

# Caracterización de la mutación *C9ORF72* asociada a la esclerosis lateral amiotrófica familiar en linfoblastos derivados de pacientes

James Kevin Bradshaw Bernacchi<sup>1, 2, a</sup>, Maria de Gracia Porras Franco<sup>2, b</sup>, Ana Martínez<sup>2, c</sup>

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Grupo de Química Médica y Biología Traslacional, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28040, Madrid, España.

a. james.k.bradshaw@outlook.com b. graciapf@cib.csic.es c. ana.martinez@csic.es

**Palabras clave:** esclerosis lateral amiotrófica; ELA; TDP-43; *C9ORF72*; linfoblastos; p62

## Resumen

El objetivo de este estudio es caracterizar los mecanismos fisiopatológicos de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en linfocitos inmortalizados de pacientes diagnosticados con la mutación de repetición del hexanucleótido (HRE) del gen *C9ORF72*. Concretamente, se desea observar la presencia o no de agregados de TDP-43 en el citoplasma de estos linfoblastos, ya que se considera un distintivo de la ELA familiar y esporádica. Además, se analizarán otras proteínas, especialmente p62, y la expresión de genes proinflamatorios como *IL-1 $\beta$* , *IL-6* y *TNF $\alpha$* . La muestra de sangre de los pacientes de los cuales derivan los linfoblastos se extrajo en su segunda visita tras el diagnóstico de ELA y se confirmó la presencia de la mutación en *C9ORF72*. Todos los resultados se compararon frente a controles presuntamente libres de enfermedades neurodegenerativas. Los resultados indican que los pacientes no padecen acumulación citoplasmática ni agregación de TDP-43. Sin embargo, se ha observado la acumulación de p62 en la fracción insoluble de los lisados celulares, lo cual podría suponer la presencia de inclusiones de repeticiones de dipéptidos (DPRs) positivos en p62 y negativos en TDP-43, y/o una alteración de la autofagia. Además, los linfoblastos de pacientes son más resistentes a las condiciones de ayuno prolongado y generan menos especies reactivas de oxígeno que los controles. Por último, la expresión de ARNm de *IL-1 $\beta$* , conocida por inducir neuroinflamación en la microglía de pacientes con ELA, está considerablemente aumentada respecto a los controles. Todos estos resultados podrían ayudar a descifrar los mecanismos patológicos de la ELA asociada a la mutación en el HRE de *C9ORF72*, permitiendo un futuro tratamiento personalizado centrado en esta mutación o en los estadios menos tardíos de la enfermedad.

**Cita:** Bradshaw Bernacchi, James Kevin; Porras Franco, Maria de Gracia; Martínez, Ana (2023) Caracterización de la mutación *C9ORF72* asociada a la esclerosis lateral amiotrófica familiar en linfoblastos derivados de pacientes. *dianas* 12 (2): e202309fa01. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202309fa01](https://dianas.web.uah.es/journal/e202309fa01) <https://dianas.web.uah.es/journal/e202309fa01>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>. DOI <https://doi.org/10.37536/DIANAS>

**Copyright:** © Bradshaw-Bernacchi JK, Porras-Franco MDG, Martínez A. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Introducción

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva de motoneuronas inferiores y superiores (1). La pérdida de motoneuronas y placas motoras causa la destrucción del músculo, desembocando en parálisis y, eventualmente, en muerte por fallo respiratorio (2, 3). Los primeros síntomas de la ELA aparecen a una edad de entre 50 y 65 años, con una media de 64 años (4). Aproximadamente, el 90% de los casos corresponden a una forma esporádica de la enfermedad, mientras que el 10% restante se debe a una mutación genética asociada a la enfermedad (5). Los principales genes responsables de la ELA son *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *OPTN* y *C9ORF72*, siendo este último objeto del presente estudio (1, 6). Las mutaciones en *C9ORF72* son responsables del 30%-50% de los casos de ELA familiar, y de un 4%-10% de ELA esporádico (6). Este gen codifica una proteína que participa activamente en procesos tales como la autofagia, biogénesis lisosomal y el tráfico endosomal, además de tener otras funciones (2).

