aquests beneficis i a més, estaria facilitant la colonització per d'altres patògens. Tot i així, un cop més en el fenotip bulbar no s'observa el mateix efecte ja que *Prevotella* es troba augmentat demostrant doncs que existeixen diferències en la disbiosi microbiana entre els dos fenotips.

Pel gènere *Clostridium* en aquest treball tot i no ser significatiu, s'observa una tendència a augmentar, tant en el fenotip espinal com en el bulbar, respecte els controls sans. Un estudi anterior va poder identificar una toxina produïda per una espècie de *Clostridium* que causava un fenotip motor similar a l'ELA. Segons aquests autors (Longstreth et al., 2005) s'hipotetitza que aquesta espècie resideix a l'intestí i produeix de forma crònica una toxina que es dirigeix al sistema motor, com ho fan la toxina del tètanus o la botulínica. Aquesta toxina, després de tenir accés a la neurona motora inferior, seria transportada al cos cel·lular i destruiria la motoneurona. A més a més, part de la toxina creuaria a les cèl·lules

veïnes i a la neurona motora superior produint també la seva mort. Per tant, tal i com s'observa en els nostres resultats, un augment de *Clostridium* en l'ELA podria ésser un factor rellevant a la progressió de la malaltia. La identificació d'aquesta toxina i d'altres de similars permetrà establir si és el cas en tots els malalts d'ELA o si hi ha subtipus amb una major o menor incidència de l'entrada de la toxina.

Pel gènere *Veillonella*, tot i no ser significatiu, s'observa una tendència a augmentar, tant en el fenotip espinal com en el bulbar, respecte els controls sans. Un estudi va poder demostrar que membres d'aquest gènere tenen capacitat de convertir el lactat a propionat a través de la via succinat (Reichardt et al., 2014). Així doncs, un augment d'aquests bacteris comporta un augment dels nivells d'àcid propiònic, i així es demostra en l'anàlisi de regressió lineal pel fenotip bulbar entre l'abundància d'aquest bacteri i els nivells de l'àcid gras. A major abundància de *Veillonella* majors són els nivells d'àcid propiònic. No hi ha, a l'hora d'escriure aquesta discussió, dades prèvies sobre el possible paper de l'àcid propiònic en l'ELA. En models simples, s'ha demostrat que en les cèl·lules mare humanes, per exemple, l'àcid propiònic afavoreix la diferenciació glial mentre que l'àcid butíric fa desplaçar la diferenciació cap a un fenotip neuronal i millora el creixement de neurites. En ambdós casos tots dos AGCC actuen mitjançant el receptor GPR41 però activarien diferents vies de senyalització aigües avall (Abdelli et al., 2019).

Per últim, les abundàncies del gènere *Butyrivibrio* tot i no mostrar diferències significatives entre grups, en el fenotip bulbar s'observa una tendència a augmentar però no en l'ELA espinal, respecte els controls. El gènere *Butyrivibrio* inclou bacteris que fermenten la glucosa per tal de produir grans quantitats d'àcid butíric (Bryant & Small, 1956). Així doncs, l'augment d'aquest bacteri en els pacients d'ELA bulbar es correlaciona amb l'augment de l'àcid butíric obtingut en aquest treball present en aquest subtipus de pacients. Potencialment, com més abundància d'aquests bacteris es podrà fermentar més glucosa i augmentaran els nivells d'aquest àcid gras. Així es demostra en l'anàlisi de regressió lineal entre l'abundància d'aquest bacteri i els nivells de butíric. A major abundància de *Butyrivibrio* majors són els nivells d'aquest àcid gras. A més a més, es demostra un cop més que l'ELA espinal i l'ELA bulbar s'han de tractar i analitzar no com una sola malaltia ja que la disbiosi que presenten difereix l'una de l'altra. Cal recordar que segons troballes prèvies, s'ha demostrat que el butirat va restaurar l'homeòstasi intestinal, va millorar la integritat

intestinal i va disminuir significativament el nivell de cèl·lules de Paneth anormals, proporcionant una primera evidència important del potencial terapèutic del butirat en l'ELA, si més no en el model G93A (Y.-G. Zhang et al., 2017). Un segon estudi recent dels mateixos autors, publicat només com a *preprint* (Ogbu et al., 2022) va mostrar resultats similars, amb el butirat administrat es millorava els paràmetres funcionals en ratolins SOD1-G93A, en comparació amb els ratolins no tractats.

En quant a l'abundància de *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*, tot i no mostrar diferències significatives, es mostra una tendència a augmentar en els pacients amb ELA bulbar però no en l'ELA espinal, respecte els controls sans. Al 2003 en un estudi es va descriure aquesta nova espècie bacteriana al tracte gastrointestinal humà, gram negativa, anaeròbica i productora de butirat, que emprava una àmplia gamma de carbohidrats per fermentar-los per formar butirat però també succinat i lactat (Kopečný et al., 2003). Posteriorment es va associar a alteracions cognitives (Fongang et al., 2022; van Olst et al., 2021). Així doncs, un cop més, l'augment d'aquest bacteri en els pacients d'ELA bulbar es correlaciona amb l'augment de l'àcid butíric obtingut en aquest treball també en els pacients d'ELA bulbar, tal i com es demostra en l'anàlisi de regressió lineal. Es coneix molt poc dels mecanismes fisiopatològics a partir dels quals aquest microorganisme aportaria una modulació del risc de neurodegeneració.

Pel que fa a nivell d'espècie també es va analitzar l'abundància de *Blautia Wexlerae*. Els resultats obtinguts, tot i no ser significatius, mostren una tendència a augmentar en els pacients amb ELA bulbar però no en l'ELA espinal respecte els controls sans. *Blautia Wexlerae*, en persones sanes, s'associa de forma molt robusta a pèrdua de pes (Jie et al., 2021). Així doncs, aquest estudi ens ajuda a explicar l'augment d'aquesta espècie en els nostres pacients d'ELA bulbar. Els pacients amb aquest fenotip cursen amb disfàgia, i en conseqüència, la seva alimentació es veurà alterada contribuint de forma directa a la pèrdua de pes. En canvi, en l'ELA espinal aquesta espècie no es troba augmentada ja que aquests pacients, almenys en unes fases inicials, no semblen presentar una pèrdua de pes de forma tant accentuada.

Tot i que el càlcul de la diversitat d'espècies per l'índex Chao1 i Shannon tampoc mostra diferències significatives globalment es demostra l'alta diversitat dels resultats en els

diversos nivells taxonòmics, i que, resumidament, les poblacions implicades prèviament en la patogènesi de la malaltia poden mostrar certes relacions amb els nivells d'àcids grassos de cadena curta, reforçant la possible incidència del microbioma com a factor modificador de la malaltia. En particular, destacaria la diferència molt marcada entre les formes de tipus espinal amb les d'ELA bulbar. L'associació, però, no demostra causalitat, i establir si els canvis objectivats son causa o conseqüència de la malaltia (adaptacions nutricionals a la disfàgia, canvis en l'estil de vida, activitat física, hipermetabolisme), esdevé matèria de futurs estudis. Així mateix, el intentar extrapolar aquests resultats a poblacions més àmplies podrà resoldre el fet de si les diferències, que no assoleixen en molts cops la significació d'acord als criteris estadístics més estrictes, són consistents.

En quant a les limitacions del present treball destacaria la baixa mostra en la que estan realitzats els experiments en el model G93A. S'han realitzat diverses immunofluorescències i WB per tal d'analitzar una gran varietat de proteïnes, per aquest motiu no s'ha tingut la suficient disponibilitat de mostres per tal d'analitzar cada una d'aquestes proteïnes en diferents ratolins o inclús, de diferents edats. Per altra banda, no s'ha tingut present les variacions que poden estar lligades al sexe dels ratolins. En quant als experiments realitzats en les motoneurones derivades de pacients, hauria estat convenient analitzar totes les proteïnes en diferents línies de la mateixa mutació i també en una línia SOD1. Pel que fa a l'estadística, la quantificació del nombre d'agregats està realitzada amb el nombre total d'agregats trobats en totes les cèl·lules, i no solament en les motoneurones, es necessitaria realitzar una quantificació més acurada a nivell de motoneurona per acabar d'entendre l'agregació de totes les proteïnes analitzades en aquest tipus cel·lular.

Per altra banda, també cal destacar la poca mostra amb la que s'ha disposat per tal de realitzar els anàlisis de la microbiota i dels àcids grassos de cadena curta. Es necessitaria augmentar el nombre de mostres i també analitzar-ho en una cohort diferent de pacients per tal de poder validar els resultats obtinguts. A més, seria de gran rellevància tenir tota la informació clínica d'aquests pacients per poder establir més relacions entre la microbiota i la malaltia ja que en aquesta tesi no s'ha disposat de totes les dades en tots els pacients.









## **CONCLUSIONS**



# 7.

# CONCLUSIONS

En les condicions analitzades i tenint en compte les limitacions indicades, podem concloure que:

1. Es poden generar MN derivades de cèl·lules mare amb pluripotencialitat induïda amb alteracions gèniques en C9orf72 i FUS com a model d'agregació de proteïnes implicades en el metabolisme de l'ARN en el context de l'ELA.
2. Existeix una relació entre determinants moleculars de l'homeòstasi lipídica cel·lular i subcel·lular a MN humanes (SCP2/SCPx, FADS2, AGPS) i l'agregació patològica de proteïnes implicades prèviament com a tret característic de l'ELA (G3BP1 i TDP-43). Els canvis en la composició lipídica podrien interactuar directament amb l'estat de les proteïnes TDP-43 i G3BP1 podent afectar a la seva estructura i funció, a través de proporcionar un entorn favorable per l'agregació.
3. En MN, davant de disrupcions en l'homeòstasi lipídica cel·lular, es produeix una agregació de diferents proteïnes com ara Rab5/Rab7, SCP2/SCPx i AGPS, tant en el context d'un model preclínic basat en la transgènesi de SOD1-G93A com en les MN amb mutacions en C9orf72 i FUS, podent contribuir a la neurodegeneració. L'agregació de PKC $\beta$ II, PLC $\beta$ 1, FADS2 i PMP70 es produeix en el model SOD1-G93A i l'agregació de VAPA/VAPB es produeix únicament en el model motoneuronal, remarcant diferències interespecie.
4. Els canvis en determinants moleculars de l'homeòstasi lipídica, SCP2/SCPx i FADS2, juntament amb situacions d'estrès cel·lular es podrien associar a canvis en els contactes mitocondri/RE i al peroxisoma, objectivats a través de l'anàlisi de la quantitat de les proteïnes VAPA/VAPB. Una acumulació aberrant de les mateixes, juntament amb situacions d'estrès cel·lular podrien contribuir en la disfunció mitocondrial i a una acumulació de proteïnes en MN com ara Rab5/Rab7 i AGPS.

5. A nivell peroxisomal, es produeix una agregació d'AGPS en les motoneurons derivades de pacients C9orf72 i FUS. En situacions d'estrès cel·lular l'agregació també repercuteix en PMP70.
6. Els estressos relacionats amb la presència de peròxid d'hidrogen, sorbitol i ARN forà en les MN humanes, canvien la quantitat i la distribució subcel·lular de les diverses proteïnes implicades en l'homeòstasi lipídica de l'ARN de tal manera que les MN podrien respondre davant de l'estrès cel·lular modificant l'expressió de proteïnes relacionades amb l'homeòstasi lipídica per tal de protegir-se davant l'acumulació tòxica de lípids i en conseqüència, de la posterior agregació proteica, ambdós mecanismes implicats en la neurodegeneració.
7. En un estudi pilot cas-control existeixen alteracions associades a la malaltia en la microbiota intestinal, particularment en fílums, famílies i gèneres, podent contribuir a la susceptibilitat de les MN en l'ELA. Particularment, els pacients amb ELA de forma bulbar mostren determinants de la microbiota diferents als dels pacients de forma espinal.
8. Els àcids grassos de cadena curta analitzats -àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric- produïts per la microbiota, correlacionen amb l'abundància de diferents fílums, famílies i gèneres en mostres de pacients d'ELA i controls, fent plausible que la disbiosi associada a les diferents formes d'ELA podria interferir amb el possible paper protector d'algunes espècies de la microbiota.
9. Les alteracions al sistema nerviós central típiques de l'ELA i la durada de la malaltia s'associa a alteracions del microbioma intestinal, en forma de variacions en l'abundància de diferents bacteris. La potencial disbiosi podria estar jugant un paper modificador en la progressió de la malaltia, en base a la relació entre la durada de la malaltia i canvis en l'abundància de determinats taxons del microbioma.





The background of the page is a blue marbled paper with a complex, organic pattern of light and dark blue tones, resembling stone or water. A vertical black line runs down the right side of the page, and a horizontal black line runs across the middle, intersecting at the center of the text box.

## **BIBLIOGRAFIA**





## 8. BIBLIOGRAFIA:

- Abdelli, L. S., Samsam, A., & Naser, S. A. (2019). Propionic Acid Induces Gliosis and Neuroinflammation through Modulation of PTEN/AKT Pathway in Autism Spectrum Disorder. *Scientific Reports*, *9*(1), 8824. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45348-z>
- Abe, K., Aoki, M., Tsuji, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Togo, M., Hamada, C., Tanaka, M., Akimoto, M., Nakamura, K., Takahashi, F., Kondo, K., Yoshino, H., Abe, K., Aoki, M., Tsuji, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Togo, M., ... Yoshino, H. (2017). Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, *16*(7), 505–512. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30115-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30115-1)
- Abenavoli, L., Scarpellini, E., Colica, C., Boccuto, L., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Aiello, V., Romano, B., De Lorenzo, A., Izzo, A. A., & Capasso, R. (2019). Gut microbiota and obesity: A role for probiotics. *Nutrients*, *11*(11), 1–27. <https://doi.org/10.3390/nu11112690>
- Agola, J. O., Hong, L., Surviladze, Z., Ursu, O., Waller, A., Strouse, J. J., Simpson, D. S., Schroeder, C. E., Oprea, T. I., Golden, J. E., Aubé, J., Buranda, T., Sklar, L. A., & Wandinger-Ness, A. (2012). A competitive nucleotide binding inhibitor: In vitro characterization of Rab7 GTPase inhibition. *ACS Chemical Biology*, *7*(6), 1095–1108. <https://doi.org/10.1021/cb3001099>
- Agrawal, I., Lim, Y. S., Ng, S. Y., & Ling, S. C. (2022). Deciphering lipid dysregulation in ALS: from mechanisms to translational medicine. *Translational Neurodegeneration*, *11*(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00322-0>
- Ahmed, R. M., Highton-Williamson, E., Caga, J., Thornton, N., Ramsey, E., Zoing, M., Kim, W. S., Halliday, G. M., Piguet, O., Hodges, J. R., Farooqi, I. S., & Kiernan, M. C. (2017). Lipid Metabolism and Survival Across the Frontotemporal Dementia-Amyotrophic Lateral Sclerosis Spectrum: Relationships to Eating Behavior and Cognition. *Journal of Alzheimer's Disease*, *61*(2), 773–783. <https://doi.org/10.3233/JAD-170660>
- Akileshwari, C., Muthenna, P., Nastasijević, B., Joksić, G., Petrash, J. M., & Reddy, G. B. (2012). Inhibition of aldose reductase by *Gentiana lutea* extracts. *Experimental Diabetes Research*, *2012*, 147965. <https://doi.org/10.1155/2012/147965>
- Al-Chalabi, A., Fang, F., Hanby, M. F., Leigh, P. N., Shaw, C. E., Ye, W., & Rijdsdijk, F. (2010). An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *81*(12), 1324–1326. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.207464>
- Al-Chalabi, A., & Leigh, P. N. (2000). Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Current Opinion in Neurology*, *13*(4), 397–405. <https://doi.org/10.1097/00019052-200008000-00006>
- Al-Lahham, S. H., Peppelenbosch, M. P., Roelofsen, H., Vonk, R. J., & Venema, K. (2010). Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1801*(11), 1175–1183. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.07.007>

- Alami, N. H., Smith, R. B., Carrasco, M. A., Williams, L. A., Winborn, C. S., Han, S. S. W., Kiskinis, E., Winborn, B., Freibaum, B. D., Kanagaraj, A., Clare, A. J., Badders, N. M., Bilican, B., Chaum, E., Chandran, S., Shaw, C. E., Eggan, K. C., Maniatis, T., & Taylor, J. P. (2014). Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron*, *81*(3), 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.018>
- Alfahad, T., & Nath, A. (2013). Retroviruses and amyotrophic lateral sclerosis. *Antiviral Research*, *99*(2), 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.05.006>
- Als, C., Dafinca, R., Barbagallo, P., & Talbot, K. (2021). *The Role of Mitochondrial Dysfunction and ER Stress in TDP-43*. *15*(April), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.653688>
- Amick, J., Roczniak-Ferguson, A., & Ferguson, S. M. (2016). C9orf72 binds SMCR8, localizes to lysosomes, and regulates mTORC1 signaling. *Molecular Biology of the Cell*, *27*(20), 3040–3051. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0003>
- Andersen, P. M., Abrahams, S., Borasio, G. D., de Carvalho, M., Chio, A., Van Damme, P., Hardiman, O., Kollewe, K., Morrison, K. E., Petri, S., Pradat, P. F., Silani, V., Tomik, B., Wasner, M., & Weber, M. (2012). EFNS guidelines on the Clinical Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis (MALS) - revised report of an EFNS task force. *European Journal of Neurology*, *19*(3), 360–375. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03501.x>
- Andersen, P. M., & Al-Chalabi, A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: What do we really know? *Nature Reviews Neurology*, *7*(11), 603–615. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.150>
- Andreadou, E., Kapaki, E., Kokotis, P., Paraskevas, G. P., Katsaros, N., Libitaki, G., Petropoulou, O., Zis, V., Sfagos, C., & Vassilopoulos, D. (2008). Plasma glutamate and glycine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *In Vivo (Athens, Greece)*, *22*(1), 137–141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18396796>
- Andreadou, E., Kapaki, E., Kokotis, P., Paraskevas, G. P., Katsaros, N., Libitaki, G., Zis, V., Sfagos, C., & Vassilopoulos, D. (2008). Plasma glutamate and glycine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: The effect of riluzole treatment. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *110*(3), 222–226. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2007.10.018>
- Andrews, S. J., Ismail, Z., Anstey, K. J., & Mortby, M. (2018). Association of Alzheimer's genetic loci with mild behavioral impairment. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, *177*(8), 727–735. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32684>
- Andrews, W. D., Tuke, P. W., Al-Chalabi, A., Gaudin, P., Ijaz, S., Parton, M. J., & Garson, J. A. (2000). Detection of reverse transcriptase activity in the serum of patients with motor neurone disease. *Journal of Medical Virology*, *61*(4), 527–532. [https://doi.org/10.1002/1096-9071\(200008\)61:4<527::AID-JMV17>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1096-9071(200008)61:4<527::AID-JMV17>3.0.CO;2-A)
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida,

- M., Hashizume, Y., & Oda, T. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(3), 602–611. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.093>
- Arima, H., Omura, T., Hayasaka, T., Masaki, N., Hanada, M., Xu, D., Banno, T., Kobayashi, K., Takeuchi, H., Kadomatsu, K., Matsuyama, Y., & Setou, M. (2015). Reductions of docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine levels in the anterior horn of an ALS mouse model. *Neuroscience*, 297, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.060>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. Le, Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., ... Zeller, G. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Ash, P. E. A., Bieniek, K. F., Gendron, T. F., Caulfield, T., Lin, W.-L., DeJesus-Hernandez, M., van Blitterswijk, M. M., Jansen-West, K., Paul, J. W., Rademakers, R., Boylan, K. B., Dickson, D. W., & Petrucelli, L. (2013). Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron*, 77(4), 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.004>
- Atshaves, B P, Starodub, O., McIntosh, A., Petrescu, A., Roths, J. B., Kier, A. B., & Schroeder, F. (2000). Sterol carrier protein-2 alters high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36852–36861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003434200>
- Atshaves, Barbara P, Storey, S. M., & Schroeder, F. (2003). Sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x expression differentially alters fatty acid metabolism in L cell fibroblasts. *Journal of Lipid Research*, 44(9), 1751–1762. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300141-JLR200>
- Aulas, A., & Vande Velde, C. (2015). Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 423. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00423>
- Bai, J., Rodriguez, A. M., Melendez, J. A., & Cederbaum, A. I. (1999). Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26217–26224. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26217>
- Balendra, R., & Isaacs, A. M. (2018). C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nature Reviews. Neurology*, 14(9), 544–558. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0047-2>
- Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., & Rosen, M. K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(5), 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>

- Banasiewicz, T., Domagalska, D., Borycka-Kiciak, K., & Rydzewska, G. (2020). Determination of butyric acid dosage based on clinical and experimental studies—a literature review. *Przegląd Gastroenterologiczny*, *15*(2), 119–125. <https://doi.org/10.5114/pg.2020.95556>
- Barber, S. C., & Shaw, P. J. (2010). Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology and Medicine*, *48*(5), 629–641. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.018>
- Barbieri, M. A., Li, G., Colombo, M. I., & Stahl, P. D. (1994). Rab5, an early acting endosomal GTPase, supports in vitro endosome fusion without GTP hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(29), 18720–18722. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913465>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *80*(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Bäumer, D., Hilton, D., Paine, S. M. L., Turner, M. R., Lowe, J., Talbot, K., & Ansorge, O. (2010). Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations. *Neurology*, *75*(7), 611–618. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ed9cde>
- Beard, J. D., & Kamel, F. (2015). Military service, deployments, and exposures in relation to amyotrophic lateral sclerosis etiology and survival. *Epidemiologic Reviews*, *37*(1), 55–70. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxu001>
- Beaulieux, F., Zreik, Y., Deleage, C., Sauvinet, V., Legay, V., Giraudon, P., Kean, K. M., & Lina, B. (2005). Cumulative mutations in the genome of Echovirus 6 during establishment of a chronic infection in precursors of glial cells. *Virus Genes*, *30*(1), 103–112. <https://doi.org/10.1007/s11262-004-4587-8>
- Beh, B. K., Mohamad, N. E., Y, S. K., Ky, H., Boo, S. Y., Yi, J., Chu, H., Tan, S. W., Ho, W. Y., & Sharifuddin, S. A. (2017). *Anti-obesity and anti-inflammatory effects of synthetic acetic acid vinegar and Nipa vinegar on high-fat-diet-induced obese mice. September 2016*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06235-7>
- Bellmann, J., Monette, A., Tripathy, V., Sójka, A., Abo-Rady, M., Janosh, A., Bhatnagar, R., Bickle, M., Moulard, A. J., & Sternecker, J. (2019). Viral Infections Exacerbate FUS-ALS Phenotypes in iPSC-Derived Spinal Neurons in a Virus Species-Specific Manner. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 480. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00480>
- Belzil, V. V., Bauer, P. O., Prudencio, M., Gendron, T. F., Stetler, C. T., Yan, I. K., Preghent, L., Daugherty, L., Baker, M. C., Rademakers, R., Boylan, K., Patel, T. C., Dickson, D. W., & Petrucelli, L. (2013). Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood. *Acta Neuropathologica*, *126*(6), 895–905. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1199-1>
- Benedet, A. L., Ashton, N. J., Pascoal, T. A., Leuzy, A., Mathotaarachchi, S., Kang, M. S., Therriault, J.,

- Savard, M., Chamoun, M., Schöll, M., Zimmer, E. R., Gauthier, S., Labbe, A., Zetterberg, H., Blennow, K., & Neto, P. R. (2019). Plasma neurofilament light associates with Alzheimer's disease metabolic decline in amyloid-positive individuals. *Alzheimer's & Dementia (Amsterdam, Netherlands)*, *11*, 679–689. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2019.08.002>
- Bensimon, G., Lacomblez, L., & Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England Journal of Medicine*, *330*(9), 585–591. <https://doi.org/10.1056/NEJM199403033300901>
- Berger, M. M., Jia, X. Y., Legay, V., Aymard, M., Tilles, J. G., & Lina, B. (2004). Nutrition- and virus-induced stress represses the expression of manganese superoxide dismutase in vitro. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *229*(8), 843–849. <https://doi.org/10.1177/153537020422900818>
- Bilsland, L. G., Sahai, E., Kelly, G., Golding, M., Greensmith, L., & Schiavo, G. (2010). Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(47), 20523–20528. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006869107>
- BioRender. (n.d.). *BioRender Illustration Software*. <https://www.biorender.com/>
- Bissig, C., & Gruenberg, J. (2013). Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(10), a016816. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016816>
- Blacher, E., Bashiardes, S., Shapiro, H., Rothschild, D., Mor, U., Dori-Bachash, M., Kleimeyer, C., Moresi, C., Harnik, Y., Zur, M., Zabari, M., Brik, R. B. Z., Kviatcovsky, D., Zmora, N., Cohen, Y., Bar, N., Levi, I., Amar, N., Mehlman, T., ... Elinav, E. (2019). Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice. *Nature*, *572*(7770), 474–480. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1443-5>
- Black, M. M. (2016). Axonal transport: The orderly motion of axonal structures. *Methods in Cell Biology*, *131*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.06.001>
- Bláhová, Z., Harvey, T. N., Pšenička, M., & Mráz, J. (2020). Assessment of Fatty Acid Desaturase (Fads2) Structure-Function Properties in Fish in the Context of Environmental Adaptations and as a Target for Genetic Engineering. *Biomolecules*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020206>
- Bloemen, J. G., Venema, K., Poll, M. C. Van De, Olde, S. W., Buurman, W. A., & Dejong, C. H. (2009). Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery q. *Clinical Nutrition*, *28*(6), 657–661. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.05.011>
- Boddy, S. L., Giovannelli, I., Sassani, M., Cooper-Knock, J., Snyder, M. P., Segal, E., Elinav, E., Barker, L. A., Shaw, P. J., & McDermott, C. J. (2021). The gut microbiome: a key player in the complexity of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *BMC Medicine*, *19*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01885-3>

- Bodega, G., Alique, M., Puebla, L., Carracedo, J., & Ramírez, R. M. (2019). Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. *Journal of Extracellular Vesicles*, *8*(1), 1626654. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1626654>
- Boeynaems, S., Bogaert, E., Kovacs, D., Konijnenberg, A., Timmerman, E., Volkov, A., Guharoy, M., De Decker, M., Jaspers, T., Ryan, V. H., Janke, A. M., Baatsen, P., Vercruyse, T., Kolaitis, R.-M., Daelemans, D., Taylor, J. P., Kedersha, N., Anderson, P., Impens, F., ... Van Den Bosch, L. (2017). Phase Separation of C9orf72 Dipeptide Repeats Perturbs Stress Granule Dynamics. *Molecular Cell*, *65*(6), 1044-1055.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.013>
- Bogdanov, M., Brown, R. H., Matson, W., Smart, R., Hayden, D., O'Donnell, H., Flint Beal, M., & Cudkovicz, M. (2000). Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radical Biology and Medicine*, *29*(7), 652–658. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00349-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00349-X)
- Borgese, N., Iacomino, N., Colombo, S. F., & Navone, F. (2021). The Link between VAPB Loss of Function and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/cells10081865>
- Bos, I. W. M., Hoogland, G., Meine Jansen, C. F., Van Willigen, G., Spierenburg, H. A., Van Den Berg, L. H., & De Graan, P. N. E. (2006). Increased glutamine synthetase but normal EAAT2 expression in platelets of ALS patients. *Neurochemistry International*, *48*(4), 306–311. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.09.009>
- Bosc, C., Broin, N., Fanjul, M., Saland, E., Farge, T., Courdy, C., Batut, A., Masoud, R., Larrue, C., Skuli, S., Espagnol, N., Pagès, J. C., Carrier, A., Bost, F., Bertrand-Michel, J., Tamburini, J., Récher, C., Bertoli, S., Mansat-De Mas, V., ... Joffre, C. (2020). Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nature Communications*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17882-2>
- Bosco, D. A., Lemay, N., Ko, H. K., Zhou, H., Burke, C., Kwiatkowski, T. J., Sapp, P., McKenna-Yasek, D., Brown, R. H., & Hayward, L. J. (2010). Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Human Molecular Genetics*, *19*(21), 4160–4175. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq335>
- Boxer, A. L., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Baker, M., Seeley, W. W., Crook, R., Feldman, H., Hsiung, G.-Y. R., Rutherford, N., Laluz, V., Whitwell, J., Foti, D., McDade, E., Molano, J., Karydas, A., Wojtas, A., Goldman, J., Mirsky, J., Sengdy, P., ... Rademakers, R. (2011). Clinical, neuroimaging and neuropathological features of a new chromosome 9p-linked FTD-ALS family. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *82*(2), 196–203. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.204081>
- Bozzoni, V., Pansarasa, O., Diamanti, L., Nosari, G., Cereda, C., & Ceroni, M. (2016). Amyotrophic lateral sclerosis and environmental factors. *Functional Neurology*, *31*(1), 7–19. <https://doi.org/10.11138/fneur/2016.31.1.007>
- Bradley, W. G., Borenstein, A. R., Nelson, L. M., Codd, G. A., Rosen, B. H., Stommel, E. W., & Cox, P. A. (2013). Is exposure to cyanobacteria an environmental risk factor for amyotrophic lateral

- sclerosis and other neurodegenerative diseases? *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 14(5–6), 325–333. <https://doi.org/10.3109/21678421.2012.750364>
- Braiterman, L. T., Zheng, S., Watkins, P. A., Geraghty, M. T., Johnson, G., McGuinness, M. C., Moser, A. B., & Smith, K. D. (1998). Suppression of peroxisomal membrane protein defects by peroxisomal ATP binding cassette (ABC) proteins. *Human Molecular Genetics*, 7(2), 239–247. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.2.239>
- Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*, 45(7–8), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>
- Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1442–1452. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2012.05.008>
- Brenner, D., Hiergeist, A., Adis, C., Mayer, B., Gessner, A., Ludolph, A. C., & Weishaupt, J. H. (2018). The fecal microbiome of ALS patients. *Neurobiology of Aging*, 61, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.023>
- Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., & Munsat, T. L. (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders : Official Publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, 1(5), 293–299. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11464847>
- Brotman, R. G., Moreno-Escobar, M. C., Joseph, J., & Pawar, G. (2022). Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310611>
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 377(2), 162–172. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1603471>
- Bruijn, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sisodia, S. S., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Price, D. L., & Cleveland, D. W. (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, 18(2), 327–338. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80272-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80272-x)
- Bryant, M. P., & Small, N. (1956). The anaerobic monotrichous butyric acid-producing curved rod-shaped bacteria of the rumen. *Journal of Bacteriology*, 72(1), 16–21. <https://doi.org/10.1128/jb.72.1.16-21.1956>
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., & Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 70(5), 715–728. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90306-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90306-w)
- Buchan, J. R. (2014). mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease. *RNA Biology*, 11(8), 1019–1030. <https://doi.org/10.4161/15476286.2014.972208>
- Buchan, J. R., Kolaitis, R.-M., Taylor, J. P., & Parker, R. (2013). Eukaryotic stress granules are cleared



- by autophagy and Cdc48/VCP function. *Cell*, 153(7), 1461–1474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.037>
- Bunton-Stasyshyn, R. K. A., Saccon, R. A., Fratta, P., & Fisher, E. M. C. (2015). SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. *Neuroscientist*, 21(5), 519–529. <https://doi.org/10.1177/1073858414561795>
- Burberry, A., Suzuki, N., Wang, J.-Y., Moccia, R., Mordes, D. A., Stewart, M. H., Suzuki-Uematsu, S., Ghosh, S., Singh, A., Merkle, F. T., Koszka, K., Li, Q.-Z., Zon, L., Rossi, D. J., Trowbridge, J. J., Notarangelo, L. D., & Eggan, K. (2016). Loss-of-function mutations in the C9ORF72 mouse ortholog cause fatal autoimmune disease. *Science Translational Medicine*, 8(347), 347ra93. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6038>
- Burberry, A., Wells, M. F., Limone, F., Couto, A., Smith, K. S., Keaney, J., Gillet, G., van Gastel, N., Wang, J.-Y., Pietilainen, O., Qian, M., Eggan, P., Cantrell, C., Mok, J., Kadiu, I., Scadden, D. T., & Eggan, K. (2020). C9orf72 suppresses systemic and neural inflammation induced by gut bacteria. *Nature*, 582(7810), 89–94. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2288-7>
- Cabukusta, B., Berlin, I., van Elsland, D. M., Forkink, I., Spits, M., de Jong, A. W. M., Akkermans, J. J. L. L., Wijdeven, R. H. M., Janssen, G. M. C., van Veelen, P. A., & Neefjes, J. (2020). Human VAPome Analysis Reveals MOSPD1 and MOSPD3 as Membrane Contact Site Proteins Interacting with FFAT-Related FFNT Motifs. *Cell Reports*, 33(10), 108475. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108475>
- Cacabelos, D., Ayala, V., Granado-Serrano, A. B., Jové, M., Torres, P., Boada, J., Cabré, R., Ramírez-Núñez, O., Gonzalo, H., Soler-Cantero, A., Serrano, J. C. E., Bellmunt, M. J., Romero, M. P., Motilva, M. J., Nonaka, T., Hasegawa, M., Ferrer, I., Pamplona, R., & Portero-Otín, M. (2016). Interplay between TDP-43 and docosahexaenoic acid-related processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 88, 148–160. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.01.007>
- Caller, T. A., Doolin, J. W., Haney, J. F., Murby, A. J., West, K. G., Farrar, H. E., Ball, A., Harris, B. T., & Stommel, E. W. (2009). A cluster of amyotrophic lateral sclerosis in New Hampshire: a possible role for toxic cyanobacteria blooms. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 10 Suppl 2, 101–108. <https://doi.org/10.3109/17482960903278485>
- Carelli, L., Solca, F., Faini, A., Madotto, F., Lafronza, A., Monti, A., Zago, S., Doretto, A., Ciammola, A., Ticozzi, N., Silani, V., & Poletti, B. (2018). The Complex Interplay Between Depression/Anxiety and Executive Functioning: Insights From the ECAS in a Large ALS Population. *Frontiers in Psychology*, 9, 450. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00450>
- Carrasco, S., & Mérida, I. (2007). Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.004>
- Carri, M. T., Valle, C., Bozzo, F., & Cozzolino, M. (2015). Oxidative stress and mitochondrial damage : importance in non-SOD1 ALS. 9(February), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00041>

- Carriedo, S. G., 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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(1), 240–250. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627601>
- Casani-Cubel, J., Benlloch, M., Sanchis-Sanchis, C. E., Marin, R., Lajara-Romance, J. M., & de la Rubia Orti, J. E. (2021). The Impact of Microbiota on the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis and the Possible Benefits of Polyphenols. An Overview. *Metabolites*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/metabo11020120>
- Castillo-Álvarez, F., & Marzo-Sola, M. E. (2022). Role of the gut microbiota in the development of various neurological diseases. *Neurologia*, 37(6), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2019.03.017>
- Ceresa, B. P., & Bahr, S. J. (2006). rab7 activity affects epidermal growth factor: Epidermal growth factor receptor degradation by regulating endocytic trafficking from the late endosome. *Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 1099–1106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504175200>
- Cermelli, C., Vinceti, M., Beretti, F., Pietrini, V., Nacci, G., Pietrosevoli, P., Bartoletti, A., Guidetti, D., Sola, P., Bergomi, M., Vivoli, G., & Portolani, M. (2003). Risk of sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with seropositivity for herpesviruses and echovirus-7. *European Journal of Epidemiology*, 18(2), 123–127. <https://doi.org/10.1023/A:1023067728557>
- Chambers, E. S., Preston, T., Frost, G., & Morrison, D. J. (2018). Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Current Nutrition Reports*, 7(4), 198–206. <https://doi.org/10.1007/s13668-018-0248-8>
- Chang, C.-Y., Ting, H.-C., Su, H.-L., & Jeng, J.-R. (2018). Combining Induced Pluripotent Stem Cells and Genome Editing Technologies for Clinical Applications. *Cell Transplantation*, 27(3), 379–392. <https://doi.org/10.1177/0963689718754560>
- Chang, C. Y., Ting, H. C., Liu, C. A., Su, H. L., Chiou, T. W., Harn, H. J., & Lin, S. Z. (2018). Induced Pluripotent Stem Cells: A Powerful Neurodegenerative Disease Modeling Tool for Mechanism Study and Drug Discovery. *Cell Transplantation*, 27(11), 1588–1602. <https://doi.org/10.1177/0963689718775406>
- Chaudhry, R., Mishra, B., Dhawan, B., & Sharma, N. (1999). Clinical spectrum of bacteroidaceae in a tertiary care hospital. *The Journal of Communicable Diseases*, 31(3), 169–172. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10916612>
- Chaves-Filho, A. B., Pinto, I. F. D., Dantas, L. S., Xavier, A. M., Inague, A., Faria, R. L., Medeiros, M. H. G., Glezer, I., Yoshinaga, M. Y., & Miyamoto, S. (2019). Alterations in lipid metabolism of spinal cord linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, 9(1), 11642. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48059-7>
- Chen, C.-S., Yao, Y.-C., Lin, S.-C., Lee, Y.-P., Wang, Y.-F., Wang, J.-R., Liu, C.-C., Lei, H.-Y., & Yu, C.-K. (2007). Retrograde Axonal Transport: a Major Transmission Route of Enterovirus 71 in Mice.

- Journal of Virology*, 81(17), 8996–9003. <https://doi.org/10.1128/jvi.00236-07>
- Chen, C., Ding, X., Akram, N., Xue, S., & Luo, S. Z. (2019). Fused in sarcoma: Properties, self-assembly and correlation with neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules24081622>
- Chen, W. ju L., Anderson, J. W., & Jennings, D. (1984). Propionate May Mediate the Hypocholesterolemic Effects of Certain Soluble Plant Fibers in Cholesterol-Fed Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 175(2), 215–218. <https://doi.org/10.3181/00379727-175-41791>
- Chen, Y., Yang, M., Deng, J., Chen, X., Ye, Y., Zhu, L., Liu, J., Ye, H., Shen, Y., Li, Y., Rao, E. J., Fushimi, K., Zhou, X., Bigio, E. H., Mesulam, M., Xu, Q., & Wu, J. Y. (2011). Expression of human FUS protein in *Drosophila* leads to progressive neurodegeneration. *Protein and Cell*, 2(6), 477–486. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1065-7>
- Chen, Z., Maqbool, J., Sajid, F., Hussain, G., & Sun, T. (2021). Human gut microbiota and its association with pathogenesis and treatments of neurodegenerative diseases. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104675. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104675>
- Cheng, Y. S., & Xu, F. (2010). Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology and Therapy*, 10(12), 1219–1223. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.12.13450>
- Chidambaram, S. B., Essa, M. M., Rathipriya, A. G., Bishir, M., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., Tousif, A. H., Sakharkar, M. K., Kashyap, R. S., Friedland, R. P., & Monaghan, T. M. (2022). Gut dysbiosis, defective autophagy and altered immune responses in neurodegenerative diseases: Tales of a vicious cycle. *Pharmacology & Therapeutics*, 231, 107988. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107988>
- Chin, A. I., Miyahira, A. K., Covarrubias, A., Teague, J., Guo, B., Dempsey, P. W., & Cheng, G. (2010). Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. *Cancer Research*, 70(7), 2595–2603. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1162>
- Chiò, A., Mazzini, L., & Mora, G. (2020). Disease-modifying therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology*, 167, 107986. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107986>
- Choi, D. W. (1994). Chapter 6 Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Progress in Brain Research*, 100(C), 47–51. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)60767-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60767-0)
- Chytrova, G., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2010). Exercise contributes to the effects of DHA dietary supplementation by acting on membrane-related synaptic systems. *Brain Research*, 1341, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.018>
- Cid, C., Alvarez-Cermeño, J. C., Regidor, I., Salinas, M., & Alcazar, A. (2003). Low concentrations of glutamate induce apoptosis in cultured neurons: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 206(1), 91–95. <https://doi.org/10.1016/S0022->

510X(02)00339-8

- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, *131*(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Clark, B. J. (2012). The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. *Journal of Endocrinology*, *212*(3), 257–275. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0313>
- Cockcroft, S., & Raghu, P. (2018). Phospholipid transport protein function at organelle contact sites. *Current Opinion in Cell Biology*, *53*, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.04.011>
- Colles, S. M., Woodford, J. K., Moncecchi, D., Myers-Payne, S. C., McLean, L. R., Billheimer, J. T., & Schroeder, F. (1995). Cholesterol interaction with recombinant human sterol carrier protein-2. *Lipids*, *30*(9), 795–803. <https://doi.org/10.1007/BF02533954>
- Cooper, K. E., Blähser, S., Malkinson, T. J., Merker, G., Roth, J., & Zeisberger, E. (1988). Changes in body temperature and vasopressin content of brain neurons, in pregnant and non-pregnant guinea pigs, during fevers produced by Poly I : Poly C. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, *412*(3), 292–296. <https://doi.org/10.1007/BF00582511>
- Corona, Juan C, Tovar-y-Romo, L. B., & Tapia, R. (2007). Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *11*(11), 1415–1428. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.11.1415>
- Corona, Juan Carlos, & Tapia, R. (2007). Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors and intracellular Ca<sup>2+</sup> determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo. *Neuropharmacology*, *52*(5), 1219–1228. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.12.008>
- Cruz-Morales, P., Orellana, C. A., Moutafis, G., Moonen, G., Rincon, G., Nielsen, L. K., & Marcellin, E. (2019). Revisiting the Evolution and Taxonomy of Clostridia, a Phylogenomic Update. *Genome Biology and Evolution*, *11*(7), 2035–2044. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz096>
- Cryan, J F, & O'Mahony, S. M. (2011). The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *23*(3), 187–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01664.x>
- Cryan, John F, O'Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V, Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cusotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V, Guzzetta, K. E., Jaggard, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., ... Dinan, T. G. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews*, *99*(4), 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- Cunha-Oliveira, T., Montezinho, L., Mendes, C., Firuzi, O., Saso, L., Oliveira, P. J., & Silva, F. S. G. (2020). Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Pathophysiology and Opportunities for Pharmacological Intervention. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*, 5021694. <https://doi.org/10.1155/2020/5021694>
- Da Cruz, S., & Cleveland, D. W. (2011). Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and

- beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(6), 904–919. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2011.05.029>
- Dafinca, R., Scaber, J., Ababneh, N., Lalic, T., Weir, G., Christian, H., Vowles, J., Douglas, A. G. L., Fletcher-Jones, A., Browne, C., Nakanishi, M., Turner, M. R., Wade-Martins, R., Cowley, S. A., & Talbot, K. (2016). C9orf72 Hexanucleotide Expansions Are Associated with Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Stress Granule Formation in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Demen. *Stem Cells*, 34(8), 2063–2078. <https://doi.org/10.1002/stem.2388>
- Dal Canto, M. C., & Gurney, M. E. (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 Research*, 676(1), 25–40. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00063-v](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00063-v)
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65(1), 1–105. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00067-8)
- Dave, K. R., Raval, A. P., Purroy, J., Kirkinetzos, I. G., Moraes, C. T., Bradley, W. G., & Pérez-Pinzón, M. A. (2005). Aberrant deltaPKC activation in the spinal cord of Wobbler mouse: a model of motor neuron disease. *Neurobiology of Disease*, 18(1), 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.08.017>
- Davidson, Y., Robinson, A. C., Liu, X., Wu, D., Troakes, C., Rollinson, S., Masuda-Suzukake, M., Suzuki, G., Nonaka, T., Shi, J., Tian, J., Hamdalla, H., Ealing, J., Richardson, A., Jones, M., Pickering-Brown, S., Snowden, J. S., Hasegawa, M., & Mann, D. M. A. (2016). Neurodegeneration in frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9orf72 is linked to TDP-43 pathology and not associated with aggregated forms of dipeptide repeat proteins. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 42(3), 242–254. <https://doi.org/10.1111/nan.12292>
- de Boer, E. M. J., Orie, V. K., Williams, T., Baker, M. R., De Oliveira, H. M., Polvikoski, T., Silsby, M., Menon, P., van den Bos, M., Halliday, G. M., van den Berg, L. H., Van Den Bosch, L., van Damme, P., Kiernan, M. C., van Es, M. A., & Vucic, S. (2020). TDP-43 proteinopathies: a new wave of neurodegenerative diseases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-322983>
- de Jong, S. W., Huisman, M. H. B., Sutedja, N. A., van der Kooij, A. J., de Visser, M., Schelhaas, H. J., Fischer, K., Veldink, J. H., & van den Berg, L. H. (2012). Smoking, alcohol consumption, and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *American Journal of Epidemiology*, 176(3), 233–239. <https://doi.org/10.1093/aje/kws015>
- De Vos, K. J., Chapman, A. L., Tennant, M. E., Manser, C., Tudor, E. L., Lau, K.-F., Brownlees, J., Ackerley, S., Shaw, P. J., McLoughlin, D. M., Shaw, C. E., Leigh, P. N., Miller, C. C. J., & Grierson, A. J. (2007). Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Human Molecular Genetics*, 16(22), 2720–2728. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm226>

- De Vos, K. J., & Hafezparast, M. (2017). Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: Opportunities for translational research? *Neurobiology of Disease*, *105*, 283–299. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.02.004>
- De Weirdt, R., & Van De Wiele, T. (2015). Micromanagement in the gut: Microenvironmental factors govern colon mucosal biofilm structure and functionality. *Npj Biofilms and Microbiomes*, *1*(June), 1–6. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.26>
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.-Y. R., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., ... Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, *72*(2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>
- Deleu, S., Machiels, K., Raes, J., Verbeke, K., & Vermeire, S. (2021). Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD? *EBioMedicine*, *66*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103293>
- Delille, H. K., Bonekamp, N. A., & Schrader, M. (2006). Peroxisomes and disease - an overview. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, *2*(4), 308–314. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674998>
- Delwiche, E. A., Pestka, J. J., & Tortorello, M. L. (1985). The veillonellae: gram-negative cocci with a unique physiology. *Annual Review of Microbiology*, *39*, 175–193. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.39.100185.001135>
- Demigné, C., Morand, C., Levrat, M. A., Besson, C., Moundras, C., & Rémésy, C. (1995). Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *The British Journal of Nutrition*, *74*(2), 209–219. <https://doi.org/10.1079/bjn19950124>
- Deng, H., Gao, K., & Jankovic, J. (2014). The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology*, *10*(6), 337–348. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.78>
- Desport, J. C., Torny, F., Lacoste, M., Preux, P. M., & Couratier, P. (2006). Hypermetabolism in ALS: Correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neurodegenerative Diseases*, *2*(3–4), 202–207. <https://doi.org/10.1159/000089626>
- Destombes, J., Couderc, T., Thiesson, D., Girard, S., Wilt, S. G., & Blondel, B. (1997). Persistent poliovirus infection in mouse motoneurons. *Journal of Virology*, *71*(2), 1621–1628. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.2.1621-1628.1997>
- Di Gioia, D., Bozzi Cionci, N., Baffoni, L., Amoruso, A., Pane, M., Mogna, L., Gaggia, F., Lucenti, M. A., Bersano, E., Cantello, R., De Marchi, F., & Mazzini, L. (2020). A prospective longitudinal study on the microbiota composition in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Medicine*, *18*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01607-9>

- Di Sabatino, A., Morera, R., Ciccocioppo, R., Cazzola, P., Gotti, S., Tinozzi, F. P., Tinozzi, S., & Corazza, G. R. (2005). Oral butyrate for mildly to moderately active Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22(9), 789–794. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02639.x>
- Donnelly, C. J., Zhang, P.-W., Pham, J. T., Haeusler, A. R., Heusler, A. R., Mistry, N. A., Vidensky, S., Daley, E. L., Poth, E. M., Hoover, B., Fines, D. M., Maragakis, N., Tienari, P. J., Petrucelli, L., Traynor, B. J., Wang, J., Rigo, F., Bennett, C. F., Blackshaw, S., ... Rothstein, J. D. (2013). RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron*, 80(2), 415–428. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.015>
- Dorst, J., Kühnlein, P., Hendrich, C., Kassubek, J., Sperfeld, A. D., & Ludolph, A. C. (2011). Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 258(4), 613–617. <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5805-z>
- Dorst, Johannes, Cypionka, J., & Ludolph, A. C. (2013). High-caloric food supplements in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: A prospective interventional study. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 14(7–8), 533–536. <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.823999>
- Doucette, P. A., Whitson, L. J., Cao, X., Schirf, V., Demeler, B., Valentine, J. S., Hansen, J. C., & Hart, P. J. (2004). Dissociation of human copper-zinc superoxide dismutase dimers using chaotrope and reductant. Insights into the molecular basis for dimer stability. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54558–54566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409744200>
- Drouet, A., Desjeux, G., Balaire, C., & Thevenin-Garron, V. (2010). [Retrospective study of ALS in French military personnel]. *Revue Neurologique*, 166(6–7), 621–629. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2010.01.004>
- Du, Z.-W., Chen, H., Liu, H., Lu, J., Qian, K., Huang, C.-L., Zhong, X., Fan, F., & Zhang, S.-C. (2015). Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nature Communications*, 6, 6626. <https://doi.org/10.1038/ncomms7626>
- Dudás, E. F., Huynen, M. A., Lesk, A. M., & Pastore, A. (2021). Invisible leashes: The tethering VAPs from infectious diseases to neurodegeneration. *The Journal of Biological Chemistry*, 296, 100421. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100421>
- Duker, A. L., Niiler, T., Eldridge, G., Brereton, N. H., Braverman, N. E., & Bober, M. B. (2017). Growth charts for individuals with rhizomelic chondrodysplasia punctata. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 173(1), 108–113. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37961>
- Dupuis, L., Oudart, H., René, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L., & Loeffler, J.-P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 11159–11164. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402026101>

- Elia, A. E., Lalli, S., Monsurrò, M. R., Sagnelli, A., Taiello, A. C., Reggiori, B., La Bella, V., Tedeschi, G., & Albanese, A. (2016). Tauroursodeoxycholic acid in the treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neurology*, 23(1), 45–52. <https://doi.org/10.1111/ene.12664>
- Engl, E., & Attwell, D. (2015). Non-signalling energy use in the brain. *Journal of Physiology*, 593(16), 3417–3429. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.282517>
- Ezzi, S. A., Urushitani, M., & Julien, J.-P. (2007). Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *Journal of Neurochemistry*, 102(1), 170–178. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04531.x>
- Faenza, I., Blalock, W., Bavelloni, A., Schoser, B., Fiume, R., Pacella, S., Piazzini, M., D'Angelo, A., & Cocco, L. (2012). A role for PLC $\beta$ 1 in myotonic dystrophies type 1 and 2. *The FASEB Journal*, 26(7), 3042–3048. <https://doi.org/10.1096/fj.11-200337>
- Fang, P., Kazmi, S. A., Jameson, K. G., & Hsiao, E. Y. (2020). The Microbiome as a Modifier of Neurodegenerative Disease Risk. *Cell Host & Microbe*, 28(2), 201–222. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.008>
- Fang, X., Wang, X., Yang, S., Meng, F., Wang, X., Wei, H., & Chen, T. (2016). Evaluation of the microbial diversity in amyotrophic lateral sclerosis using high-throughput sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01479>
- Fardini, Y., Wang, X., Témoins, S., Nithianantham, S., Lee, D., Shoham, M., & Han, Y. W. (2011). Fusobacterium nucleatum adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Molecular Microbiology*, 82(6), 1468–1480. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07905.x>
- Ferdinandusse, S., Denis, S., Faust, P. L., & Wanders, R. J. A. (2009). Bile acids: the role of peroxisomes. *Journal of Lipid Research*, 50(11), 2139–2147. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900009-JLR200>
- Ferdinandusse, S., Jimenez-Sanchez, G., Koster, J., Denis, S., Van Roermund, C. W., Silva-Zolezzi, I., Moser, A. B., Visser, W. F., Gulluoglu, M., Durmaz, O., Demirkol, M., Waterham, H. R., Gökçay, G., Wanders, R. J. A., & Valle, D. (2015). A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3. *Human Molecular Genetics*, 24(2), 361–370. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu448>
- Fernández-Eulate, G., Ruiz-Sanz, J. I., Riancho, J., Zufiría, M., Gereñu, G., Fernández-Torrón, R., Poza-Aldea, J. J., Ondaro, J., Espinal, J. B., González-Chinchón, G., Zulaica, M., Ruiz-Larrea, M. B., López De Munain, A., & Gil-Bea, F. J. (2020). A comprehensive serum lipidome profiling of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 21(3–4), 252–262. <https://doi.org/10.1080/21678421.2020.1730904>
- Ferrante, R. J., Browne, S. E., Shinobu, L. A., Bowling, A. C., Baik, M. J., MacGarvey, U., Kowall, N. W., Brown, R. H., & Beal, M. F. (1997). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and



- familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 69(5), 2064–2074. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69052064.x>
- Ferrarese, C., Sala, G., Riva, R., Begni, B., Zoia, C., Tremolizzo, L., Galimberti, G., Millul, A., Bastone, A., Mennini, T., Balzarini, C., Frattola, L., Beghi, E., Micheli, A., Moretto, G., Caponnetto, C., Ceroni, M., Alimonti, D., Siciliano, G., ... Carvelli, L. (2001). Decreased platelet glutamate uptake in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 56(2), 270–272. <https://doi.org/10.1212/WNL.56.2.270>
- Flier, J. S., Underhill, L. H., Greene, D. A., Lattimer, S. A., & Sima, A. A. F. (1987). Sorbitol, Phosphoinositides, and Sodium-Potassium-ATPase in the Pathogenesis of Diabetic Complications. *New England Journal of Medicine*, 316(10), 599–606. <https://doi.org/10.1056/nejm198703053161007>
- Fongang, B., Satizabal, C. L., Kautz, T. F., Nguongo, Y. W., SherraeMuhammad, J. A., Vasquez, E., Mathews, J., Goss, M., Saklad, A. R., Himali, J., Beiser, A., Cavazos, J. E., Mahaney, M. C., Maestre, G., DeCarli, C., Shipp, E. L., Vasan, R. S., & Seshadri, S. (2022). Cerebral Small Vessel Disease Burden is Associated with Decreased Abundance of Gut *Barnesiella* intestinihominis Bacterium in the Framingham Heart Study. *BioRxiv*, 2022.09.27.509283. <http://biorxiv.org/content/early/2022/09/28/2022.09.27.509283.abstract>
- Foran, E., & Trotti, D. (2009). Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(7), 1587–1602. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2444>
- Forano, E., Delort, A. M., & Matulova, M. (2008). Carbohydrate metabolism in *Fibrobacter succinogenes*: What NMR tells us. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20(2), 94–102. <https://doi.org/10.1080/08910600802106517>
- Forsberg, K., Andersen, P. M., Marklund, S. L., & Brännström, T. (2011). Glial nuclear aggregates of superoxide dismutase-1 are regularly present in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 121(5), 623–634. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0805-3>
- Fra, A. M., Fagioli, C., Finazzi, D., Sitia, R., & Alberini, C. M. (1993). Quality control of ER synthesized proteins: An exposed thiol group as a three-way switch mediating assembly, retention and degradation. *EMBO Journal*, 12(12), 4755–4761. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06164.x>
- Franco, M. C., Dennys, C. N., Rossi, F. H., & Estévez, A. G. (2013). Superoxide Dismutase and Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Advances in Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 141–158.
- Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., Apanasets, O., & Van Veldhoven, P. P. (2013). Aging, age-related diseases and peroxisomes. *Sub-Cellular Biochemistry*, 69, 45–65. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6889-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6889-5_3)
- Freibaum, B. D., Lu, Y., Lopez-Gonzalez, R., Kim, N. C., Almeida, S., Lee, K.-H., Badders, N., Valentine,

- M., Miller, B. L., Wong, P. C., Petrucelli, L., Kim, H. J., Gao, F.-B., & Taylor, J. P. (2015). GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature*, *525*(7567), 129–133. <https://doi.org/10.1038/nature14974>
- Freistadt, M. S., & Eberle, K. E. (1996). Correlation between poliovirus type 1 Mahoney replication in blood cells and neurovirulence. *Journal of Virology*, *70*(9), 6486–6492. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.9.6486-6492.1996>
- Frisk, G. (2001). Mechanisms of chronic enteroviral persistence in tissue. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *14*(3), 251–256. <https://doi.org/10.1097/00001432-200106000-00002>
- Frolov, A., Woodford, J. K., Murphy, E. J., Billheimer, J. T., & Schroeder, F. (1996). Spontaneous and protein-mediated sterol transfer between intracellular membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(27), 16075–16083. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.16075>
- Fujii, R., Okabe, S., Urushido, T., Inoue, K., Yoshimura, A., Tachibana, T., Nishikawa, T., Hicks, G. G., & Takumi, T. (2005). The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology. *Current Biology: CB*, *15*(6), 587–593. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.058>
- Fumagalli, E., Funicello, M., Rauen, T., Gobbi, M., & Mennini, T. (2008). Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *European Journal of Pharmacology*, *578*(2–3), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.10.023>
- Fushimi, T., Tayama, K., Fukaya, M., Kitakoshi, K., Nakai, N., Tsukamoto, Y., & Sato, Y. (2001). Acetic Acid Feeding Enhances Glycogen Repletion in Liver and Skeletal Muscle of Rats. *The Journal of Nutrition*, *131*(7), 1973–1977. <https://doi.org/10.1093/JN/131.7.1973>
- Galano, M., Venugopal, S., & Papadopoulos, V. (2022). Role of STAR and SCP2/SCPx in the Transport of Cholesterol and Other Lipids. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012115>
- Gami, P., Murray, C., Schottlaender, L., Bettencourt, C., De Pablo Fernandez, E., Mudanohwo, E., Mizielińska, S., Polke, J. M., Holton, J. L., Isaacs, A. M., Houlden, H., Revesz, T., & Lashley, T. (2015). A 30-unit hexanucleotide repeat expansion in C9orf72 induces pathological lesions with dipeptide-repeat proteins and RNA foci, but not TDP-43 inclusions and clinical disease. *Acta Neuropathologica*, *130*(4), 599–601. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1473-5>
- Gao, J., Wang, L., Huntley, M. L., Perry, G., & Wang, X. (2018). Pathomechanisms of TDP-43 in neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, *146*(1), 7–20. <https://doi.org/10.1111/jnc.14327>
- GBD 2016 Motor Neuron Disease Collaborators. (2018). Global, regional, and national burden of motor neuron diseases 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Neurology*, *17*(12), 1083–1097. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30404-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30404-6)

- Ge, H., Li, X., Weiszmann, J., Wang, P., Baribault, H., Chen, J. L., Tian, H., & Li, Y. (2008). Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology*, *149*(9), 4519–4526. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0059>
- Ge, L., Gordon, J. S., Hsuan, C., Stenn, K., & Prouty, S. M. (2003). Identification of the delta-6 desaturase of human sebaceous glands: expression and enzyme activity. *The Journal of Investigative Dermatology*, *120*(5), 707–714. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12123.x>
- Gendron, T. F., Bieniek, K. F., Zhang, Y.-J., Jansen-West, K., Ash, P. E. A., Caulfield, T., Daugherty, L., Dunmore, J. H., Castanedes-Casey, M., Chew, J., Cosio, D. M., van Blitterswijk, M., Lee, W. C., Rademakers, R., Boylan, K. B., Dickson, D. W., & Petrucelli, L. (2013). Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathologica*, *126*(6), 829–844. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1192-8>
- Ghaedi, M., & Niklason, L. E. (2020). *HHS Public Access*. 1–37. <https://doi.org/10.1007/7651>
- Gibbons, N. E., & Murray, R. G. E. (1978). Proposals concerning the higher taxa of bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *28*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-1-1>
- Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5778), 1355–1359. <https://doi.org/10.1126/science.1124234>
- Giraud, P., Beaulieux, F., Ono, S., Shimizu, N., Chazot, G., & Lina, B. (2001). Detection of enteroviral sequences from frozen spinal cord samples of Japanese ALS patients. *Neurology*, *56*(12), 1777–1778. <https://doi.org/10.1212/WNL.56.12.1777>
- Girotti, A. W., & Kriska, T. (2015). Binding and cytotoxic trafficking of cholesterol hydroperoxides by sterol carrier protein-2. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1208*, 421–435. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1441-8\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1441-8_30)
- Glaser, C., Heinrich, J., & Koletzko, B. (2010). Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *59*(7), 993–999. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.10.022>
- Gois, A. M., Mendonça, D. M. F., Freire, M. A. M., & Santos, J. R. (2020). In Vitro and in Vivo Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis: an Updated Overview. *Brain Research Bulletin*, *159*(March), 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.03.012>
- Gomes, E., & Shorter, J. (2019). The molecular language of membraneless organelles. *The Journal of Biological Chemistry*, *294*(18), 7115–7127. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.001192>

- Gong, Z., Ba, L., Tang, J., Yang, Y., Li, Z., Liu, M., Yang, C., Ding, F., & Zhang, M. (2023). Gut microbiota links with cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: A multi-omics study. *The Journal of Biomedical Research*, *37*(2), 125. <https://doi.org/10.7555/JBR.36.20220198>
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M., & Gruenberg, J. (1991). Rab5 Controls Early Endosome Fusion in Vitro. *Cell*, *64*(5), 915–925. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90316-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90316-Q)
- Gottesman, M. M., & Pastan, I. (1993). MULTIDRUG RESISTANCE MULTIDRUG TRANSPORTER. *Annual Review of Biochemistry*, *62*, 385–427.
- Goverse, G., Molenaar, R., Macia, L., Tan, J., Erkelens, M. N., Konijn, T., Knippenberg, M., Cook, E. C. L., Hanekamp, D., Veldhoen, M., Hartog, A., Roeselers, G., Mackay, C. R., & Mebius, R. E. (2017). Diet-Derived Short Chain Fatty Acids Stimulate Intestinal Epithelial Cells To Induce Mucosal Tolerogenic Dendritic Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *198*(5), 2172–2181. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600165>
- Green, E. (2023). *Shotgun Sequencing*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Shotgun-Sequencing#:~:text=Shotgun sequencing is a laboratory,fragments that are sequenced individually.>
- Gromeier, M., & Wimmer, E. (1998). *Mechanism of Injury-Provoked Poliomyelitis*. *72*(6), 5056–5060.
- Gu, S., Chen, D., Zhang, J.-N., Lv, X., Wang, K., Duan, L.-P., Nie, Y., & Wu, X.-L. (2013). Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PLoS One*, *8*(10), e74957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074957>
- Gu, Xiaoqiong, Sim, J. X. Y., Lee, W. L., Cui, L., Chan, Y. F. Z., Chang, E. D., Teh, Y. E., Zhang, A.-N., Armas, F., Chandra, F., Chen, H., Zhao, S., Lee, Z., Thompson, J. R., Ooi, E. E., Low, J. G., Alm, E. J., & Kalimuddin, S. (2022). Gut Ruminococcaceae levels at baseline correlate with risk of antibiotic-associated diarrhea. *iScience*, *25*(1), 103644. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103644>
- Gu, Xuemei, Zhao, H. L., Sui, Y., Guan, J., Chan, J. C. N., & Tong, P. C. Y. (2012). White rice vinegar improves pancreatic beta-cell function and fatty liver in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Diabetologica*, *49*(3), 185–191. <https://doi.org/10.1007/s00592-010-0184-6>
- Guesnet, P., & Alessandri, J. M. (2011). Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie*, *93*(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.05.005>
- Gurney, M E. (2000). What transgenic mice tell us about neurodegenerative disease. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *22*(3), 297–304. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200003\)22:3<297::AID-BIES12>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200003)22:3<297::AID-BIES12>3.0.CO;2-I)
- Gurney, Mark E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R. L., & Siddique, T. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation.