*C9ORF72* es un gen caracterizado por presentar expansiones por repetición del hexanucleótido (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> en la región no codificante, también denominado HRE (*hexanucleotide repeat expansion*) (2, 7). Un rango de entre 2 y 24 repeticiones se considera fisiológico, mientras que más de 30 repeticiones está asociado a patologías, pudiendo alcanzar incluso miles de repeticiones (7, 8). *C9ORF72* pertenece a la familia de las proteínas DENN (*differentially expressed in normal and neoplasia*), y forma parte de un complejo con otras dos proteínas: SMCR8 (perteneciente también a la familia DENN) y WDR41 (9, 10). Este complejo actúa como un factor de intercambio de GPT (GEF) de numerosas Rab-GTPasas, regulando la degradación de p62, iniciando la autofagia por reclutamiento de ULK1 y promoviendo la activación mTORC1 (10, 11). Además, se ha demostrado que la deficiencia de *C9ORF72* y SMCR8 impiden la fusión de los lisosomas con los fagosomas o autofagosomas, inhibiendo la biogénesis lisosomal (11, 12).

En condiciones patológicas, las repeticiones del hexanucleótido (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> conllevan dos grandes consecuencias: la pérdida y la ganancia de función (13). La ganancia de función se produce por dos mecanismos diferentes. En primer lugar, las variantes 1 y 3 de *C9ORF72* presentan HRE en el primer intrón, ya que la transcripción incluye el exón 1a (Figura 1) (1). La secuencia repetida forma estructuras muy estables de ácidos nucleicos (ADN y ARN) llamados G-quadruplex y bucles-R. Estas estructuras causan la acumulación de transcritos abortados que secuestran proteínas de unión a ARN (RBP). Los complejos ARN-RBP se denominan focos de ARN y afectan al procesado postranscripcional (13, 14). En segundo lugar, los transcritos sentido y antisentido que contiene el HRE induce su propia traducción en ribosomas mediante una traducción no AUG-dependiente (RAN). Ello provoca la síntesis de repeticiones proteicas dipeptídicas (DPR) que se acumulan y producen inclusiones intracelulares tóxicas, esencialmente citoplasmáticas (15, 16). La pérdida de función tiene su origen en dos mecanismos. El primero se debe a que los HRE disminuyen la expresión del gen *C9ORF72* por cese temprano de la transcripción a causa de la formación de G-quadruplex y bucles-R (1, 8). El segundo se produce por silenciamiento del gen debido a la hipermetilación del promotor, aunque este podría ser un efecto protector al evitar la acumulación de focos de ARN y las inclusiones de DPR (1, 2, 17). La sinergia de los mecanismos de pérdida y ganancia de función es necesaria para producir la patología (2, 18).

Una de las RBP más importantes en la ELA es la proteína TDP-43, la cual forma inclusiones en principalmente neuronas y glía al quedar secuestrada en los focos de ARN (1). Esta patología parece ser consecuencia, al menos parcialmente, de la acumulación de DPRs positivos en p62, aunque también podría ser causada por los propios focos de ARN (19, 20, 21). Por otro lado, los mecanismos de pérdida de función podrían agravar la patología de TDP-43 al inhibir su aclaramiento por disminución de la autofagia (11, 22).