- Science*, 264(5166), 1772–1775. <https://doi.org/10.1126/science.8209258>
- Haas, A. K., Fuchs, E., Kopajtich, R., & Barr, F. A. (2005). A GTPase-activating protein controls Rab5 function in endocytic trafficking. *Nature Cell Biology*, 7(9), 887–893. <https://doi.org/10.1038/ncb1290>
- Hafezparast, M., Klocke, R., Ruhrberg, C., Marquardt, A., Ahmad-Annuar, A., Bowen, S., Lalli, G., Witherden, A. S., Hummerich, H., Nicholson, S., Morgan, P. J., Oozageer, R., Priestley, J. V., Averill, S., King, V. R., Ball, S., Peters, J., Toda, T., Yamamoto, A., ... Fisher, E. M. C. (2003). Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science*, 300(5620), 808–812. <https://doi.org/10.1126/science.1083129>
- Hague, A., Butt, A. J., & Paraskeva, C. (1996). The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? *The Proceedings of the Nutrition Society*, 55(3), 937–943. <https://doi.org/10.1079/pns19960090>
- Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486(1), 10–13. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02197-9)
- Hamer, H. M., Jonkers, D. M. A. E., Bast, A., Vanhoutvin, S. A. L. W., Fischer, M. A. J. G., Kodde, A., Troost, F. J., Venema, K., & Brummer, R.-J. M. (2009). Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 28(1), 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.11.002>
- Hamidou, B., Couratier, P., Besançon, C., Nicol, M., Preux, P. M., & Marin, B. (2014). Epidemiological evidence that physical activity is not a risk factor for ALS. *European Journal of Epidemiology*, 29(7), 459–475. <https://doi.org/10.1007/s10654-014-9923-2>
- Hampel, H., O'Bryant, S. E., Molinuevo, J. L., Zetterberg, H., Masters, C. L., Lista, S., Kiddle, S. J., Batrla, R., & Blennow, K. (2018). Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic. *Nature Reviews. Neurology*, 14(11), 639–652. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0079-7>
- Hampton, M. B., & Orrenius, S. (1997). Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters*, 414(3), 552–556. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01068-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01068-5)
- Han, S. M., Tsuda, H., Yang, Y., Vibbert, J., Cottee, P., Lee, S.-J., Winek, J., Haueter, C., Bellen, H. J., & Miller, M. A. (2012). Secreted VAPB/ALS8 major sperm protein domains modulate mitochondrial localization and morphology via growth cone guidance receptors. *Developmental Cell*, 22(2), 348–362. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.009>
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P. J., Simmons, Z., & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17071. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>
- Harrison, A. F., & Shorter, J. (2017). RNA-binding proteins with prion-like domains in health and

- disease. *The Biochemical Journal*, 474(8), 1417–1438. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160499>
- Hertzberg, V. S., Singh, H., Fournier, C. N., Moustafa, A., Polak, M., Kuelbs, C. A., Torralba, M. G., Tansey, M. G., Nelson, K. E., & Glass, J. D. (2022). Gut microbiome differences between amyotrophic lateral sclerosis patients and spouse controls. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 23(1–2), 91–99. <https://doi.org/10.1080/21678421.2021.1904994>
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. Higgins, C. F. 1992. „ABC transporters: from microorganisms to man.“ Annual review of cell biology 8: 67–113. doi:10.1146/annurev.cb.08.110192.000435.an. *Annual Review of Cell Biology*, 8, 67–113.
- Higgins, C. M. J., Jung, C., & Xu, Z. (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neuroscience*, 4, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-4-16>
- Hirokawa, N., Niwa, S., & Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*, 68(4), 610–638. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.039>
- Hirokawa, N., & Takemura, R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(3), 201–214. <https://doi.org/10.1038/nrn1624>
- Hoell, J. I., Larsson, E., Runge, S., Nusbaum, J. D., Duggimpudi, S., Farazi, T. A., Hafner, M., Borkhardt, A., Sander, C., & Tuschl, T. (2011). RNA targets of wild-type and mutant FET family proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, 18(12), 1428–1431. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2163>
- Höhn, A., Jung, T., & Grune, T. (2014). Pathophysiological importance of aggregated damaged proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 71, 70–89. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.028>
- Hollinger, S. K., Okosun, I. S., & Mitchell, C. S. (2016). Antecedent Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: What Is Protecting Whom? *Frontiers in Neurology*, 7, 47. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00047>
- Holzbaur, E. L. F., & Vallee, R. B. (1994). DYNEINS: Molecular structure and cellular function. *Annual Review of Cell Biology*, 10, 339–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.10.110194.002011>
- Homan, E. R., Zendzian, R. P., Schott, L. D., Levy, H. B., & Adamson, R. H. (1972). Studies on Poly I:C toxicity in experimental animals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 23(4), 579–588. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(72\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0041-008X(72)90098-1)
- Hong, Y. H., Nishimura, Y., Hishikawa, D., Tsuzuki, H., Miyahara, H., Gotoh, C., Choi, K. C., Feng, D. D., Chen, C., Lee, H. G., Katoh, K., Roh, S. G., & Sasaki, S. (2005). Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology*, 146(12), 5092–5099. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0545>

- Hooper, L. V., Midwedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 22, 283–307. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259>
- Hooten, K. G., Beers, D. R., Zhao, W., & Appel, S. H. (2015). Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 12(2), 364–375. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0329-3>
- Horiuchi, H., Lippé, R., McBride, H. M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M., & Zerial, M. (1997). A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell*, 90(6), 1149–1159. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80380-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80380-3)
- Hosomi, K., Saito, M., Park, J., Murakami, H., Shibata, N., Ando, M., Nagatake, T., Konishi, K., Ohno, H., Tanisawa, K., Mohsen, A., Chen, Y.-A., Kawashima, H., Natsume-Kitatani, Y., Oka, Y., Shimizu, H., Furuta, M., Tojima, Y., Sawane, K., ... Kunisawa, J. (2022). Oral administration of *Blautia wexlerae* ameliorates obesity and type 2 diabetes via metabolic remodeling of the gut microbiota. *Nature Communications*, 13(1), 4477. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32015-7>
- Houtman, T. A., Eckermann, H. A., Smidt, H., & de Weerth, C. (2022). Gut microbiota and BMI throughout childhood: the role of firmicutes, bacteroidetes, and short-chain fatty acid producers. *Scientific Reports*, 12(1), 3140. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07176-6>
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., Codelli, J. A., Chow, J., Reisman, S. E., Petrosino, J. F., Patterson, P. H., & Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7), 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>
- Hsu, F., Spann, S., Ferguson, C., Hyman, A. A., Parton, R. G., & Zerial, M. (2018). Rab5 and Alsin regulate stress-activated cytoprotective signaling on mitochondria. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.32282>
- Huang, E. J., Zhang, J., Geser, F., Trojanowski, J. Q., Strober, J. B., Dickson, D. W., Brown, R. H., Shapiro, B. E., & Lomen-Hoerth, C. (2010). Extensive FUS-immunoreactive pathology in juvenile amyotrophic lateral sclerosis with basophilic inclusions. *Brain Pathology*, 20(6), 1069–1076. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00413.x>
- Huang, H. I., & Shih, S. R. (2015). Neurotropic enterovirus infections in the central nervous system. *Viruses*, 7(11), 6029–6044. <https://doi.org/10.3390/v7112920>
- Huang, N., Hua, D., Zhan, G., Li, S., Zhu, B., Jiang, R., Yang, L., Bi, J., Xu, H., Hashimoto, K., Luo, A., & Yang, C. (2019). Role of Actinobacteria and Coriobacteriia in the antidepressant effects of ketamine in an inflammation model of depression. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 176, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.12.001>
- Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>

- Human, P., Carcinomas, C., Carcinoma, C., & Lines, C. (1995). Expression of Phospholipases  $\gamma 1$ ,  $\text{PI}$ , and 61 in. *Molecular Carcinogenesis*, *152*, 146–152.
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO Journal*, *30*(17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- 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. *Neurological Research*, *27*(1), 105–108. <https://doi.org/10.1179/016164105X18430>
- Ikenaka, K., Katsuno, M., Kawai, K., Ishigaki, S., Tanaka, F., & Sobue, G. (2012). Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(1), 1225–1238. <https://doi.org/10.3390/ijms13011225>
- Ilieva, H., Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of Cell Biology*, *187*(6), 761–772. <https://doi.org/10.1083/jcb.200908164>
- Ilieva, H. S., Nagano, I., Murakami, T., Shiote, M., Manabe, Y., & Abe, K. (2003). Age-related changes in peroxisomal membrane protein 70 and superoxide dismutase 1 in transgenic G93A mice. *Neurological Research*, *25*(4), 423–426. <https://doi.org/10.1179/016164103101201607>
- Ilieva, E. V., Ayala, V., Jové, M., Dalfó, E., Cacabelos, D., Povedano, M., Bellmunt, M. J., Ferrer, I., Pamplona, R., & Portero-Otín, M. (2007). Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, *130*(12), 3111–3123. <https://doi.org/10.1093/brain/awm190>
- Imanaka, T., Aihara, K., Takano, T., Yamashita, A., Sato, R., Suzuki, Y., Yokota, S., & Osumi, T. (1999). Characterization of the 70-kDa peroxisomal membrane protein, an ATP binding cassette transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(17), 11968–11976. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11968>
- Imlay, J. A., & Linn, S. (1987). Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, *169*(7), 2967–2976. <https://doi.org/10.1128/jb.169.7.2967-2976.1987>
- Inoguchi, T., Sonta, T., Tsubouchi, H., Etoh, T., Kakimoto, M., Sonoda, N., Sato, N., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., Utsumi, H., & Nawata, H. (2003). Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: Role of vascular NAD(P)H oxidase. *Journal of the American Society of Nephrology*, *14*(SUPPL. 3), 227–232. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000077407.90309.65>
- Isaac, J. T. R., Ashby, M. C., & McBain, C. J. (2007). The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*, *54*(6), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.001>



- Ishigaki, S., Fujioka, Y., Okada, Y., Riku, Y., Udagawa, T., Honda, D., Yokoi, S., Endo, K., Ikenaka, K., Takagi, S., Iguchi, Y., Sahara, N., Takashima, A., Okano, H., Yoshida, M., Warita, H., Aoki, M., Watanabe, H., Okado, H., ... Sobue, G. (2017). Altered Tau Isoform Ratio Caused by Loss of FUS and SFPQ Function Leads to FTL-like Phenotypes. *Cell Reports*, *18*(5), 1118–1131. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.013>
- Ishigaki, S., Masuda, A., Fujioka, Y., Iguchi, Y., Katsuno, M., Shibata, A., Urano, F., Sobue, G., & Ohno, K. (2012). Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions. *Scientific Reports*, *2*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep00529>
- Ivanov, P., Kedersha, N., & Anderson, P. (2019). Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *11*(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032813>
- Jackson, P. A., Reay, J. L., Scholey, A. B., & Kennedy, D. O. (2012). DHA-rich oil modulates the cerebral haemodynamic response to cognitive tasks in healthy young adults: a near IR spectroscopy pilot study. *The British Journal of Nutrition*, *107*(8), 1093–1098. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004041>
- Jacobs, B. L., & Langland, J. O. (1996). When Two Strands Are Better Than One: The Mediators and Modulators of the Cellular Responses to Double-Stranded RNA. *Virology*, *219*(2), 339–349. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0259>
- Jain, S., Wheeler, J. R., Walters, R. W., Agrawal, A., Barsic, A., & Parker, R. (2016). ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell*, *164*(3), 487–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.038>
- James, C., & Kehlenbach, R. H. (2021). The interactome of the VAP family of proteins: An overview. *Cells*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071780>
- Jayabalan, A. K., Griffin, D. E., & Leung, A. K. L. (2023). *Protein G3BP1*. 1–17.
- Jiang, J., Zhu, Q., Gendron, T. F., Saberi, S., McAlonis-Downes, M., Seelman, A., Stauffer, J. E., Jafar-Nejad, P., Drenner, K., Schulte, D., Chun, S., Sun, S., Ling, S.-C., Myers, B., Engelhardt, J., Katz, M., Baughn, M., Platoshyn, O., Marsala, M., ... Lagier-Tourenne, C. (2016). Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron*, *90*(3), 535–550. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.006>
- Jiang, L.-L., Zhao, J., Yin, X.-F., He, W.-T., Yang, H., Che, M.-X., & Hu, H.-Y. (2016). Two mutations G335D and Q343R within the amyloidogenic core region of TDP-43 influence its aggregation and inclusion formation. *Scientific Reports*, *6*, 23928. <https://doi.org/10.1038/srep23928>
- Jiang, Y. M., Yamamoto, M., Kobayashi, Y., Yoshihara, T., Liang, Y., Terao, S., Takeuchi, H., Ishigaki, S., Katsuno, M., Adachi, H., Niwa, J. I., Tanaka, F., Doyu, M., Yoshida, M., Hashizume, Y., & Sobue, G. (2005). Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, *57*(2), 236–251. <https://doi.org/10.1002/ana.20379>

- Jiang, Y. M., Yamamoto, M., Tanaka, F., Ishigaki, S., Katsuno, M., Adachi, H., Niwa, J. I., Doyu, M., Yoshida, M., Hashizume, Y., & Sobue, G. (2007). Gene expressions specifically detected in motor neurons (dynactin 1, early growth response 3, acetyl-CoA transporter, death receptor 5, and cyclin C) differentially correlate to pathologic markers in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *66*(7), 617–627. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e318093ece3>
- Jie, Z., Yu, X., Liu, Y., Sun, L., Chen, P., Ding, Q., Gao, Y., Zhang, X., Yu, M., Liu, Y., Zhang, Y., Kristiansen, K., Jia, H., Brix, S., & Cai, K. (2021). The Baseline Gut Microbiota Directs Dieting-Induced Weight Loss Trajectories. *Gastroenterology*, *160*(6), 2029–2042.e16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.01.029>
- Johnson, J. O., Chia, R., Miller, D. E., Li, R., Kumaran, R., Abramzon, Y., Alahmady, N., Renton, A. E., Topp, S. D., Gibbs, J. R., Cookson, M. R., Sabir, M. S., Dalgard, C. L., Troakes, C., Jones, A. R., Shatunov, A., Iacoangeli, A., Al Khleifat, A., Ticozzi, N., ... Zucchi, E. (2021). Association of Variants in the SPTLC1 Gene With Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurology*, *78*(10), 1236–1248. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.2598>
- Josephs, K. A., Hodges, J. R., Snowden, J. S., Mackenzie, I. R., Neumann, M., Mann, D. M., & Dickson, D. W. (2011). Neuropathological background of phenotypical variability in frontotemporal dementia. *Acta Neuropathologica*, *122*(2), 137–153. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0839-6>
- Jung, T., Catalgol, B., & Grune, T. (2009). The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(4), 191–296. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2009.04.001>
- Kabashi, E., & Durham, H. D. (2006). Failure of protein quality control in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1762*(11–12), 1038–1050. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.06.006>
- Kabashi, E., El Oussini, H., Bercier, V., Gros-Louis, F., Valdmanis, P. N., Mcdearmid, J., Meijer, I. A., Dion, P. A., Dupre, N., Hollinger, D., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., Camu, W., Meininger, V., Loeffler, J. P., René, F., Drapeau, P., Rouleau, G. A., & Dupuis, L. (2013). Investigating the contribution of VAPB/ALS8 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, *22*(12), 2350–2360. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt080>
- Kamentsky, L., Jones, T. R., Fraser, A., Bray, M.-A., Logan, D. J., Madden, K. L., Ljosa, V., Rueden, C., Eliceiri, K. W., & Carpenter, A. E. (2011). Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *27*(8), 1179–1180. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr095>
- Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T., & Hashimoto, T. (1990). The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(8), 4534–4540. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1968461>
- Kanekura, K., Nishimoto, I., Aiso, S., & Matsuoka, M. (2006). Characterization of amyotrophic lateral

- sclerosis-linked P56S mutation of vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB/ALS8). *The Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 30223–30233. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605049200>
- Karademir, B., Corek, C., & Ozer, N. K. (2015). Endoplasmic reticulum stress and proteasomal system in amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.038>
- Karlsson, F. H., Ussery, D. W., Nielsen, J., & Nookaew, I. (2011). A closer look at bacteroides: phylogenetic relationship and genomic implications of a life in the human gut. *Microbial Ecology*, 61(3), 473–485. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9796-1>
- Kasarskis, E. J., Mendiondo, M. S., Matthews, D. E., Mitsumoto, H., Tandan, R., Simmons, Z., Bromberg, M. B., Kryscio, R. J., & ALS Nutrition/NIPPV Study Group. (2014). Estimating daily energy expenditure in individuals with amyotrophic lateral sclerosis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(4), 792–803. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.069997>
- Kato, S., Horiuchi, S., Liu, J., Cleveland, D. W., Shibata, N., Nakashima, K., Nagai, R., Hirano, A., Takikawa, M., Kato, M., Nakano, I., & Ohama, E. (2000). Advanced glycation endproduct-modified superoxide dismutase-1 (SOD1)-positive inclusions are common to familial amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 gene mutations and transgenic mice expressing human SOD1 with a G85R mutation. *Acta Neuropathologica*, 100(5), 490–505. <https://doi.org/10.1007/s004010000226>
- Katz, J. S., Dimachkie, M. M., & Barohn, R. J. (2015). Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Historical Perspective. *Neurologic Clinics*, 33(4), 727–734. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2015.07.013>
- Kausar, S., Wang, F., & Cui, H. (2018). The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases. *Cells*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/cells7120274>
- Kawahara, Y., Kwak, S., Sun, H., Ito, K., Hashida, H., Aizawa, H., Jeong, S.-Y., & Kanazawa, I. (2003). Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *Journal of Neurochemistry*, 85(3), 680–689. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01703.x>
- Kawahara, Y., & Mieda-Sato, A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(9), 3347–3352. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112427109>
- Kaznadzey, A., Shelyakin, P., & Gelfand, M. S. (2017). Sugar Lego: Gene composition of bacterial carbohydrate metabolism genomic loci. *Biology Direct*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13062-017-0200-7>
- Kedersha, N., & Anderson, P. (2007). Mammalian Stress Granules and Processing Bodies. *Methods in Enzymology*, 431(07), 61–81. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)31005-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)31005-7)

- Kedersha, N., Panas, M. D., Achorn, C. A., Lyons, S., Tisdale, S., Hickman, T., Thomas, M., Lieberman, J., McInerney, G. M., Ivanov, P., & Anderson, P. (2016). G3BP-Caprin1-USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. *The Journal of Cell Biology*, *212*(7), 845–860. <https://doi.org/10.1083/jcb.201508028>
- Keep, M., Elmér, E., Fong, K. S. K., & Csiszar, K. (2001). Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice. *Brain Research*, *894*(2), 327–331. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02012-1)
- Keller, G. A., Scallen, T. J., Clarke, D., Maher, P. A., Krisans, S. K., & Singer, S. J. (1989). Subcellular localization of sterol carrier protein-2 in rat hepatocytes: its primary localization to peroxisomes. *The Journal of Cell Biology*, *108*(4), 1353–1361. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.4.1353>
- Khong, A., Matheny, T., Jain, S., Mitchell, S. F., Wheeler, J. R., & Parker, R. (2017). The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules. *Molecular Cell*, *68*(4), 808–820.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.015>
- Kieran, D., Hafezparast, M., Bohnert, S., Dick, J. R. T., Martin, J., Schiavo, G., Fisher, E. M. C., & Greensmith, L. (2005). A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *The Journal of Cell Biology*, *169*(4), 561–567. <https://doi.org/10.1083/jcb.200501085>
- Kim, C. H., Park, J., & Kim, M. (2014). Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Network*, *14*(6), 277–288. <https://doi.org/10.4110/in.2014.14.6.277>
- Kim, H. S., Son, J., Lee, D., Tsai, J., Wang, D., Chocron, E. S., Jeong, S., Kittrell, P., Murchison, C. F., Kennedy, R. E., Tobon, A., Jackson, C. E., & Pickering, A. M. (2022). Gut- and oral-dysbiosis differentially impact spinal- and bulbar-onset ALS, predicting ALS severity and potentially determining the location of disease onset. *BMC Neurology*, *22*(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12883-022-02586-5>
- Kim, I., Xu, W., & Reed, J. C. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: Disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, *7*(12), 1013–1030. <https://doi.org/10.1038/nrd2755>
- Kimura, M., Majde, J. A., Toth, L. A., Opp, M. R., & Krueger, J. M. (1994). Somnogenic effects of rabbit and recombinant human interferons in rabbits. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *267*(1), 36–41. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.267.1.r53>
- King, S. M. (2000). The dynein microtubule motor. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1496*(1), 60–75. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(00\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(00)00009-4)
- Kirkinezos, I. G., Bacman, S. R., Hernandez, D., Oca-Cossio, J., Arias, L. J., Perez-Pinzon, M. A., Bradley, W. G., & Moraes, C. T. (2005). Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice. *Journal of Neuroscience*, *25*(1), 164–172.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3829-04.2005>

- Kong, J., & Xu, Z. (1998). Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), 3241–3250. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9547233>
- Kopečný, J., Zorec, M., Mrázek, J., Kobayashi, Y., & Marinšek-Logar, R. (2003). *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 1), 201–209. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02345-0>
- Koppenol, H., & Koppenol, H. (2018). *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly*. 73.
- Kovács, A. D., Langin, L. M., Hernandez, J. L. G., & Pearce, D. A. (2022). Acidified drinking water attenuates motor deficits and brain pathology in a mouse model of a childhood neurodegenerative disorder. *Scientific Reports*, 12(1), 9025. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12981-0>
- Kriska, T., Pilat, A., Schmitt, J. C., & Girotti, A. W. (2010). Sterol carrier protein-2 (SCP-2) involvement in cholesterol hydroperoxide cytotoxicity as revealed by SCP-2 inhibitor effects. *Journal of Lipid Research*, 51(11), 3174–3184. <https://doi.org/10.1194/JLR.M008342>
- Krokowski, D., Jobava, R., Szkop, K. J., Chen, C.-W., Fu, X., Venus, S., Guan, B.-J., Wu, J., Gao, Z., Banaszuk, W., Tchorzewski, M., Mu, T., Ropelewski, P., Merrick, W. C., Mao, Y., Seval, A. I., Miranda, H., Qian, S.-B., Manifava, M., ... Hatzoglou, M. (2022). Stress-induced perturbations in intracellular amino acids reprogram mRNA translation in osmoadaptation independently of the ISR. *Cell Reports*, 40(3), 111092. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111092>
- Kuczyńska, B., Wasilewska, A., Biczysko, M., Banasiewicz, T., & Drews, M. (2011). Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe - mechanizmy działania, potencjalne zastosowania kliniczne oraz zalecenia dietetyczne. *Nowiny Lekarskie*, 80(4), 299–304.
- Kvamme, E., Torgner, I. A., & Roberg, B. (1991). Evidence indicating that pig renal phosphate-activated glutaminase has a functionally predominant external localization in the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 266(20), 13185–13192. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)98822-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)98822-8)
- Lagier-Tourenne, C., & Cleveland, D. W. (2009). Rethinking ALS: The FUS about TDP-43. *Cell*, 136(6), 1001–1004. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.03.006>
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Hutt, K. R., Vu, A. Q., Baughn, M., Huelga, S. C., Clutario, K. M., Ling, S.-C., Liang, T. Y., Mazur, C., Wancewicz, E., Kim, A. S., Watt, A., Freier, S., Hicks, G. G., Donohue, J. P., Shiue, L., Bennett, C. F., Ravits, J., ... Yeo, G. W. (2012). Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nature Neuroscience*, 15(11), 1488–1497. <https://doi.org/10.1038/nn.3230>

- Lanius, R. A., Paddon, H. B., Mezei, M., Wagey, R., Krieger, C., Pelech, S. L., & Shaw, C. A. (1995). A role for amplified protein kinase C activity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, *65*(2), 927–930. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65020927.x>
- Lattante, S., Rouleau, G. A., & Kabashi, E. (2013). TARDBP and FUS Mutations Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Summary and Update. *Human Mutation*, *34*(6), 812–826. <https://doi.org/10.1002/humu.22319>
- Law, F., & Rocheleau, C. E. (2017). Vps34 and the Armus/TBC-2 Rab GAPs: Putting the brakes on the endosomal Rab5 and Rab7 GTPases. *Cellular Logistics*, *7*(4), e1403530. <https://doi.org/10.1080/21592799.2017.1403530>
- Lechevalier, H., & Lechevalier, M. P. (1965). [Classification of aerobic actinomycetes based on their morphology and their chemical composition]. *Annales de l'Institut Pasteur*, *108*(5), 662–673. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5838643>
- Lee, H. B., Yu, M. R., Song, J. S., & Ha, H. (2004). Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney International*, *65*(4), 1170–1179. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00491.x>
- Lee, H., Lee, J. J., Park, N. Y., Dubey, S. K., Kim, T., Ruan, K., Lim, S. Bin, Park, S.-H., Ha, S., Kovlyagina, I., Kim, K.-T., Kim, S., Oh, Y., Kim, H., Kang, S.-U., Song, M.-R., Lloyd, T. E., Maragakis, N. J., Hong, Y. Bin, ... Lee, G. (2021). Multi-omic analysis of selectively vulnerable motor neuron subtypes implicates altered lipid metabolism in ALS. *Nature Neuroscience*, *24*(12), 1673–1685. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00944-z>
- Lee, L. K., Shahar, S., Chin, A. V., & Yusoff, N. A. M. (2013). Docosahexaenoic acid-concentrated fish oil supplementation in subjects with mild cognitive impairment (MCI): A 12-month randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Psychopharmacology*, *225*(3), 605–612. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2848-0>
- Legay, V., Deleage, C., Beaulieux, F., Giraudon, P., Aymard, M., & Lina, B. (2003). Impaired glutamate uptake and EAAT2 downregulation in an enterovirus chronically infected human glial cell line. *European Journal of Neuroscience*, *17*(9), 1820–1828. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02621.x>
- Lei, G., Horbath, A., Li, Z., & Gan, B. (2022). PKC $\beta$ II–ACSL4 pathway mediating ferroptosis execution and anti-tumor immunity. *Cancer Communications*, *42*(7), 583–586. <https://doi.org/10.1002/cac2.12319>
- Lev, S., Halevy, D. Ben, Peretti, D., & Dahan, N. (2008). The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease. *Trends in Cell Biology*, *18*(6), 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.03.006>
- Levine, T. P., Daniels, R. D., Gatta, A. T., Wong, L. H., & Hayes, M. J. (2013). The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs.

- Bioinformatics* (Oxford, England), 29(4), 499–503.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts725>
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022–1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>
- Li, H.-F., & Wu, Z.-Y. (2016). Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis. *Translational Neurodegeneration*, 5, 3. <https://doi.org/10.1186/s40035-016-0050-8>
- Li, J.-M., Yu, R., Zhang, L.-P., Wen, S.-Y., Wang, S.-J., Zhang, X.-Y., Xu, Q., & Kong, L.-D. (2019). Dietary fructose-induced gut dysbiosis promotes mouse hippocampal neuroinflammation: a benefit of short-chain fatty acids. *Microbiome*, 7(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0713-7>
- Li, N. C., Fan, J., & Papadopoulos, V. (2016). Sterol Carrier Protein-2, a Nonspecific Lipid-Transfer Protein, in Intracellular Cholesterol Trafficking in Testicular Leydig Cells. *PLoS One*, 11(2), e0149728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149728>
- Li, X., Chen, H., Guan, Y., Li, X., Lei, L., Liu, J., Yin, L., Liu, G., & Wang, Z. (2013). Acetic Acid Activates the AMP-Activated Protein Kinase Signaling Pathway to Regulate Lipid Metabolism in Bovine Hepatocytes. 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067880>
- Li, Y.-L., Tian, H., Jiang, J., Zhang, Y., & Qi, X.-W. (2020). Multifaceted regulation and functions of fatty acid desaturase 2 in human cancers. *American Journal of Cancer Research*, 10(12), 4098–4111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33414988>
- Liang, S., Guo, H., Ma, K., Li, X., Wu, D., Wang, Y., Wang, W., Zhang, S., Cui, Y., Liu, Y., Sun, L., Zhang, B., Xin, M., Zhang, N., Zhou, H., Liu, Y., Wang, J., & Liu, L. (2021). A PLCB1-PI3K-AKT Signaling Axis Activates EMT to Promote Cholangiocarcinoma Progression. *Cancer Research*, 81(23), 5889–5903. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1538>
- Limousin, N., Blasco, H., Corcia, P., Gordon, P. H., De Toffol, B., Andres, C., & Praline, J. (2010). Malnutrition at the time of diagnosis is associated with a shorter disease duration in ALS. *Journal of the Neurological Sciences*, 297(1–2), 36–39. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.06.028>
- Lindholm, D., Wootz, H., & Korhonen, L. (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death and Differentiation*, 13(3), 385–392. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401778>
- Ling, J. P., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., & Wong, P. C. (2015). TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6248), 650–655. <https://doi.org/10.1126/science.aab0983>
- Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P. A., Velde, C. Vande, Ward, C. M., Miller, T. M., Subramaniam, J. R., Rothstein, J. D., Marklund, S., Andersen, P. M., Brännström, T., Gredal, O., Wong, P. C., Williams, D. S., & Cleveland, D. W. (2004). Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron*, 43(1), 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.016>

- Löfmark, S., Jernberg, C., Jansson, J. K., & Edlund, C. (2006). Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(6), 1160–1167. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl420>
- Logroscino, G., Traynor, B. J., Hardiman, O., Chiò, A., Mitchell, D., Swingler, R. J., Millul, A., Benn, E., Beghi, E., & EURALS. (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *81*(4), 385–390. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.183525>
- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. A., Goda, Y., Zerial, M., & Pfeffer, S. R. (1993). Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *The EMBO Journal*, *12*(2), 677–682. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05701.x>
- Longstreth, W. T., Meschke, J. S., Davidson, S. K., Smoot, L. M., Smoot, J. C., & Koepsell, T. D. (2005). Hypothesis: a motor neuron toxin produced by a clostridial species residing in gut causes ALS. *Medical Hypotheses*, *64*(6), 1153–1156. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.07.041>
- Longstreth, W. T., Nelson, L. M., Koepsell, T. D., & van Belle, G. (1991). Hypotheses to explain the association between vigorous physical activity and amyotrophic lateral sclerosis. *Medical Hypotheses*, *34*(2), 144–148. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(91\)90183-y](https://doi.org/10.1016/0306-9877(91)90183-y)
- Loving, B. A., & Bruce, K. D. (2020). Lipid and Lipoprotein Metabolism in Microglia. *Frontiers in Physiology*, *11*, 393. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00393>
- Lucke-Wold, B. P., Turner, R. C., Logsdon, A. F., Simpkins, J. W., Alkon, D. L., Smith, K. E., Chen, Y.-W., Tan, Z., Huber, J. D., & Rosen, C. L. (2015). Common mechanisms of Alzheimer's disease and ischemic stroke: the role of protein kinase C in the progression of age-related neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *43*(3), 711–724. <https://doi.org/10.3233/JAD-141422>
- Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., Llanas, R. A., & Thomson, J. A. (2006). *stem cells in defined conditions*. *24*(2), 2005–2007. <https://doi.org/10.1038/nbt1177>
- Lunde, B. M., Moore, C., & Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*(6), 479–490. <https://doi.org/10.1038/nrm2178>
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, *62*(1), 67–72. <https://doi.org/10.1079/pns2002207>
- MacKenzie, I. R., Arzberger, T., Kremmer, E., Troost, D., Lorenzl, S., Mori, K., Weng, S. M., Haass, C., Kretzschmar, H. A., Edbauer, D., & Neumann, M. (2013). Dipeptide repeat protein pathology in C9ORF72 mutation cases: Clinico-pathological correlations. *Acta Neuropathologica*, *126*(6), 859–879. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1181-y>
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R.



- (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/nu12051474>
- Magrané, J., & Manfredi, G. (2009). Mitochondrial function, morphology, and axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, *11*(7), 1615–1626. <https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2604>
- Malek, A. M., Barchowsky, A., Bowser, R., Youk, A., & Talbott, E. O. (2012). Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis of epidemiological studies: pesticide exposure as a risk factor for ALS. *Environmental Research*, *117*, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.06.007>
- Manfredi, G., & Kawamata, H. (2016). Mitochondria and endoplasmic reticulum crosstalk in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, *90*, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.004>
- Marcelo, A., Koppenol, R., de Almeida, L. P., Matos, C. A., & Nóbrega, C. (2021). Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation? *Cell Death and Disease*, *12*(6). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03873-8>
- Marchi, S., Patergnani, S., & Pinton, P. (2014). The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1837*(4), 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.015>
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H., Doré, J., Corthier, G., & Furet, J.-P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, *9*, 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-123>
- Marin, B., Boumédiène, F., Logroscino, G., Couratier, P., Babron, M.-C., Leutenegger, A. L., Copetti, M., Preux, P.-M., & Beghi, E. (2017). Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, *46*(1), 57–74. <https://doi.org/10.1093/ije/dyw061>
- Marklund, N., Bakshi, A., Castelbuono, D., Conte, V., & McIntosh, T. (2006). Evaluation of Pharmacological Treatment Strategies in Traumatic Brain Injury. *Current Pharmaceutical Design*, *12*(13), 1645–1680. <https://doi.org/10.2174/138161206776843340>
- Martin, S., Battistini, C., & Sun, J. (2022). A Gut Feeling in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Microbiome of Mice and Men. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 839526. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.839526>
- Mathieu, C., Pappu, R. V., & Taylor, J. P. (2020). Beyond aggregation: Pathological phase transitions in neurodegenerative disease. *Science (New York, N.Y.)*, *370*(6512), 56–60. <https://doi.org/10.1126/science.abb8032>
- Matsuki, H., Takahashi, M., Higuchi, M., Makokha, G. N., Oie, M., & Fujii, M. (2013). Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular*

- Mechanisms*, 18(2), 135–146. <https://doi.org/10.1111/gtc.12023>
- Matsumoto, A., Okado, A., Fujii, T., Fujii, J., Egashira, M., Niikawa, N., & Taniguchi, N. (1999). Cloning of the peroxiredoxin gene family in rats and characterization of the fourth member. *FEBS Letters*, 443(3), 246–250. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01736-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01736-0)
- Matsumoto, M., & Seya, T. (2008). TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(7), 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.11.005>
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C. D., Martushova, K., Kiaei, M., Flint Beal, M., & Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 29626–29633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203065200>
- Mattsson, N., Cullen, N. C., Andreasson, U., Zetterberg, H., & Blennow, K. (2019). Association Between Longitudinal Plasma Neurofilament Light and Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 76(7), 791–799. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.0765>
- Mattsson, P., Lönnstedt, I., Nygren, I., & Askmark, H. (2012). Physical fitness, but not muscle strength, is a risk factor for death in amyotrophic lateral sclerosis at an early age. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 83(4), 390–394. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.218982>
- Maurice, C. F., Cl Knowles, S., Ladau, J., Pollard, K. S., Fenton, A., Pedersen, A. B., & Turnbaugh, P. J. (2015). Marked seasonal variation in the wild mouse gut microbiota. *ISME Journal*, 9(11), 2423–2434. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.53>
- Mayer, E. A., Tillisch, K., & Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 926–938. <https://doi.org/10.1172/JCI76304>
- McAlary, L., Aquilina, J. A., & Yerbury, J. J. (2016). Susceptibility of Mutant SOD1 to Form a Destabilized Monomer Predicts Cellular Aggregation and Toxicity but Not In vitro Aggregation Propensity. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 499. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00499>
- McCampbell, A., Cole, T., Wegener, A. J., Tomassy, G. S., Setnicka, A., Farley, B. J., Schoch, K. M., Hoye, M. L., Shabsovich, M., Sun, L., Luo, Y., Zhang, M., Comfort, N., Wang, B., Amacker, J., Thankamony, S., Salzman, D. W., Cudkovicz, M., Graham, D. L., ... Miller, T. M. (2018). Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(8), 3558–3567. <https://doi.org/10.1172/JCI99081>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100>

- McCune, B. T., Tang, W., Lu, J., Eaglesham, J. B., Thorne, L., Mayer, A. E., Condiff, E., Nice, T. J., Goodfellow, I., Krezel, A. M., & Virgin, H. W. (2017). Noroviruses Co-opt the Function of Host Proteins VAPA and VAPB for Replication via a Phenylalanine-Phenylalanine-Acidic-Tract-Motif Mimic in Nonstructural Viral Protein NS1/2. *MBio*, *8*(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00668-17>
- McDonald, K. K., Aulas, A., Destroismaisons, L., Pickles, S., Beleac, E., Camu, W., Rouleau, G. A., & Velde, C. Vande. (2011). TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Human Molecular Genetics*, *20*(7), 1400–1410. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr021>
- McTague, A., Appleton, R., Avula, S., Cross, J. H., King, M. D., Jacques, T. S., Bhate, S., Cronin, A., Curran, A., Desurkar, A., Farrell, M. A., Hughes, E., Jefferson, R., Lascelles, K., Livingston, J., Meyer, E., McLellan, A., Poduri, A., Scheffer, I. E., ... Kneen, R. (2013). Migrating partial seizures of infancy: expansion of the electroclinical, radiological and pathological disease spectrum. *Brain : A Journal of Neurology*, *136*(Pt 5), 1578–1591. <https://doi.org/10.1093/brain/awt073>
- Meininger, V., Loeffle, J. P., & Dupuis, L. (2009). Reply from the Authors:Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, *72*(10), 944–945. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000339397.79460.d5>
- Menzies, F. M., Cookson, M. R., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., Dong, L., Figlewicz, D. A., & Shaw, P. J. (2002). Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, *125*(7), 1522–1533. <https://doi.org/10.1093/brain/awf167>
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., & Hirokawa, N. (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(13), 7004–7011. <https://doi.org/10.1073/pnas.111145398>
- Millecamps, S., Boillée, S., Le Ber, I., Seilhean, D., Teyssou, E., Giraudeau, M., Moigneu, C., Vandenberghe, N., Danel-Brunaud, V., Corcia, P., Pradat, P. F., Le Forestier, N., Lacomblez, L., Bruneteau, G., Camu, W., Brice, A., Cazeneuve, C., LeGuern, E., Meininger, V., & Salachas, F. (2012). Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes. *Journal of Medical Genetics*, *49*(4), 258–263. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100699>
- Millecamps, S., & Julien, J. P. (2013). Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(3), 161–176. <https://doi.org/10.1038/nrn3380>
- Miller, R. G., Jackson, C. E., Kasarskis, E. J., England, J. D., Forshew, D., Johnston, W., Kalra, S., Katz, J. S., Mitsumoto, H., Rosenfeld, J., Shoesmith, C., Strong, M. J., Woolley, S. C., & Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. (2009). Practice parameter update: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: multidisciplinary care, symptom management, and cognitive/behavioral impairment (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American. *Neurology*, *73*(15), 1227–1233. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181bc01a4>