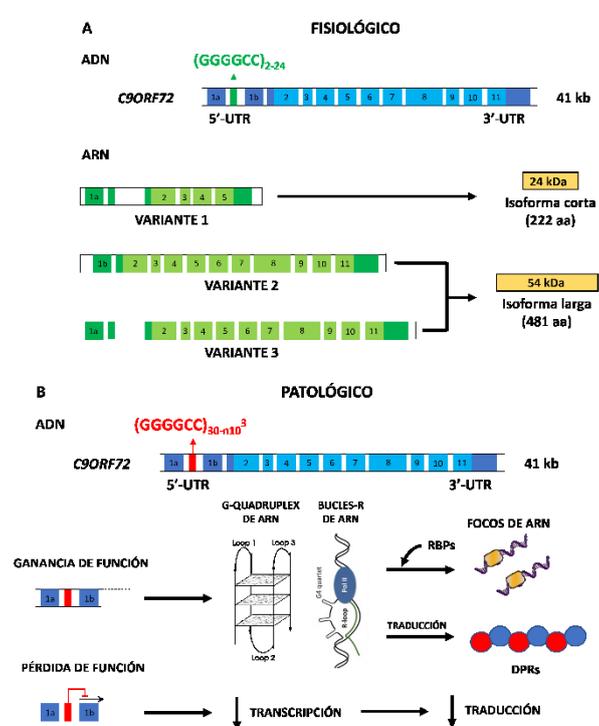


Figura 1. Estructura de las distintas variantes del gen de *C9ORF72* y de las isoformas proteicas en condiciones fisiológicas (A) y patológicas (B) (Adaptado de Smeyers J et al., 2021). El gen *C9ORF72* tiene un tamaño de 41 kb y presenta 11 exones. En condiciones fisiológicas (A), el HRE se localiza entre el exón 1a y 1b y presenta entre 2 y 24 repeticiones. La transcripción del gen puede dar lugar a tres variantes: la variante 1, con los exones 1a y 2-5; la variante 2, con los exones 1b y 2-11; y la variante 3, con los exones 1a y 2-11. La traducción de la variante 1 produce la isoforma corta de la proteína *C9ORF72*, de 24 kDa y 222 aminoácidos; y la traducción de las variantes 2 y 3 producen la isoforma larga, de 54 kDa y 481 aminoácidos. Únicamente las variantes 1 y 3 presentan el HRE al incluir el exón 1<sup>a</sup>. En condiciones patológicas (B), las variantes 1 y 3 presentan el HRE en el primer intrón con más de 30 repeticiones, alcanzando incluso las miles de ellas. Ello causa que se produzcan estructuras muy estables de ácidos nucleicos (G-quadruplex y bucles-R) que secuestran RBPs, como TDP-43, produciendo focos de ARN. Además, la traducción tipo RAN de los transcritos sentido y antisentido que contienen el HRE desemboca en la síntesis de DPRs, produciendo inclusiones proteicas. Por otro lado, el propio HRE actúa como represor del promotor, inhibiendo la expresión del gen de las 3 posibles variantes.

Acorde a estos datos, este estudio se propone caracterizar los mecanismos patológicos de la mutación del HRE de *C9ORF72*, centrándose en la patología de TDP-43 y otras proteínas involucradas. Para lograr este

objetivo, se hará un análisis de dichas proteínas y genes responsables en linfocitos inmortalizados de dos controles sanos y de dos pacientes con ELA debido a la mutación. La caracterización de su viabilidad, de proteínas relacionadas con la ELA (en especial de TDP-43 y p62), de la expresión de genes (entre ellos algunos proinflamatorios), y de la distribución de TDP-43 se comparó frente a la de los linfoblastos de los dos controles sin antecedentes de ELA. Se ha elegido la línea celular de linfoblastos como modelo para el estudio debido a los resultados previos de este mismo laboratorio, los cuales demuestran que estas células recogen las características patológicas típicas de la ELA (23). Además, investigaciones recientes sugieren que la ELA actúa como una enfermedad degenerativa sistémica, afectando no solo motoneuronas sino también otras clases celulares como linfocitos, contribuyendo a la neurodegeneración.

## Metodología

### Cultivo celular

Los linfocitos inmortalizados mediante el virus de Epstein-Barr (EBV) se obtuvieron de dos pacientes de ELA con mutación en C9ORF72 denominados E9 y E211. Ambos fueron diagnosticados siguiendo el criterio de El Escorial (24). Se utilizaron también linfoblastos procedentes de dos controles sanos de la misma edad de nuestro repositorio de líneas celulares. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado por escrito. Este estudio se ha aprobado por el Comité de Ética del Hospital 12 de Octubre (número de aprobación CEI 18/004) y por el Comité de Ética del CSIC (fecha de aprobación 1 de febrero de 2018), siguiendo las normas nacionales y de la Unión Europea.

Las células se cultivaron verticalmente en suspensión dentro de matraces T, en aproximadamente 10 mL de medio de cultivo RPMI-160 (Gibco, RBL) enriquecido con L-glutamina 2 mM, 100 mg/mL de penicilina/estreptomicina, y 10% (v/v) de suero fetal bovino (Gibco, RBL). Las células se mantuvieron en un incubador humidificado con 5% CO<sub>2</sub> y a 37 °C. El medio se renovaba rutinariamente cada dos días mediante sustitución con un volumen igual de medio fresco (3).

### Determinación de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol. Este ensayo proporciona de manera indirecta una estimación de la viabilidad celular al medir la habilidad de las mitocondrias para convertir el MTT en cristales insolubles mediante reducción. La cantidad de cristales producidos es proporcional en número de células viables. En este ensayo,  $8 \times 10^5$  células fueron sembradas e incubadas con 0,25 µg/mL de MTT en un volumen de reacción de 200 µL. Tras la incubación, los cristales se disolvieron en 200 µL de DMSO. La absorbancia se midió mediante colorimetría a 590 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm en el espectrofotómetro Varioskan Flash (Thermo Scientific Laboratories, Rockford, IL, USA) (3).

### Western blot

Las células se sembraron a una densidad de 1 millón de células por mililitro en 5 mL ( $5 \times 10^6$  células por pocillo) y se centrifugaron, lavaron con PBS y lisaron con 30 µL de tampón RIPA al que se le añadió un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa. La lisis se realizó en el tampón previamente descrito durante 30 minutos, con vórtex fuerte cada 10 minutos. La fracción insoluble de proteínas se extrajo posteriormente mediante sarkosyl. Para el fraccionamiento núcleo-citoplasma-membrana se utilizó el *Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells* (Thermo Scientific, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos proteicos se cuantificaron mediante el *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y se midió la absorbancia por colorimetría a 560nm en el espectrofotómetro *GloMax® Discover* (Promega Biotech Ibérica S.L, Alcobendas, Madrid, España). Se cargaron cantidades iguales de proteína en geles de SDS-poliacrilamida y se realizó la electroforesis. Las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activada con metanol y se bloqueó la membrana con BSA 5% durante 1 hora. Posteriormente, las membranas se incubaron hasta el día siguiente en agitación a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: TDP-43 (1:1000, Proteintech, cat. #10782-2-AP), fosfo-TDP43 (Ser409/410) (1:1000, Proteintech, cat. #22309-1-AP), α-tubulina (1:500, Proteintech, cat. #66031-1-Ig), lamina B (1:500, Calbiochem, cat. #NA12) y SQSTM1/p62 (1:1000, GeneTex, cat. #GTX111393). La señal de los anticuerpos primarios se amplificó con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (Bio-Rad cat. #1706515 y #1706516) y detectados vía el *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific, Madrid, España). Las intensidades relativas de las bandas fueron detectadas con el instrumento *ChemiDoc Imaging System* (Bio-Rad Laboratories, Alcobendas, Madrid, España).

### Inmunofluorescencia

Los linfoblastos se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células por mililitro en cristales ya revestidos con poli-L-lisina y bórax 0,15M. La fijación se realizó durante 30 minutos en paraformaldehído al 4% en PBS y la permeabilización durante 10 minutos en tritón X-100 al 1% en PBS. Posteriormente, los cristales se

bloquearon a 37 °C durante 1 hora con BSA al 1% en PBS. Entonces, las células se incubaron a 4 °C durante la noche con los siguientes anticuerpos primarios: fosfo-TDP43 (Ser409/410) (1:100, Proteintech, cat. #22309-1-AP) y TDP-43 (C-terminal) (1:100, Proteintech, cat. #67345-1-Ig). Tras la incubación primaria, las células se lavaron por inmersión en PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios DyLight™ 488 horse anti-rabbit (1:1000, Vector Laboratories, cat. #DI-1088-1.5) y Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse (1:1000, Molecular Probes, cat. #A-11001) en condiciones idénticas a la incubación primaria, respectivamente. Las muestras se prepararon en el reactivo FluorSave™ (Calbiochem, cat. #345789-20) y se tiñeron con la tinción nuclear DAPI (1:1000, Thermo Scientific, cat. #62248) y la tinción citoesquelética Faloidina Alexa Fluor™ 568 (1:1000, Molecular Probes, A12380). Las imágenes de alta resolución se tomaron en el sistema de microscopía confocal LEICA TCS-SP5-AOBS (Heidelberg, Alemania). La cuantificación de TDP-43 y fosfo-TDP-43 se realizó mediante el software informático Image J (versión 1.53K). Los datos se expresan como la proporción de intensidad de fluorescencia de fosfo-TDP-43 citosólico frente a fosfo-TDP-43 nuclear y de TDP-43 citosólico frente a TDP-43 nuclear.

### Análisis de los niveles de ARNm mediante q-RT-PCR

Se extrajo el ARN de 5 x 10<sup>6</sup> células utilizando el reactivo Trizol™ (Invitrogen, Waltham, MA, USA). El ARN se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop () y su calidad se dedujo mediante los ratios A260/A280 y A260/A230. Una vez cuantificado, se trataron 800 ng de ARN a una concentración de 1 µg/µL con DNAase I Amplification Grade (Invitrogen, cat. #18068-015). La retrotranscripción se logró mediante el kit de *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, cat. #18080-051), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real de triplicados, usando el reactivo *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche, cat. #06924204001) en el termociclador Bio-Rad iQ5 System (Alcobendas, Madrid, España).