- Miller, T., Cudkowicz, M., Shaw, P. J., Andersen, P. M., Atassi, N., Bucelli, R. C., Genge, A., Glass, J., Ladha, S., Ludolph, A. L., Maragakis, N. J., McDermott, C. J., Pestronk, A., Ravits, J., Salachas, F., Trudell, R., Van Damme, P., Zinman, L., Bennett, C. F., ... Ferguson, T. A. (2020). Phase 1-2 Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *The New England Journal of Medicine*, *383*(2), 109–119. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2003715>
- Miller, T. M., Cudkowicz, M. E., Genge, A., Shaw, P. J., Sobue, G., Bucelli, R. C., Chiò, A., Van Damme, P., Ludolph, A. C., Glass, J. D., Andrews, J. A., Babu, S., Benatar, M., McDermott, C. J., Cochrane, T., Chary, S., Chew, S., Zhu, H., Wu, F., ... Fradette, S. (2022). Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *New England Journal of Medicine*, *387*(12), 1099–1110. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2204705>
- Miller, T. M., Pestronk, A., David, W., Rothstein, J., Simpson, E., Appel, S. H., Andres, P. L., Mahoney, K., Allred, P., Alexander, K., Ostrow, L. W., Schoenfeld, D., Macklin, E. A., Norris, D. A., Manousakis, G., Crisp, M., Smith, R., Bennett, C. F., Bishop, K. M., & Cudkowicz, M. E. (2013). An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *The Lancet. Neurology*, *12*(5), 435–442. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70061-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70061-9)
- Mitchell, J. C., McGoldrick, P., Vance, C., Hortobagyi, T., Sreedharan, J., Rogelj, B., Tudor, E. L., Smith, B. N., Klasen, C., Miller, C. C. J., Cooper, J. D., Greensmith, L., & Shaw, C. E. (2013). Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathologica*, *125*(2), 273–288. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1043-z>
- Mitsumoto, H., Brooks, B. R., & Silani, V. (2014). Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: Why so many negative trials and how can trials be improved? *The Lancet Neurology*, *13*(11), 1127–1138. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70129-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70129-2)
- Mizielinska, S., Grönke, S., Niccoli, T., Ridler, C. E., Clayton, E. L., Devoy, A., Moens, T., Norona, F. E., Woollacott, I. O. C., Pietrzyk, J., Cleverley, K., Nicoll, A. J., Pickering-Brown, S., Dols, J., Cabecinha, M., Hendrich, O., Fratta, P., Fisher, E. M. C., Partridge, L., & Isaacs, A. M. (2014). C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in *Drosophila* through arginine-rich proteins. *Science (New York, N.Y.)*, *345*(6201), 1192–1194. <https://doi.org/10.1126/science.1256800>
- Mizielinska, S., Ridler, C. E., Balendra, R., Thoeng, A., Woodling, N. S., Grässer, F. A., Plagnol, V., Lashley, T., Partridge, L., & Isaacs, A. M. (2017). Bidirectional nucleolar dysfunction in C9orf72 frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathologica Communications*, *5*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0432-x>
- Mochly-Rosen, D., Das, K., & Grimes, K. V. (2012). Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature Reviews. Drug Discovery*, *11*(12), 937–957. <https://doi.org/10.1038/nrd3871>
- Mohassel, P., Donkervoort, S., Lone, M. A., Nalls, M., Gable, K., Gupta, S. D., Foley, A. R., Hu, Y., Saute, J. A. M., Moreira, A. L., Kok, F., Introna, A., Logroscino, G., Grunseich, C., Nickolls, A. R., Pourshafie, N., Neuhaus, S. B., Saade, D., Gangfuß, A., ... Bönnemann, C. G. (2021). Childhood

- amyotrophic lateral sclerosis caused by excess sphingolipid synthesis. *Nature Medicine*, 27(7), 1197–1204. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01346-1>
- Mora, J. S., Genge, A., Chio, A., Estol, C. J., Chaverri, D., Hernández, M., Marín, S., Mascias, J., Rodriguez, G. E., Povedano, M., Paipa, A., Dominguez, R., Gamez, J., Salvado, M., Lunetta, C., Ballario, C., Riva, N., Mandrioli, J., Moussy, A., ... AB10015 STUDY GROUP. (2020). Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 21(1–2), 5–14. <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1632346>
- Morfini, G., Pigino, G., Szebenyi, G., You, Y., Pollema, S., & Brady, S. T. (2006). JNK mediates pathogenic effects of polyglutamine-expanded androgen receptor on fast axonal transport. *Nature Neuroscience*, 9(7), 907–916. <https://doi.org/10.1038/nn1717>
- Mori, K., Arzberger, T., Grässer, F. A., Gijssels, I., May, S., Rentzsch, K., Weng, S. M., Schludi, M. H., Van Der Zee, J., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Kremmer, E., Kretschmar, H. A., Haass, C., & Edbauer, D. (2013). Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathologica*, 126(6), 881–893. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1189-3>
- Mori, T., Tsukamoto, T., Mori, H., Tashiro, Y., & Fujiki, Y. (1991). Molecular cloning and deduced amino acid sequence of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) of rat liver: a higher molecular mass (60 kDa) protein contains the primary sequence of nonspecific lipid transfer protein as its C-terminal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(10), 4338–4342. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.10.4338>
- Mu, F. T., Callaghan, J. M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R. G., Campbell, P. L., McCluskey, J., Yeo, J. P., Tock, E. P., & Toh, B. H. (1995). EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine “fingers” and contains a calmodulin-binding IQ motif. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 13503–13511. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.13503>
- Müller, K., Brenner, D., Weydt, P., Meyer, T., Grehl, T., Petri, S., Grosskreutz, J., Schuster, J., Volk, A. E., Borck, G., Kubisch, C., Klopstock, T., Zeller, D., Jablonka, S., Sendtner, M., Klebe, S., Knehr, A., Günther, K., Weis, J., ... Weishaupt, J. H. (2018). Comprehensive analysis of the mutation spectrum in 301 German ALS families. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 89(8), 817–827. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317611>
- Murphy, E. J., Stiles, T., & Schroeder, F. (2000). Sterol carrier protein-2 expression alters phospholipid content and fatty acyl composition in L-cell fibroblasts. *Journal of Lipid Research*, 41(5), 788–796. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10787439>
- Murphy, S. E., & Levine, T. P. (2016). VAP, a Versatile Access Point for the Endoplasmic Reticulum: Review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(8 Pt B), 952–961. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.02.009>
- Murugesan, S., Nirmalkar, K., Hoyo-Vadillo, C., García-Espitia, M., Ramírez-Sánchez, D., & García-

- Mena, J. (2018). Gut microbiome production of short-chain fatty acids and obesity in children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 37(4), 621–625. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3143-0>
- Naidoo, N. (2009). ER and aging-Protein folding and the ER stress response. *Ageing Research Reviews*, 8(3), 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.03.001>
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., & Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature*, 403(6765), 98–103. <https://doi.org/10.1038/47513>
- Nakaya, T., Alexiou, P., Maragkakis, M., Chang, A., & Mourelatos, Z. (2013a). FUS regulates genes coding for RNA-binding proteins in neurons by binding to their highly conserved introns. *Rna*, 19(4), 498–509. <https://doi.org/10.1261/rna.037804.112>
- Nakaya, T., Alexiou, P., Maragkakis, M., Chang, A., & Mourelatos, Z. (2013b). FUS regulates genes coding for RNA-binding proteins in neurons by binding to their highly conserved introns. *RNA (New York, N.Y.)*, 19(4), 498–509. <https://doi.org/10.1261/rna.037804.112>
- Nakaya, T., & Maragkakis, M. (2018). Amyotrophic Lateral Sclerosis associated FUS mutation shortens mitochondria and induces neurotoxicity. *Scientific Reports*, 8(1), 15575. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33964-0>
- Nelson, T. J., Sun, M. K., Hongpaisan, J., & Alkon, D. L. (2008). Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *European Journal of Pharmacology*, 585(1), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.051>
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796), 130–133. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>
- Newpher, T. M., & Ehlers, M. D. (2008). Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron*, 58(4), 472–497. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.030>
- Ngoh, A., Mctague, A., Wentzensen, I. M., Meyer, E., Applegate, C., Kossoff, E. H., Batista, D. A., Wang, T., & Kurian, M. A. (2014). Severe infantile epileptic encephalopathy due to mutations in PLCB1: Expansion of the genotypic and phenotypic disease spectrum. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 56(11), 1124–1128. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12450>
- Nicholls, D. G., & Budd, S. L. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiological Reviews*, 80(1), 315–360. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.315>
- Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J., & Filip, M. (2016). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 4094–4125.

<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9337-5>

- Nishimura, A. L., Mitne-Neto, M., Silva, H. C. A., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J. R. M., Gillingwater, T., Webb, J., Skehel, P., & Zatz, M. (2004). A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *American Journal of Human Genetics*, *75*(5), 822–831. <https://doi.org/10.1086/425287>
- Nishimura, Y., Hayashi, M., Inada, H., & Tanaka, T. (1999). Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *254*(1), 21–26. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9876>
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., & Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & Development*, *16*(11), 1345–1355. <https://doi.org/10.1101/gad.992302>
- O'Reilly, É. J., Bjornevik, K., Furtado, J. D., Kolonel, L. N., Le Marchand, L., McCullough, M. L., Stevens, V. L., Shadyab, A. H., Snetselaar, L., Manson, J. E., & Ascherio, A. (2020). Prediagnostic plasma polyunsaturated fatty acids and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, *94*(8), e811–e819. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008676>
- O'Rourke, J. G., Bogdanik, L., Yáñez, A., Lall, D., Wolf, A. J., Muhammad, A. K. M. G., Ho, R., Carmona, S., Vit, J. P., Zarrow, J., Kim, K. J., Bell, S., Harms, M. B., Miller, T. M., Dangler, C. A., Underhill, D. M., Goodridge, H. S., Lutz, C. M., & Baloh, R. H. (2016). C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *351*(6279), 1324–1329. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1064>
- Ogbu, D., Zhang, Y., Claud, K., Xia, Y., & Sun, J. (2022). Dietary butyrate treatment enhances healthy metabolites by longitudinal untargeted metabolomic analysis in amyotrophic lateral sclerosis mice. *BioRxiv*, 2022.01.15.476456. <http://biorxiv.org/content/early/2022/01/18/2022.01.15.476456.abstract>
- Ohba, T., Holt, J. A., Billheimer, J. T., & Strauss, J. F. (1995). Human Sterol Carrier Protein x/Sterol Carrier Protein 2 Gene Has Two Promoters. *Biochemistry*, *34*(33), 10660–10668. <https://doi.org/10.1021/bi00033a042>
- Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine-Aizawa, Y., & Hirokawa, N. (1995). The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell*, *81*(5), 769–780. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90538-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90538-3)
- Onesto, E., Colombrita, C., Gumina, V., Borghi, M. O., Dusi, S., Doretti, A., Fagiolarì, G., Invernizzi, F., Moggio, M., Tiranti, V., Silani, V., & Ratti, A. (2016). Gene-specific mitochondria dysfunctions in human TARDBP and C9ORF72 fibroblasts. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0316-5>

- Ong, K. C., & Wong, K. T. (2015). Understanding Enterovirus 71 Neuropathogenesis and Its Impact on Other Neurotropic Enteroviruses. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 25(5), 614–624. <https://doi.org/10.1111/bpa.12279>
- Onozato, T., Nakahara, A., Suzuki-Kouyama, E., Hineno, A., Yasude, T., Nakamura, T., Yahikozawa, H., Watanabe, M., Kayanuma, K., Makishita, H., Ohara, S., Hashimoto, T., Higuchi, K., Sakai, T., Asano, K., Hashimoto, T., Kanno, H., Nakayama, J., & Oyanagi, K. (2016). Axonal TDP-43 aggregates in sporadic amyotroOnozato, T., Nakahara, A., Suzuki-Kouyama, E., Hineno, A., Yasude, T., Nakamura, T., Yahikozawa, H., Watanabe, M., Kayanuma, K., Makishita, H., Ohara, S., Hashimoto, T., Higuchi, K., Sakai, T., Asano, K., Hashim. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 42(6), 561–572. <https://doi.org/10.1111/nan.12310>
- Orozco, D., Tahirovic, S., Rentzsch, K., Schwenk, B. M., Haass, C., & Edbauer, D. (2012). Loss of fused in sarcoma (FUS) promotes pathological Tau splicing. *EMBO Reports*, 13(8), 759–764. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.90>
- Oskarsson, B., Horton, D. K., & Mitsumoto, H. (2015). Potential Environmental Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurologic Clinics*, 33(4), 877–888. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2015.07.009>
- Panas, M. D., Ivanov, P., & Anderson, P. (2016). Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics. *The Journal of Cell Biology*, 215(3), 313–323. <https://doi.org/10.1083/jcb.201609081>
- Pansarasa, O., Bordoni, M., Diamanti, L., Sproviero, D., Gagliardi, S., & Cereda, C. (2018). Sod1 in amyotrophic lateral sclerosis: “ambivalent” behavior connected to the disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms19051345>
- Pansarasa, O., Bordoni, M., Drufuca, L., Diamanti, L., Sproviero, D., Trotti, R., Bernuzzi, S., La Salvia, S., Gagliardi, S., Ceroni, M., & Cereda, C. (2018). Lymphoblastoid cell lines as a model to understand amyotrophic lateral sclerosis disease mechanisms. *Disease Models & Mechanisms*, 11(3). <https://doi.org/10.1242/dmm.031625>
- Papiani, G., Ruggiano, A., Fossati, M., Raimondi, A., Bertoni, G., Francolini, M., Benfante, R., Navone, F., & Borgese, N. (2012). Restructured endoplasmic reticulum generated by mutant amyotrophic lateral sclerosis-linked VAPB is cleared by the proteasome. *Journal of Cell Science*, 125(15), 3601–3611. <https://doi.org/10.1242/jcs.102137>
- Parakh, S., Perri, E. R., Jagaraj, C. J., Ragagnin, A. M. G., & Atkin, J. D. (2018). Rab-dependent cellular trafficking and amyotrophic lateral sclerosis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 53(6), 623–651. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1553926>
- Pardo, C. A., Xu, Z., Borchelt, D. R., Price, D. L., Sisodia, S. S., & Cleveland, D. W. (1995). Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), 954–958. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.954>
- Park, J. H., Elpers, C., Reunert, J., McCormick, M. L., Mohr, J., Biskup, S., Schwartz, O., Rust, S.,



- Grüneberg, M., Seelhöfer, A., Schara, U., Boltshauser, E., Spitz, D. R., & Marquardt, T. (2019). SOD1 deficiency: a novel syndrome distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : A Journal of Neurology*, *142*(8), 2230–2237. <https://doi.org/10.1093/brain/awz182>
- Park, J., Wang, Q., Wu, Q., Mao-Draayer, Y., & Kim, C. H. (2019). Author Correction: Bidirectional regulatory potentials of short-chain fatty acids and their G-protein-coupled receptors in autoimmune neuroinflammation (Scientific Reports, (2019), 9, 1, (8837), 10.1038/s41598-019-45311-y). *Scientific Reports*, *9*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54276-x>
- Park, W. J., Kothapalli, K. S. D., Lawrence, P., Tyburczy, C., & Brenna, J. T. (2009). An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product Delta8-desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3. *Journal of Lipid Research*, *50*(6), 1195–1202. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800630-JLR200>
- Parry, G. J., Rodrigues, C. M. P., Aranha, M. M., Hilbert, S. J., Davey, C., Kelkar, P., Low, W. C., & Steer, C. J. (2010). Safety, tolerability, and cerebrospinal fluid penetration of ursodeoxycholic Acid in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neuropharmacology*, *33*(1), 17–21. <https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e3181c47569>
- Pascale, A., Marchesi, N., Marelli, C., Coppola, A., Luzi, L., Govoni, S., Giustina, A., & Gazzaruso, C. (2018). Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine*, *61*(3), 357–371. <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1605-5>
- Pasinelli, P., Belford, M. E., Lennon, N., Bacskai, B. J., Hyman, B. T., Trotti, D., & Brown, R. H. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron*, *43*(1), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.021>
- Pavio, N., Couderc, T., Girard, S., Sgro, J. Y., Blondel, B., & Colbère-Garapin, F. (2000). Expression of mutated poliovirus receptors in human neuroblastoma cells persistently infected with poliovirus. *Virology*, *274*(2), 331–342. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0462>
- Payne, B. A. I., & Chinnery, P. F. (2015). Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1847*(11), 1347–1353. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2015.05.022>
- Pedrini, S., Sau, D., Guareschi, S., Bogush, M., Brown, R. H., Nanche, N., Kia, A., Trotti, D., & Pasinelli, P. (2010). ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Human Molecular Genetics*, *19*(15), 2974–2986. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq202>
- Pereira, A. C., Gray, J. D., Kogan, J. F., Davidson, R. L., Rubin, T. G., Okamoto, M., Morrison, J. H., & McEwen, B. S. (2017). Age and Alzheimer's disease gene expression profiles reversed by the glutamate modulator riluzole. *Molecular Psychiatry*, *22*(2), 296–305. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.33>
- Pfeffer, S. R. (2017). Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic

- pathways. *Molecular Biology of the Cell*, 28(6), 712–715. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-10-0737>
- Phadke, S. R., Gupta, N., Girisha, K. M., Kabra, M., Maeda, M., Vidal, E., Moser, A., Steinberg, S., Puri, R. D., Verma, I. C., & Braverman, N. (2010). Rhizomelic chondrodysplasia punctata type 1: Report of mutations in 3 children from India. *Journal of Applied Genetics*, 51(1), 107–110. <https://doi.org/10.1007/BF03195717>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Philips, T., & Robberecht, W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *The Lancet. Neurology*, 10(3), 253–263. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70015-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70015-1)
- Phillips, M. J., & Voeltz, G. K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(2), 69–82. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.8>
- Pickles, S., Destroismaisons, L., Peyrard, S. L., Cadot, S., Rouleau, G. A., Brown, R. H., Julien, J. P., Arbour, N., & Velde, C. Vande. (2013). Mitochondrial damage revealed by immunoselection for ALS-linked misfolded SOD1. *Human Molecular Genetics*, 22(19), 3947–3959. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt249>
- Pidcock, S. E., Skvortsov, T., Santos, F. G., Courtney, S. J., Sui-Ting, K., Creevey, C. J., & Huws, S. A. (2021). Phylogenetic systematics of *Butyrivibrio* and *Pseudobutyrvibrio* genomes illustrate vast taxonomic diversity, open genomes and an abundance of carbohydrate-active enzyme family isoforms. *Microbial Genomics*, 7(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000638>
- Pinarbasi, E. S., Cağatay, T., Fung, H. Y. J., Li, Y. C., Chook, Y. M., & Thomas, P. J. (2018). Active nuclear import and passive nuclear export are the primary determinants of TDP-43 localization. *Scientific Reports*, 8(1), 7083. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25008-4>
- PM, A. (2006). Amyotrophic Lateral Sclerosis Associated with Mutations in the CuZn Superoxide Dismutase Gene. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 6(1), 37–46.
- Poduri, A., Chopra, S. S., Neilan, E. G., Elhosary, P. C., Kurian, M. A., Meyer, E., Barry, B. J., Khwaja, O. S., Salih, M. A. M., Stödberg, T., Scheffer, I. E., Maher, E. R., Sahin, M., Wu, B.-L., Berry, G. T., Walsh, C. A., Picker, J., & Kothare, S. V. (2012). Homozygous PLCB1 deletion associated with malignant migrating partial seizures in infancy. *Epilepsia*, 53(8), e146-50. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03538.x>
- Poli, A., Faenza, I., Chiarini, F., Matteucci, A., McCubrey, J. A., & Cocco, L. (2013). K562 cell proliferation is modulated by PLCβ1 through a PKCα-mediated pathway. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(11), 1713–1721. <https://doi.org/10.4161/cc.24806>

- Polymeridou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K. R., Huelga, S. C., Moran, J., Liang, T. Y., Ling, S.-C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., Kordasiewicz, H., Sedaghat, Y., Donohue, J. P., Shiue, L., Bennett, C. F., Yeo, G. W., & Cleveland, D. W. (2011). Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature Neuroscience*, *14*(4), 459–468. <https://doi.org/10.1038/nn.2779>
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., & Spang, A. (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell*, *141*(3), 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.011>
- Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A., & Patel, B. K. (2019). Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*, 25. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00025>
- Primec, M., Mičetić-Turk, D., & Langerholc, T. (2017). Analysis of short-chain fatty acids in human feces: A scoping review. *Analytical Biochemistry*, *526*, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.03.007>
- Prinz, W. A., Toulmay, A., & Balla, T. (2020). The functional universe of membrane contact sites. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(1), 7–24. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0180-9>
- Proctor, E. A., Mowrey, D. D., & Dokholyan, N. V. (2019).  $\beta$ -Methylamino-L-alanine substitution of serine in SOD1 suggests a direct role in ALS etiology. *PLoS Computational Biology*, *15*(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007225>
- Pryor, W. A., & Squadrito, G. L. (1995). The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *268*(5 12-5). <https://doi.org/10.1152/ajplung.1995.268.5.l699>
- Qiu, H., Lee, S., Shang, Y., Wang, W. Y., Au, K. F., Kamiya, S., Barmada, S. J., Finkbeiner, S., Lui, H., Carlton, C. E., Tang, A. A., Oldham, M. C., Wang, H., Shorter, J., Filiano, A. J., Roberson, E. D., Tourtellotte, W. G., Chen, B., Tsai, L. H., & Huang, E. J. (2014). ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(3), 981–999. <https://doi.org/10.1172/JCI72723>
- Qiu, L., Qiao, T., Beers, M., Tan, W., Wang, H., Yang, B., & Xu, Z. (2013). Widespread aggregation of mutant VAPB associated with ALS does not cause motor neuron degeneration or modulate mutant SOD1 aggregation and toxicity in mice. *Molecular Neurodegeneration*, *8*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-1>
- Ramírez-Nuñez, O., Jové, M., Torres, P., Sol, J., Fontdevila, L., Romero-Guevara, R., Andrés-Benito, P., Ayala, V., Rossi, C., Boada, J., Povedano, M., Ferrer, I., Pamplona, R., & Portero-Otin, M. (2021). Nuclear lipidome is altered in amyotrophic lateral sclerosis: A pilot study. *Journal of Neurochemistry*, *158*(2), 482–499. <https://doi.org/10.1111/jnc.15373>
- Ratti, A., & Buratti, E. (2016). Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS

- proteins. *Journal of Neurochemistry*, 138 Suppl, 95–111. <https://doi.org/10.1111/jnc.13625>
- Ravits, J. (2005). Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: A hypothesis of persistent (non-lytic) enteroviral infection. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 6(2), 77–87. <https://doi.org/10.1080/14660820510027026>
- Reichardt, N., Duncan, S. H., Young, P., Belenguer, A., McWilliam Leitch, C., Scott, K. P., Flint, H. J., & Louis, P. (2014). Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME Journal*, 8(6), 1323–1335. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.14>
- Reid, E., Kloos, M., Ashley-Koch, A., Hughes, L., Bevan, S., Svenson, I. K., Graham, F. L., Gaskell, P. C., Dearlove, A., Pericak-Vance, M. A., Rubinsztein, D. C., & Marchuk, D. A. (2002). A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *American Journal of Human Genetics*, 71(5), 1189–1194. <https://doi.org/10.1086/344210>
- Rhoades, R. E., Tabor-Godwin, J. M., Tsueng, G., & Feuer, R. (2011). Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology*, 411(2), 288–305. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.014>
- Richards, R. I. (2001). Dynamic mutations: A decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Human Molecular Genetics*, 10(20), 2187–2194. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.20.2187>
- Rinaldi, C., & Wood, M. J. A. (2018). Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nature Reviews. Neurology*, 14(1), 9–21. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.148>
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122(5), 735–749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.043>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed Research International*, 2017, 9351507. <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), 566–578. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Roediger, W. E. (1980). Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*, 21(9), 793–798. <https://doi.org/10.1136/gut.21.9.793>
- Rogelj, B., Easton, L. E., Bogu, G. K., Stanton, L. W., Rot, G., Curk, T., Zupan, B., Sugimoto, Y., Modic, M., Haberman, N., Tollervey, J., Fujii, R., Takumi, T., Shaw, C. E., & Ule, J. (2012). Widespread

- binding of FUS along nascent RNA regulates alternative splicing in the brain. *Scientific Reports*, 2, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep00603>
- Rohrer, J. D., Isaacs, A. M., Mizielinska, S., Mead, S., Lashley, T., Wray, S., Sidle, K., Fratta, P., Orrell, R. W., Hardy, J., Holton, J., Revesz, T., Rossor, M. N., & Warren, J. D. (2015). C9orf72 expansions in frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet. Neurology*, 14(3), 291–301. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70233-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70233-9)
- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>
- Root, J., Merino, P., Nuckols, A., Johnson, M., & Kukar, T. (2021). Lysosome dysfunction as a cause of neurodegenerative diseases: Lessons from frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 154, 105360. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105360>
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., & Deng, H. X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59–62. <https://doi.org/10.1038/362059a0>
- Rossor, A. M., Reilly, M. M., & Sleight, J. N. (2018). Antisense oligonucleotides and other genetic therapies made simple. *Practical Neurology*, 18(2), 126–131. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2017-001764>
- Rothstein, J. D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., & Kuncl, R. W. (1993). Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14), 6591–6595. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6591>
- Rouleau, G. A., Clark, A. W., Rooke, K., Pramatarova, A., Krizus, A., Suchowersky, O., Julien, J. P., & Figlewicz, D. (1996). SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 39(1), 128–131. <https://doi.org/10.1002/ana.410390119>
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(5), 313–323. <https://doi.org/10.1038/nri2515>
- Rowin, J., Xia, Y., Jung, B., & Sun, J. (2017). Gut inflammation and dysbiosis in human motor neuron disease. *Physiological Reports*, 5(18), 1–6. <https://doi.org/10.14814/phy2.13443>
- Russell, M. R. G., Shideler, T., Nickerson, D. P., West, M., & Odorizzi, G. (2012). Class E compartments form in response to ESCRT dysfunction in yeast due to hyperactivity of the Vps21 Rab GTPase. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 21), 5208–5220. <https://doi.org/10.1242/jcs.111310>
- Saccon, R. A., Bunton-Stasyshyn, R. K. A., Fisher, E. M. C., & Fratta, P. (2013). Is SOD1 loss of function

- involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain : A Journal of Neurology*, 136(Pt 8), 2342–2358. <https://doi.org/10.1093/brain/awt097>
- Salyers, A. A., Gupta, A., & Wang, Y. (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology*, 12(9), 412–416. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.07.004>
- Sama, R. R. K., Ward, C. L., Kaushansky, L. J., Lemay, N., Ishigaki, S., Urano, F., & Bosco, D. A. (2013). FUS/TLS assembles into stress granules and is a prosurvival factor during hyperosmolar stress. *Journal of Cellular Physiology*, 228(11), 2222–2231. <https://doi.org/10.1002/jcp.24395>
- Saraswati, S., & Sitaraman, R. (2015). Aging and the human gut microbiota—from correlation to causality. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00764>
- Sasaki, S., & Iwata, M. (1996). Dendritic synapses of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis: An ultrastructural study. *Acta Neuropathologica*, 91(3), 278–283. <https://doi.org/10.1007/s004010050426>
- Sasaki, S., & Iwata, M. (1999). Ultrastructural change of synapses of Betz cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 268(1), 29–32. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00374-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00374-2)
- Sasaki, S., & Iwata, M. (2007). Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(1), 10–16. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31802c396b>
- Scallan, T. J., Pastuszyn, A., Noland, B. J., Chanderbhan, R., Kharroubi, A., & Vahouny, G. V. (1985). Sterol carrier and lipid transfer proteins. *Chemistry and Physics of Lipids*, 38(3), 239–261. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(85\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0009-3084(85)90019-2)
- Schmitz, A., Pinheiro Marques, J., Oertig, I., Maharjan, N., & Saxena, S. (2021). Emerging Perspectives on Dipeptide Repeat Proteins in C9ORF72 ALS/FTD. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.637548>
- Schwartz, S. L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., & Wandinger-Ness, A. (2008). Erratum: Rab GTPases at a glance (Journal of Cell Science (2006) vol. 120 (3905-3910)). *Journal of Cell Science*, 121(2), 246. <https://doi.org/10.1242/jcs.03495>
- Sellier, C., Campanari, M.-L., Julie Corbier, C., Gaucherot, A., Kolb-Cheynel, I., Oulad-Abdelghani, M., Ruffenach, F., Page, A., Ciura, S., Kabashi, E., & Charlet-Berguerand, N. (2016). Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. *The EMBO Journal*, 35(12), 1276–1297. <https://doi.org/10.15252/embj.201593350>
- Selvanantham, T., Lin, Q., Guo, C. X., Surendra, A., Fieve, S., Escalante, N. K., Guttman, D. S., Streutker, C. J., Robertson, S. J., Philpott, D. J., & Mallewaey, T. (2016). NKT Cell-Deficient Mice Harbor an Altered Microbiota That Fuels Intestinal Inflammation during Chemically Induced Colitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 197(11), 4464–4472.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601410>

- Sengelaub, C. A., Navrazhina, K., Ross, J. B., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2016). PTPRN2 and PLC $\beta$ 1 promote metastatic breast cancer cell migration through PI(4,5)P $_2$ -dependent actin remodeling. *The EMBO Journal*, *35*(1), 62–76. <https://doi.org/10.15252/embj.201591973>
- Sephton, C. F., Good, S. K., Atkin, S., Dewey, C. M., Mayer, P., Herz, J., & Yu, G. (2010). TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(9), 6826–6834. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.061846>
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*, *8*(5), 349–361. <https://doi.org/10.1038/nri2294>
- Seshadri, R., Leahy, S. C., Attwood, G. T., Teh, K. H., Lambie, S. C., Cookson, A. L., Eloie-Fadrosch, E. A., Pavlopoulos, G. A., Hadjithomas, M., Varghese, N. J., Paez-Espino, D., Hungate1000 project collaborators, Perry, R., Henderson, G., Creevey, C. J., Terrapon, N., Lapebie, P., Drula, E., Lombard, V., ... Kelly, W. J. (2018). Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. *Nature Biotechnology*, *36*(4), 359–367. <https://doi.org/10.1038/nbt.4110>
- Shang, Y., & Huang, E. J. (2016). Mechanisms of FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research*, *1647*, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.03.036>
- Sharma, A., Lyashchenko, A. K., Lu, L., Nasrabady, S. E., Elmaleh, M., Mendelsohn, M., Nemes, A., Tapia, J. C., Mentis, G. Z., & Shneider, N. A. (2016). ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nature Communications*, *7*, 10465. <https://doi.org/10.1038/ncomms10465>
- Shaw, P. J., Ince, P. G., Falkous, G., & Mantle, D. (1995). Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Annals of Neurology*, *38*(4), 691–695. <https://doi.org/10.1002/ana.410380424>
- Shen, Z. H., Zhu, C. X., Quan, Y. S., Yang, Z. Y., Wu, S., Luo, W. W., Tan, B., & Wang, X. Y. (2018). Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World Journal of Gastroenterology*, *24*(1), 5–14. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i1.5>
- Sheng, S., Li, X., Zhao, S., Zheng, C., & Zhang, F. (2023). Effects of levodopa on gut bacterial antibiotic resistance in Parkinson's disease rat. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *15*, 1122712. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1122712>
- Shi, M., Stencel, K., & Borowski, M. (2011). *HUMAN EMBRYONIC STEM*. 129–137.
- Shi, Y., Lin, S., Staats, K. A., Li, Y., Chang, W.-H., Hung, S.-T., Hendricks, E., Linares, G. R., Wang, Y., Son, E. Y., Wen, X., Kisler, K., Wilkinson, B., Menendez, L., Sugawara, T., Woolwine, P., Huang, M., Cowan, M. J., Ge, B., ... Ichida, J. K. (2018). Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in

- C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nature Medicine*, 24(3), 313–325. <https://doi.org/10.1038/nm.4490>
- 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 Research*, 917(1), 97–104. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02926-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02926-2)
- Shin, N.-R., Whon, T. W., & Bae, J.-W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 33(9), 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- Sidibé, H., Khalfallah, Y., Xiao, S., Gómez, N. B., Fakim, H., Tank, E. M. H., Di Tomasso, G., Bareke, E., Aulas, A., McKeever, P. M., Melamed, Z., Destroimaisons, L., Deshaies, J.-E., Zinman, L., Parker, J. A., Legault, P., Tétreault, M., Barmada, S. J., Robertson, J., & Vande Velde, C. (2021). TDP-43 stabilizes G3BP1 mRNA: relevance to amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia. *Brain : A Journal of Neurology*, 144(11), 3461–3476. <https://doi.org/10.1093/brain/awab217>
- Simonsen, A., Lippé, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M., & Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*, 394(6692), 494–498. <https://doi.org/10.1038/28879>
- Simpson, E. P., Henry, Y. K., Henkel, J. S., Smith, R. G., & Appel, S. H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: A potential biomarker of disease burden. *Neurology*, 62(10), 1758–1765. <https://doi.org/10.1212/WNL.62.10.1758>
- Singh, G., & Khurana, D. (2009). Neurology of acute organophosphate poisoning. *Neurology India*, 57(2), 119–125. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.51277>
- Singh, Mahavir, Kapoor, A., & Bhatnagar, A. (2021). Physiological and Pathological Roles of Aldose Reductase. *Metabolites*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/metabo11100655>
- Singh, Meharban. (2005). Essential fatty acids, DHA human brain. *Indian Journal of Pediatrics*, 72(3), 239–242. <https://doi.org/10.1007/BF02859265>
- Skehel, P. A., Martin, K. C., Kandel, E. R., & Bartsch, D. (1995). A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science*, 269(5230), 1580–1583. <https://doi.org/10.1126/science.7667638>
- Smith, E. F., Shaw, P. J., & De Vos, K. J. (2019). The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 710, 132933. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.052>
- Smith, K. R., Corvalán, C. F., & Kjellström, T. (1999). How much global ill health is attributable to environmental factors? *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 10(5), 573–584. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10468437>
- Smith, R. A., Miller, T. M., Yamanaka, K., Monia, B. P., Condon, T. P., Hung, G., Lobsiger, C. S., Ward, C. M., McAlonis-Downes, M., Wei, H., Wancewicz, E. V., Bennett, C. F., & Cleveland, D. W.



- (2006). Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(8), 2290–2296. <https://doi.org/10.1172/JCI25424>
- Smith, R. G., Henry, Y. K., Mattson, M. P., & Appel, S. H. (1998). Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 44(4), 696–699. <https://doi.org/10.1002/ana.410440419>
- Soldati, T., Rancaño, C., Geissler, H., & Pfeffer, S. R. (1995). Rab7 and Rab9 are recruited onto late endosomes by biochemically distinguishable processes. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(43), 25541–25548. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25541>
- Solomon, S., Xu, Y., Wang, B., David, M. D., Schubert, P., Kennedy, D., & Schrader, J. W. (2007). Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ , entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 27(6), 2324–2342. <https://doi.org/10.1128/MCB.02300-06>
- Song, H., & Endow, S. A. (1998). Decoupling of nucleotide- and microtubule-binding sites in a kinesin mutant. *Nature*, 396(6711), 587–590. <https://doi.org/10.1038/25153>
- Song, L., Sun, Q., Zheng, H., Zhang, Y., Wang, Y., Liu, S., & Duan, L. (2022). Roseburia hominis Alleviates Neuroinflammation via Short-Chain Fatty Acids through Histone Deacetylase Inhibition. *Molecular Nutrition & Food Research*, 66(18), e2200164. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200164>
- Sozen, E., Karademir, B., & Ozer, N. K. (2015). Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 78, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.031>
- Spyridakis, S., Leondaritis, G., Nakos, G., Lekka, M. E., & Galanopoulou, D. (2010). A specific phospholipase C activity regulates phosphatidylinositol levels in lung surfactant of patients with acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(3), 357–362. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0078OC>
- Stackebrandt, E., Murray, R. G. E., & Truper, H. G. (1988). Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives.” *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(3), 321–325. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-3-321>
- Stazi, G., Battistelli, C., Piano, V., Mazzone, R., Marrocco, B., Marchese, S., Louie, S. M., Zwergel, C., Antonini, L., Patsilinos, A., Ragno, R., Viviano, M., Sbardella, G., Ciogli, A., Fabrizi, G., Cirilli, R., Strippoli, R., Marchetti, A., Tripodi, M., ... Valente, S. (2019). Development of alkyl glycerone phosphate synthase inhibitors: Structure-activity relationship and effects on ether lipids and epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 163, 722–735. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.050>
- Steele, A. J., Al-Chalabi, A., Ferrante, K., Cudkowicz, M. E., Brown, R. H., & Garson, J. A. (2005). Detection of serum reverse transcriptase activity in patients with ALS and unaffected blood

- relatives. *Neurology*, 64(3), 454–458. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000150899.76130.71>
- Steinberg, S. F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiological Reviews*, 88(4), 1341–1378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2007>
- Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lütcke, A., Gruenberg, J., & Zerial, M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *The EMBO Journal*, 13(6), 1287–1296. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06381.x>
- Steyn, F. J., Ioannides, Z. A., van Eijk, R. P. A., Heggie, S., Thorpe, K. A., Ceslis, A., Heshmat, S., Henders, A. K., Wray, N. R., van den Berg, L. H., Henderson, R. D., McCombe, P. A., & Ngo, S. T. (2018). Hypermetabolism in ALS is associated with greater functional decline and shorter survival. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 89(10), 1016–1023. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317887>
- Stieber, A., Gonatas, J. O., & Gonatas, N. K. (2000). Aggregation of ubiquitin and a mutant ALS-linked SOD1 protein correlate with disease progression and fragmentation of the Golgi apparatus. *Journal of the Neurological Sciences*, 173(1), 53–62. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(99\)00300-7](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(99)00300-7)
- Stipanuk, M. H. (2018). *Biochemical, physiological, and molecular aspects of human nutrition*. Elsevier health sciences. [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=fEpVDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=5VWF3eBArJ&sig=d0D3brvhTIXSuT7fcai2Rr6rNpo&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=fEpVDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=5VWF3eBArJ&sig=d0D3brvhTIXSuT7fcai2Rr6rNpo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Stø, K., Valeur, J., Ueland, T., Malmstrøm, G. H., Bjerkeli, V., Trøseid, M., Hov, J. R., Holm, K., Vestad, B., Halvorsen, B., Skjelland, M., & Skagen, K. R. (2022). Fecal level of butyric acid, a microbiome-derived metabolite, is increased in patients with severe carotid atherosclerosis. *Scientific Reports*, 12(1), 22378. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26759-x>
- Stojanov, S., Berlec, A., & Štrukelj, B. (2020). The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*, 8(11), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>
- Stoll, C., Don, B., Roth, M.-P., & Alembik, Y. (1989). Birth prevalence rates dysplasias of ske leta I. *Clinical Genetics*, 35, 88–92.
- Stolowich, N., Frolov, A., Petrescu, A. D., Scott, A. I., Billheimer, J. T., & Schroeder, F. (1999). Holo-sterol carrier protein-2. (13)C NMR investigation of cholesterol and fatty acid binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 35425–35433. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35425>
- Sullivan, P. M., Zhou, X., Robins, A. M., Paushter, D. H., Kim, D., Smolka, M. B., & Hu, F. (2016). The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0324-5>

- Sun, J., Zhan, Y., Mariosa, D., Larsson, H., Almqvist, C., Ingre, C., Zagai, U., Pawitan, Y., & Fang, F. (2019). Antibiotics use and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Sweden. *European Journal of Neurology*, 26(11), 1355–1361. <https://doi.org/10.1111/ene.13986>
- Sun, Y. min, Dong, Y., Wang, J., Lu, J. hong, Chen, Y., & Wu, J. jun. (2017). A novel mutation of VAPB in one Chinese familial amyotrophic lateral sclerosis pedigree and its clinical characteristics. *Journal of Neurology*, 264(12), 2387–2393. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8628-3>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007a). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007b). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takamori, S. (2006). VGLUTs: “Exciting” times for glutamatergic research? *Neuroscience Research*, 55(4), 343–351. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.04.016>
- Tam, O. H., Rozhkov, N. V., Shaw, R., Kim, D., Hubbard, I., Fennessey, S., Propp, N., NYGC ALS Consortium, Fagegaltier, D., Harris, B. T., Ostrow, L. W., Phatnani, H., Ravits, J., Dubnau, J., & Gale Hammell, M. (2019). Postmortem Cortex Samples Identify Distinct Molecular Subtypes of ALS: Retrotransposon Activation, Oxidative Stress, and Activated Glia. *Cell Reports*, 29(5), 1164–1177.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.066>
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., & Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in Immunology*, 121, 91–119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
- TAYLOR, C. W., & RICHARDSON, A. (1993). Structure and Function of Inositol Trisphosphate Receptors. *Intracellular Messengers*, 51(1989), 199–254. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-042184-1.50012-3>
- Taylor, J. P., & Cleveland, D. W. (2017). *HHS Public Access*. 539(7628), 197–206. <https://doi.org/10.1038/nature20413>.Decoding
- Tett, A., Pasolli, E., Masetti, G., Ercolini, D., & Segata, N. (2021). Prevotella diversity, niches and interactions with the human host. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(9), 585–599. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00559-y>
- Teuling, E., Ahmed, S., Haasdijk, E., Demmers, J., Steinmetz, M. O., Akhmanova, A., Jaarsma, D., & Hoogenraad, C. C. (2007). Motor neuron disease-associated mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) B recruits wild-type VAPs into endoplasmic