Los cebadores se diseñaron utilizando el kit de *Universal Probe Library* (Roche, cat. #UPL11THRU20). La concentración final de los cebadores fue de 20 µM. Las secuencias de los cebadores sentido y antisentido, respectivamente, son las siguientes: para *IL-1β* 5'-GCAACAAGTGGTGTCTC-3' y 5'-CAG ATTCTTTTCC TTGAGGC-3'; para *IL-6* 5'-GCAGAAAAAGGCAAAGAATC-3' y 5'-CTACATTTGCC GAAGAGC-3'; para *TNFα* 5'-CCATGTTGTAGCAAACCC-3' y 5'-GAGTAGATGAGGTA CAGGC-3'; para *TARDBP* 5'-GAGAAGTTCTTATGGTGCAG-3' y 5'-TGGCTTTGCTTAGAATTAGG-3'; y para el gen constitutivo *β-actina* 5'-CGAACCGCGAGAAGATGA-3' y 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'. La expresión relativa de los niveles de ARNm de los genes de interés se normalizó frente a los de la *β-actina* mediante el método de 2<sup>-(ACT)</sup> (3).

### Determinación de las especies reactivas de oxígeno

La acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno se determinó mediante la sonda fluorescente CM-H2DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína) (Invitrogen, cat. #C6827). Las células se incubaron con CM-H2DCFDA 10 µM durante 30 minutos. Las medidas de fluorescencia se realizaron mediante el espectrofotómetro Varioskan Flash (Thermo Scientific Laboratories, Rockford, IL, USA). La sonda tuvo un pico de excitación a una longitud de onda de 495 nm y de emisión a 510nm (3).

### Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism Version 8. Los datos vienen representados como la media ± el error estándar de la media (SEM). La significancia estadística se estimó usando la prueba t-student asumiendo varianzas iguales o diferentes. Consideramos que se alcanza significancia en los resultados con un valor de p < 0.05.

## Resultados

### Los linfoblastos de pacientes con la mutación C9ORF72 no presentan indicios de patología de TDP-43

En primer lugar, se realizó una q-RT-PCR para comprobar si la proteína asociada a la mutación del gen *C9ORF72* produce cambios en los niveles de expresión del gen *TARDBP*. Para ello, se extrajo el ARN de los linfoblastos procedentes de los pacientes de ELA y de los controles y se analizaron los niveles de expresión de *TARDBP*. Los resultados indican que su expresión no se ve afectada (p-valor > 0.05), por lo que las diferencias que se observen en los niveles de la proteína TDP-43 se deberán exclusivamente a procesos postraduccionales (Figura 2A). A continuación, se extrajeron las proteínas de los linfoblastos mencionados anteriormente y se realizaron western blots (WB) con el objetivo de conocer si presentan patología de TDP-43 por acumulación de pTDP-43 en el citoplasma. La fracción soluble de los lisados celulares dispone de ratios similares de pTDP-43 / TDP-43 total (p-valor > 0.05), sugiriendo que no se produce la acumulación (Figura 2B). Sin embargo, es posible que se produzca en la fracción insoluble de

los lisados debido a la precipitación de pTDP-43 por la formación de complejos. A fin de evaluar dicha hipótesis, se analizaron los niveles de pTDP-43 y TDP-43 total en la fracción insoluble. No obstante, el

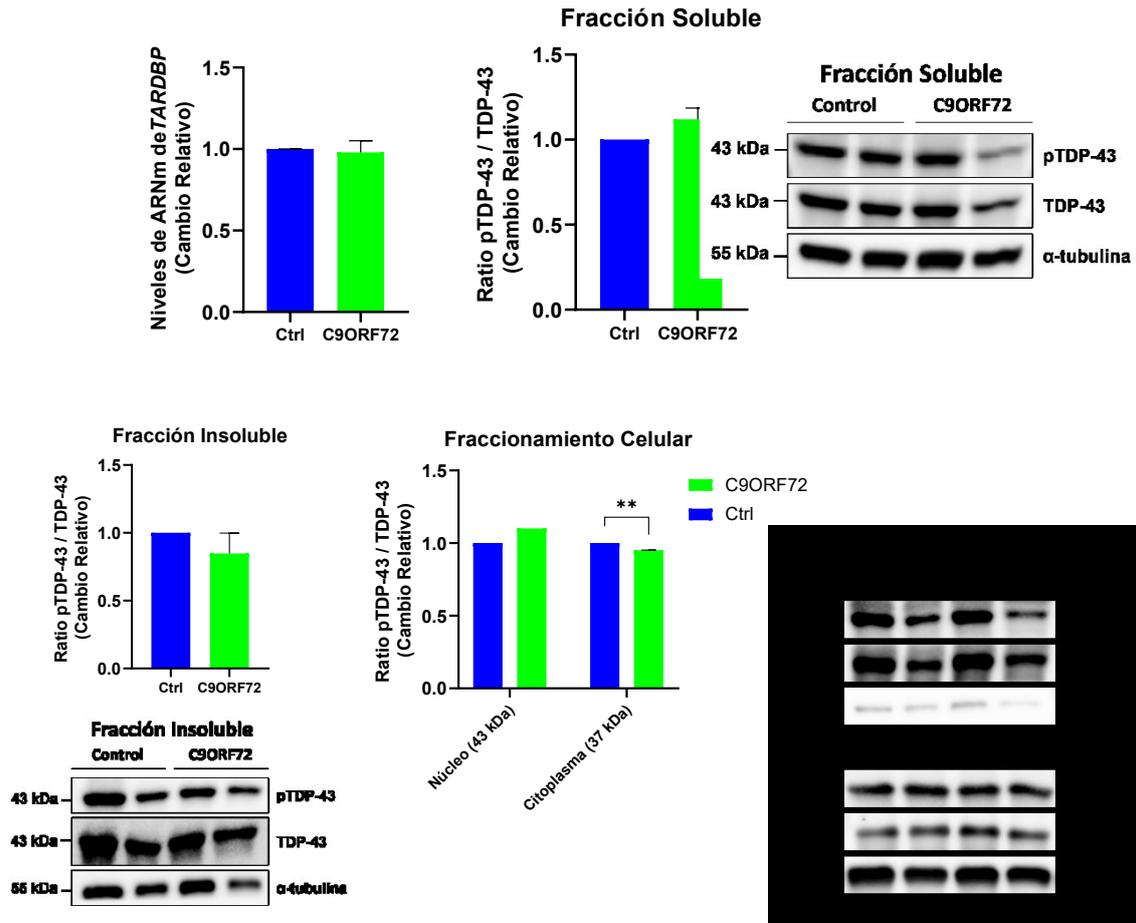


Figura 2. Análisis de los niveles de ARNm del gen *TARDBP* mediante q-RT-PCR (A) y de la intensidad de las bandas obtenidas por western blot. En azul se pueden observar los núcleos de las células mediante la tinción DAPI, y en verde las proteínas pTDP-43 o TDP-43. En los WB se compara el cambio relativo del grupo C9ORF72 frente al grupo control en la fracción soluble (B), fracción insoluble (C) y tras el fraccionamiento celular (D).

ratio de pTDP-43 / TDP-43 del grupo de ELA no varía significativamente respecto al grupo control (p-valor > 0,05), por lo que no se puede confirmar que haya diferencias y, por ende, acumulación de pTDP-43 (Figura 2C). Posteriormente se estudió la distribución de pTDP-43 y TDP-43 total en los linfoblastos y se calculó su ratio en el núcleo y en el citoplasma. Se observaron fragmentos de 43 kDa en el núcleo y de 37 kDa en el citoplasma, con ausencia de fragmentos de 37 kDa y 43 kDa, respectivamente. El ratio de pTDP-43 / TDP-43 total de los pacientes de ELA en el núcleo no presenta diferencias significativas (p-valor > 0.05) en comparación al grupo control. En cambio, en el citoplasma el grupo de ELA posee un menor ratio frente al grupo control (p-valor < 0.05), aunque esta diferencia no es biológicamente relevante (Figura 2D). En conclusión, ni la q-RT-PCR ni el WB aquí estudiados han encontrado indicios de un mayor ratio pTDP-43 / TDP-43 total en los pacientes de ELA con la mutación *C9ORF72* en comparación a los controles ni, por tanto, pruebas de una patología de TDP-43 por acumulación de agregados fosforilados.