- reticulum-derived tubular aggregates. *Journal of Neuroscience*, 27(36), 9801–9815. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2661-07.2007>
- THACKER, P. A., SALOMONS, M. O., AHERNE, F. X., MILLIGAN, L. P., & BOWLAND, J. P. (1981). Influence of Propionic Acid on the Cholesterol Metabolism of Pigs Fed Hypercholesterolemic Diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 61(4), 969–975. <https://doi.org/10.4141/cjas81-119>
- Therrien, M., Rouleau, G. A., Dion, P. A., & Parker, J. A. (2013). Deletion of C9ORF72 results in motor neuron degeneration and stress sensitivity in *C. elegans*. *PLoS One*, 8(12), e83450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083450>
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tilg, H., & Kaser, A. (2011). Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2126–2132. <https://doi.org/10.1172/JCI58109>
- Tollervey, J. R., Curk, T., Rogelj, B., Briese, M., Cereda, M., Kayikci, M., König, J., Hortobágyi, T., Nishimura, A. L., Zupunski, V., Patani, R., Chandran, S., Rot, G., Zupan, B., Shaw, C. E., & Ule, J. (2011). Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nature Neuroscience*, 14(4), 452–458. <https://doi.org/10.1038/nn.2778>
- Too, I. H. K., Yeo, H., Sessions, O. M., Yan, B., Libau, E. A., Howe, J. L. C., Lim, Z. Q., Suku-Maran, S., Ong, W. Y., Chua, K. B., Wong, B. S., Chow, V. T. K., & Alonso, S. (2016). Enterovirus 71 infection of motor neuron-like NSC-34 cells undergoes a non-lytic exit pathway. *Scientific Reports*, 6(November), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep36983>
- Torii, T., Kanemitsu, K., Wada, T., Itoh, S., Kinugawa, K., & Hagiwara, A. (2010). Measurement of short-chain fatty acids in human faeces using high-performance liquid chromatography: Specimen stability. *Annals of Clinical Biochemistry*, 47(5), 447–452. <https://doi.org/10.1258/acb.2010.010047>
- Torres, P., Cacabelos, D., Pairada, J., Bauer, K. C., Boada, J., Fontdevila, L., Rossi, C., Povedano, M., Ferrer, I., Pamplona, R., Finlay, B. B., Portero-Otín, M., & Ayala, V. (2020). Gender-Specific Beneficial Effects of Docosahexaenoic Acid Dietary Supplementation in G93A-SOD1 Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, 17(1), 269–281. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00808-2>
- Torres, P., Ramírez-Núñez, O., Romero-Guevara, R., Barés, G., Granado-Serrano, A. B., Ayala, V., Boada, J., Fontdevila, L., Povedano, M., Sanchís, D., Pamplona, R., Ferrer, I., & Portero-Otín, M. (2018). Cryptic exon splicing function of TARDBP interacts with autophagy in nervous tissue. *Autophagy*, 14(8), 1398–1403. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474311>
- Tourrière, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J. M., Bertrand, E., & Tazi, J. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *The Journal of Cell*

- Biology*, 160(6), 823–831. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212128>
- Tovar-Y-Romo, L. B., Santa-Cruz, L. D., & Tapia, R. (2009). Experimental models for the study of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Neurodegeneration*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-31>
- Tovar-Y-Romo, L. B., Zepeda, A., & Tapia, R. (2007). Vascular endothelial growth factor prevents paralysis and motoneuron death in a rat model of excitotoxic spinal cord neurodegeneration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(10), 913–922. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3181567c16>
- Tradewell, M. L., Yu, Z., Tibshirani, M., Boulanger, M. C., Durham, H. D., & Richard, S. (2012). Arginine methylation by prmt1 regulates nuclear-cytoplasmic localization and toxicity of FUS/TLS harbouring ALS-linked mutations. *Human Molecular Genetics*, 21(1), 136–149. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr448>
- Tremlett, H., Bauer, K. C., Appel-Cresswell, S., Finlay, B. B., & Waubant, E. (2017). The gut microbiome in human neurological disease: A review. *Annals of Neurology*, 81(3), 369–382. <https://doi.org/10.1002/ana.24901>
- Tudor, E. L., Galtrey, C. M., Perkinson, M. S., Lau, K. F., De Vos, K. J., Mitchell, J. C., Ackerley, S., Hortobágyi, T., Vámos, E., Leigh, P. N., Klasen, C., McLoughlin, D. M., Shaw, C. E., & Miller, C. C. J. (2010). Amyotrophic lateral sclerosis mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein-B transgenic mice develop TAR-DNA-binding protein-43 pathology. *Neuroscience*, 167(3), 774–785. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.035>
- Tury, A., Tolentino, K., & Zou, Y. (2014). Altered expression of atypical PKC and Ryk in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Developmental Neurobiology*, 74(8), 839–850. <https://doi.org/10.1002/dneu.22137>
- Ueda, J. I., Saito, N., Shimazu, Y., & Ozawa, T. (1996). A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 333(2), 377–384. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0404>
- Umaña, A., Sanders, B. E., Yoo, C. C., Casasanta, M. A., Udayasuryan, B., Verbridge, S. S., & Slade, D. J. (2019). Utilizing Whole Fusobacterium Genomes To Identify, Correct, and Characterize Potential Virulence Protein Families. *Journal of Bacteriology*, 201(23). <https://doi.org/10.1128/JB.00273-19>
- Umeda, T., Yamashita, T., Kimura, T., Ohnishi, K., Takuma, H., Ozeki, T., Takashima, A., Tomiyama, T., & Mori, H. (2013). Neurodegenerative disorder FTDP-17-related tau intron 10 +16C→T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. *American Journal of Pathology*, 183(1), 211–225. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.03.015>
- Umegaki, H., Hayashi, T., Nomura, H., Yanagawa, M., Nonogaki, Z., Nakshima, H., & Kuzuya, M. (2013). Cognitive dysfunction: An emerging concept of a new diabetic complication in the elderly. *Geriatrics and Gerontology International*, 13(1), 28–34. <https://doi.org/10.1111/j.1447->

0594.2012.00922.x

- Valentine, J. S., & Hart, P. J. (2003). Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 3617–3622. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730423100>
- Vallee, R. B., Shpetner, H. S., & Paschal, B. M. (1989). The role of dynein in retrograde axonal transport. *Trends in Neurosciences*, *12*(2), 66–70. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90138-0](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90138-0)
- van Blitterswijk, M., Gendron, T. F., Baker, M. C., DeJesus-Hernandez, M., Finch, N. A., Brown, P. H., Daugherty, L. M., Murray, M. E., Heckman, M. G., Jiang, J., Lagier-Tourenne, C., Edbauer, D., Cleveland, D. W., Josephs, K. A., Parisi, J. E., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Petrucelli, L., Boeve, B. F., ... Rademakers, R. (2015). Novel clinical associations with specific C9ORF72 transcripts in patients with repeat expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathologica*, *130*(6), 863–876. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1480-6>
- van Blitterswijk, M., van Es, M. A., Koppers, M., van Rheenen, W., Medic, J., Schelhaas, H. J., van der Kooij, A. J., de Visser, M., Veldink, J. H., & van den Berg, L. H. (2012). VAPB and C9orf72 mutations in 1 familial amyotrophic lateral sclerosis patient. *Neurobiology of Aging*, *33*(12), 2950.e1-4. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.004>
- Van den Bergh, R., Swerts, L., Hendrikx, A., Boni, L., & Meulepas, E. (1978). Adipose tissue cellularity in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *80*(4), 226–240. [https://doi.org/10.1016/S0303-8467\(78\)80013-4](https://doi.org/10.1016/S0303-8467(78)80013-4)
- Van Den Bosch, L., & Robberecht, W. (2000). Different receptors mediate motor neuron death induced by short and long exposures to excitotoxicity. *Brain Research Bulletin*, *53*(4), 383–388. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(00\)00371-3](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00371-3)
- Van Der Sluijs, P., Hull, M., Zahraoui, A., Tavitian, A., Goud, B., & Mellman, I. (1991). The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(14), 6313–6317. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.14.6313>
- van Olst, L., Roks, S. J. M., Kamermans, A., Verhaar, B. J. H., van der Geest, A. M., Muller, M., van der Flier, W. M., & de Vries, H. E. (2021). Contribution of Gut Microbiota to Immunological Changes in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Immunology*, *12*, 683068. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683068>
- Van Roermund, C. W. T., Ijlst, L., Wagemans, T., Wanders, R. J. A., & Waterham, H. R. (2014). A role for the human peroxisomal half-transporter ABCD3 in the oxidation of dicarboxylic acids. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1841*(4), 563–568. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.001>
- Vanlandingham, P. A., & Ceresa, B. P. (2009). Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *Journal of Biological Chemistry*,

- 284(18), 12110–12124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809277200>
- Vesth, T., Ozen, A., Andersen, S. C., Kaas, R. S., Lukjancenko, O., Bohlin, J., Nookaew, I., Wassenaar, T. M., & Ussery, D. W. (2013). Veillonella, Firmicutes: Microbes disguised as Gram negatives. *Standards in Genomic Sciences*, 9(2), 431–448. <https://doi.org/10.4056/sigs.2981345>
- Veyrat-Durebex, C., Bris, C., Codron, P., Bocca, C., Chupin, S., Corcia, P., Vourc'h, P., Hergesheimer, R., Cassereau, J., Funalot, B., Andres, C. R., Lenaers, G., Couratier, P., Reynier, P., & Blasco, H. (2019). Metabo-lipidomics of Fibroblasts and Mitochondrial-Endoplasmic Reticulum Extracts from ALS Patients Shows Alterations in Purine, Pyrimidine, Energetic, and Phospholipid Metabolisms. *Molecular Neurobiology*, 56(8), 5780–5791. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1484-7>
- Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T., & Curi, R. (2011). Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*, 3(10), 858–876. <https://doi.org/10.3390/nu3100858>
- Viola, M. V, Frazier, M., White, L., Brody, J., & Spiegelman, S. (1975). RNA-instructed DNA polymerase activity in a cytoplasmic particulate fraction in brains from Guamanian patients. *The Journal of Experimental Medicine*, 142(2), 483–494. <https://doi.org/10.1084/jem.142.2.483>
- Violante, S., Achetib, N., van Roermund, C. W. T., Hagen, J., Dodatko, T., Vaz, F. M., Waterham, H. R., Chen, H., Baes, M., Yu, C., Argmann, C. A., & Houten, S. M. (2019). Peroxisomes can oxidize medium- and long-chain fatty acids through a pathway involving ABCD3 and HSD17B4. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(3), 4355–4364. <https://doi.org/10.1096/fj.201801498R>
- Waibel, S., Neumann, M., Rabe, M., Meyer, T., & Ludolph, A. C. (2010). Novel missense and truncating mutations in FUS/TLS in familial ALS. *Neurology*, 75(9), 815–817. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f07e26>
- Wang, J., Xu, G., & Borchelt, D. R. (2006). Mapping superoxide dismutase 1 domains of non-native interaction: roles of intra- and intermolecular disulfide bonding in aggregation. *Journal of Neurochemistry*, 96(5), 1277–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03642.x>
- Wang, M.-D., Gomes, J., Cashman, N. R., Little, J., & Krewski, D. (2014). A meta-analysis of observational studies of the association between chronic occupational exposure to lead and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 56(12), 1235–1242. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000323>
- Wang, W., Wang, L., Lu, J., Siedlak, S. L., Fujioka, H., Liang, J., Jiang, S., Ma, X., Jiang, Z., da Rocha, E. L., Sheng, M., Choi, H., Lerou, P. H., Li, H., & Wang, X. (2016). The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. *Nature Medicine*, 22(8), 869–878. <https://doi.org/10.1038/nm.4130>
- Westeneng, H.-J., Debray, T. P. A., Visser, A. E., van Eijk, R. P. A., Rooney, J. P. K., Calvo, A., Martin, S., McDermott, C. J., Thompson, A. G., Pinto, S., Kobeleva, X., Rosenbohm, A., Stubendorff, B., Sommer, H., Middelkoop, B. M., Dekker, A. M., van Vugt, J. J. F. A., van Rheenen, W., Vajda, A.,

- ... van den Berg, L. H. (2018). Prognosis for patients with amyotrophic lateral sclerosis: development and validation of a personalised prediction model. *The Lancet. Neurology*, *17*(5), 423–433. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30089-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30089-9)
- Weydt, P., & Möller, T. (2005). Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*, *16*(6), 527–531. <https://doi.org/10.1097/00001756-200504250-00001>
- Willing, B. P., Russell, S. L., & Finlay, B. B. (2011). Shifting the balance: Antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(4), 233–243. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2536>
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, *51*(2), 221–271. <https://doi.org/10.1128/mr.51.2.221-271.1987>
- Wong, J. M. W., de Souza, R., Kendall, C. W. C., Emam, A., & Jenkins, D. J. A. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *40*(3), 235–243. <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>
- Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W., & Price, D. L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, *14*(6), 1105–1116. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90259-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90259-7)
- Woodall, C. J., Riding, M. H., Graham, D. I., & Clements, G. B. (1994). Sequences specific for enterovirus detected in spinal cord from patients with motor neurone disease. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *308*(6943), 1541–1543. <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6943.1541>
- Wu, S., Yi, J., Zhang, Y.-G., Zhou, J., & Sun, J. (2015a). Leaky intestine and impaired microbiome in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiological Reports*, *3*(4), 1–10. <https://doi.org/10.14814/phy2.12356>
- Wu, S., Yi, J., Zhang, Y.-G., Zhou, J., & Sun, J. (2015b). Leaky intestine and impaired microbiome in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiological Reports*, *3*(4). <https://doi.org/10.14814/phy2.12356>
- Xiao, J., Wang, T., Xu, Y., Gu, X., Li, D., Niu, K., Wang, T., Zhao, J., Zhou, R., & Wang, H.-L. (2020). Long-term probiotic intervention mitigates memory dysfunction through a novel H3K27me3-based mechanism in lead-exposed rats. *Translational Psychiatry*, *10*(1), 25. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0719-8>
- Xiao, S., MacNair, L., McGoldrick, P., McKeever, P. M., McLean, J. R., Zhang, M., Keith, J., Zinman, L., Rogaeva, E., & Robertson, J. (2015). Isoform-specific antibodies reveal distinct subcellular localizations of C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, *78*(4), 568–583. <https://doi.org/10.1002/ana.24469>
- Xiao, S., MacNair, L., McLean, J., McGoldrick, P., McKeever, P., Soleimani, S., Keith, J., Zinman, L., Rogaeva, E., & Robertson, J. (2016). C9orf72 isoforms in Amyotrophic Lateral Sclerosis and



- Frontotemporal Lobar Degeneration. *Brain Research*, 1647, 43–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.062>
- Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2013). *Animal models of traumatic brain injury*.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3407>
- Xu, W., Fang, F., Ding, J., & Wu, C. (2018). Dysregulation of Rab5-mediated endocytic pathways in Alzheimer's disease. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 19(4), 253–262.  
<https://doi.org/10.1111/tra.12547>
- Xu, Y.-F., Gendron, T. F., Zhang, Y.-J., Lin, W.-L., D'Alton, S., Sheng, H., Casey, M. C., Tong, J., Knight, J., Yu, X., Rademakers, R., Boylan, K., Hutton, M., McGowan, E., Dickson, D. W., Lewis, J., & Petrucelli, L. (2010). Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(32), 10851–10859.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1630-10.2010>
- Yamanaka, K., & Komine, O. (2018). The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neuroscience Research*, 126, 31–38. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2017.09.011>
- Yamanaka, S. (2007). Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 1(1), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.012>
- Yamane, D., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Nakanishi, H., Imagawa, H., Kohara, M., Lemon, S. M., & Ichi, I. (2022). FADS2-dependent fatty acid desaturation dictates cellular sensitivity to ferroptosis and permissiveness for hepatitis C virus replication. *Cell Chemical Biology*, 29(5), 799–810.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.07.022>
- Yamashita, H., Maruta, H., Jozuka, M., Kimura, R., Yamato, M., Saito, T., Fujisawa, K., Kimoto, M., Hiemori, M., & Tsuji, H. (2014). *Effects of Acetate on Lipid Metabolism in Muscles and Adipose Tissues of Type 2 Diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats*. 8451(May), 2–9.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.80634>
- Yang, P., Mathieu, C., Kolaitis, R.-M., Zhang, P., Messing, J., Yurtsever, U., Yang, Z., Wu, J., Li, Y., Pan, Q., Yu, J., Martin, E. W., Mittag, T., Kim, H. J., & Taylor, J. P. (2020). G3BP1 Is a Tunable Switch that Triggers Phase Separation to Assemble Stress Granules. *Cell*, 181(2), 325–345.e28.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.046>
- Yang, Q., Jiao, B., & Shen, L. (2020). The Development of C9orf72-Related Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Disorders. *Frontiers in Genetics*, 11(September), 1–11.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.562758>
- Yang, W. X., Terasaki, T., Shiroki, K., Ohka, S., Aoki, J., Tanabe, S., Nomura, T., Terada, E., Sugiyama, Y., & Nomoto, A. (1997). Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor. *Virology*, 229(2), 421–428.  
<https://doi.org/10.1006/viro.1997.8450>

- Yoshida, M. (2006). Cellular tau pathology and immunohistochemical study of tau isoforms in sporadic tauopathies. *Neuropathology*, 26(5), 457–470. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2006.00743.x>
- Yu, B., & Pamphlett, R. (2017). Environmental insults: Critical triggers for amyotrophic lateral sclerosis. *Translational Neurodegeneration*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0087-3>
- Yu, J., Hu, K., Smuga-otto, K., Tian, S., Stewart, R., Igor, I., & Thomson, J. A. (2009). *NIH Public Access*. 324(5928), 797–801. <https://doi.org/10.1126/science.1172482.Human>
- Zárate, R., El Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*, 6(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0153-6>
- Zarei, S., Carr, K., Reiley, L., Diaz, K., Guerra, O., Altamirano, P. F., Pagani, W., Lodin, D., Orozco, G., & Chinae, A. (2015). A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surgical Neurology International*, 6, 171. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.169561>
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337–349. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00905-X)
- Zerial, M., & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), 107–117. <https://doi.org/10.1038/35052055>
- Zhai, C.-D., Zheng, J.-J., An, B.-C., Huang, H.-F., & Tan, Z.-C. (2019). Intestinal microbiota composition in patients with amyotrophic lateral sclerosis: establishment of bacterial and archaeal communities analyses. *Chinese Medical Journal*, 132(15), 1815–1822. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000351>
- Zhang, H.-L., Hu, B.-X., Li, Z.-L., Du, T., Shan, J.-L., Ye, Z.-P., Peng, X.-D., Li, X., Huang, Y., Zhu, X.-Y., Chen, Y.-H., Feng, G.-K., Yang, D., Deng, R., & Zhu, X.-F. (2022). PKC $\beta$ II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis. *Nature Cell Biology*, 24(1), 88–98. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00818-3>
- Zhang, K., Daigle, J. G., Cunningham, K. M., Coyne, A. N., Ruan, K., Grima, J. C., Bowen, K. E., Wadhwa, H., Yang, P., Rigo, F., Taylor, J. P., Gitler, A. D., Rothstein, J. D., & Lloyd, T. E. (2018). Stress Granule Assembly Disrupts Nucleocytoplasmic Transport. *Cell*, 173(4), 958–971.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.025>
- Zhang, W. H., Jiang, Y., Zhu, Q. F., Gao, F., Dai, S. F., Chen, J., & Zhou, G. H. (2011). Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. *British Poultry Science*, 52(3), 292–301. <https://doi.org/10.1080/00071668.2011.578121>
- Zhang, Y.-G., Wu, S., Yi, J., Xia, Y., Jin, D., Zhou, J., & Sun, J. (2017). Target Intestinal Microbiota to

- Alleviate Disease Progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clinical Therapeutics*, 39(2), 322–336. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.12.014>
- Zhang, Y.-J., Gendron, T. F., Ebbert, M. T. W., O'Raw, A. D., Yue, M., Jansen-West, K., Zhang, X., Prudencio, M., Chew, J., Cook, C. N., Daugherty, L. M., Tong, J., Song, Y., Pickles, S. R., Castanedes-Casey, M., Kurti, A., Rademakers, R., Oskarsson, B., Dickson, D. W., ... Petrucelli, L. (2018). Poly(GR) impairs protein translation and stress granule dynamics in C9orf72-associated frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Medicine*, 24(8), 1136–1142. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0071-1>
- Zhang, Y.-J., Guo, L., Gonzales, P. K., Gendron, T. F., Wu, Y., Jansen-West, K., O'Raw, A. D., Pickles, S. R., Prudencio, M., Carlomagno, Y., Gachechiladze, M. A., Ludwig, C., Tian, R., Chew, J., DeTure, M., Lin, W.-L., Tong, J., Daugherty, L. M., Yue, M., ... Petrucelli, L. (2019). Heterochromatin anomalies and double-stranded RNA accumulation underlie C9orf72 poly(PR) toxicity. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6428). <https://doi.org/10.1126/science.aav2606>
- Zhang, Y., Ogbu, D., Garrett, S., Xia, Y., & Sun, J. (2021). Aberrant enteric neuromuscular system and dysbiosis in amyotrophic lateral sclerosis. *Gut Microbes*, 13(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1996848>
- Zhen, Y., & Stenmark, H. (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(17), 3171–3176. <https://doi.org/10.1242/jcs.166074>
- Zhou, C., Zhao, C.-P., Zhang, C., Wu, G.-Y., Xiong, F., & Zhang, C. (2007). A method comparison in monitoring disease progression of G93A mouse model of ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis : Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 8(6), 366–372. <https://doi.org/10.1080/17482960701538759>
- Zou, Z. Y., Zhou, Z. R., Che, C. H., Liu, C. Y., He, R. L., & Huang, H. P. (2017). Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 88(7), 540–549. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-315018>
- Zu, T., Liu, Y., Bañez-Coronel, M., Reid, T., Pletnikova, O., Lewis, J., Miller, T. M., Harms, M. B., Falchook, A. E., Subramony, S. H., Ostrow, L. W., Rothstein, J. D., Troncoso, J. C., & Ranum, L. P. W. (2013). RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), E4968-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315438110>