La localización de pTDP-43 y TDP-43 no parece alterada en linfoblastos de pacientes con la mutación *C9ORF72*

Para complementar los resultados obtenidos mediante western blot, se realizó una inmunofluorescencia con el fin de observar la distribución de pTDP-43 y TDP-43 total en la célula. El análisis de la imagen no muestra diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo de ELA con la mutación de *C9ORF72*, ya sea en los niveles de pTDP-43 (Figura 3A) o de TDP-43 total (Figura 3B).

Influencia de la mutación *C9ORF72* en los niveles de p62

Se ha descrito que en las primeras etapas de la ELA se produce la acumulación de DPRs positivos en p62 y negativos en TDP-43. Por ello, se analizó mediante western blot los niveles de p62 tanto en la fracción soluble como en la insoluble. Como era de esperar, los pacientes con la mutación *C9ORF72* no presentan diferencias en los niveles de p62 en la fracción soluble (p-valor > 0.05) (Figura 4A). Por el contrario, en la fracción insoluble aumentan considerablemente, sugiriendo su acumulación y/o precipitación. Pese a que

la diferencia no sea estadísticamente significativa respecto al grupo control ( $p$ -valor  $> 0.05$ ), se aprecia una clara tendencia (Figura 4B). Aumentar el número de muestras podría establecer una relación significativa.

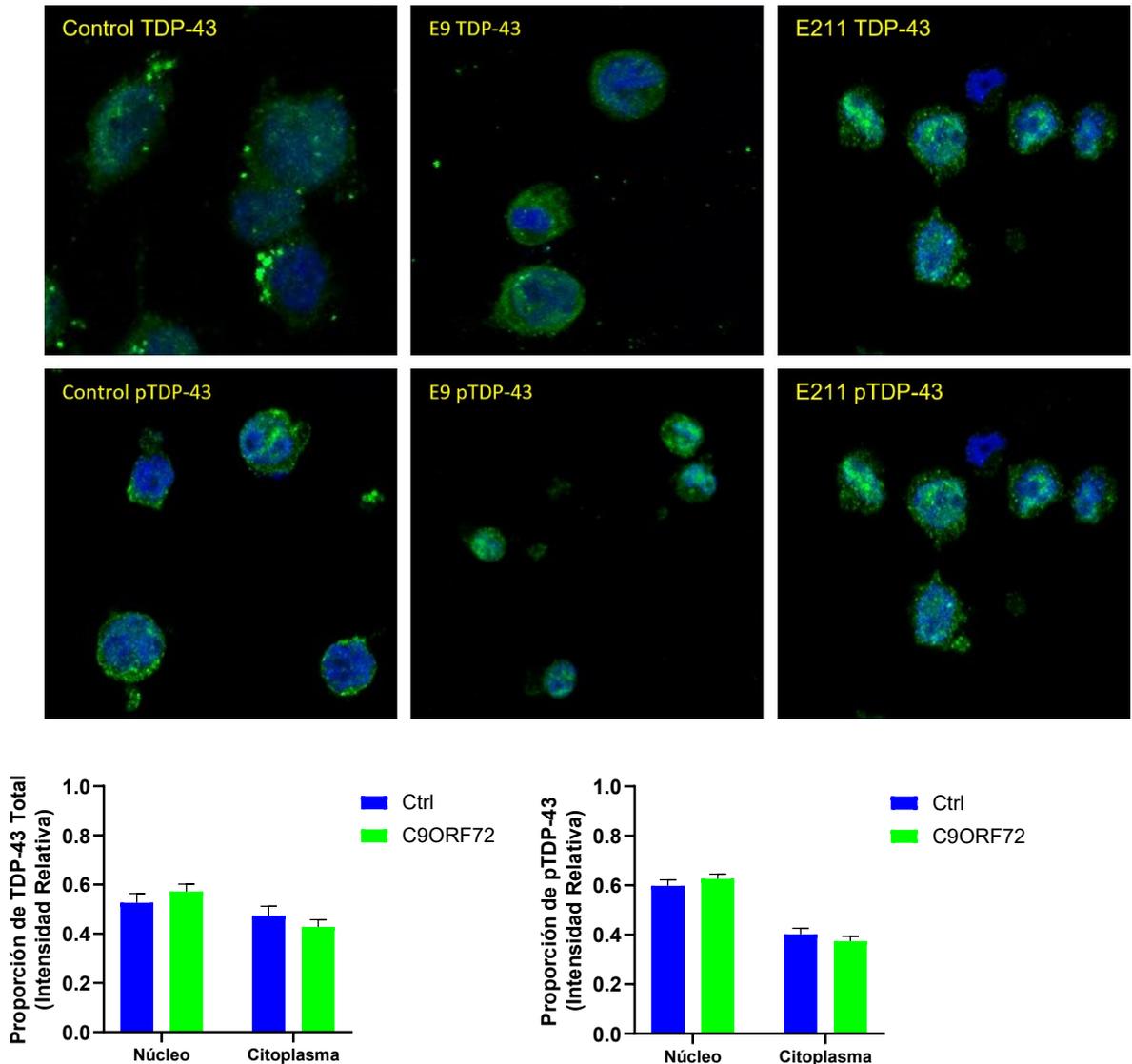


Figura 3. Análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal con el fin de observar la distribución de TDP-43 total y pTDP-43 en la célula. (A) Proporción de TDP-43 total localizado en el núcleo y en el citoplasma del grupo control frente al grupo C9ORF72. (B) Proporción de pTDP-43 localizado en el núcleo y en el citoplasma del grupo control respecto al grupo C9ORF72.

#### Viabilidad celular y generación de especies reactivas de oxígeno

Los linfoblastos derivados de pacientes de ELA con la mutación *C9ORF72* presentan una viabilidad menor respecto a los linfoblastos de los controles ( $p$ -valor  $< 0.005$ ). No obstante, al incubarlos durante 24h en condiciones de ayuno tras eliminar el suero del medio de cultivo, los linfoblastos del grupo *C9ORF72* poseen una mayor viabilidad en comparación al grupo control en las mismas condiciones ( $p$ -valor  $< 0.005$ ) (Figura 5A). Por otro lado, se midieron los niveles de especies reactivas de oxígeno en los linfoblastos derivados de pacientes mediante la sonda CM-H2DCFDA. Como se puede observar, el grupo con la mutación de *C9ORF72* genera menos especies reactivas de oxígeno que los controles ( $p$ -valor  $< 0.0005$ ) (Figura 5B).

#### La ELA asociada al gen *C9ORF72* modifica los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias

Se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias mediante q-RT-PCR, ya que es sabido que *C9ORF72* ejerce funciones en inflamación e inmunomodulación. Los niveles de ARNm de *IL-1 $\beta$*  están considerablemente aumentados respecto al control en los linfoblastos de pacientes ( $p$ -valor  $< 0.05$ ). Los niveles tanto de *IL-6* como de *TNF $\alpha$*  están significativamente reducidos en el grupo de ELA *C9ORF72* en comparación al grupo control (Figura 6).

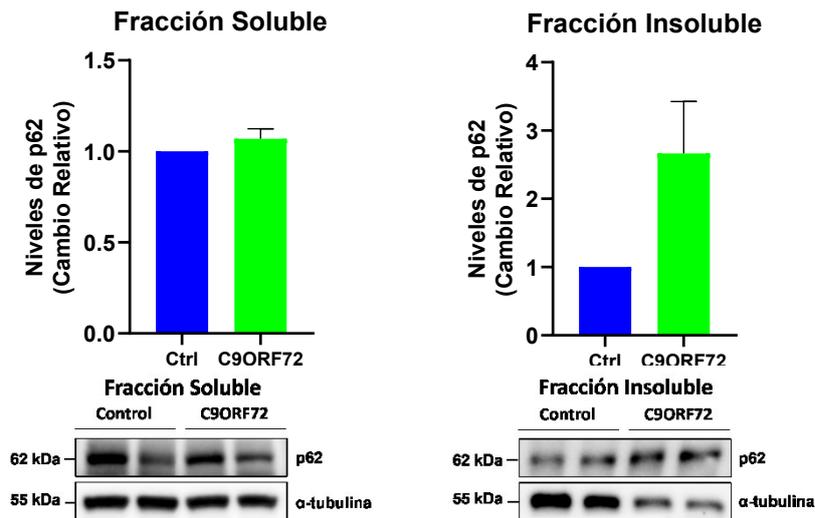


Figura 4. Análisis de la intensidad de las bandas obtenidas mediante western blot. Se compara el cambio relativo de los niveles de p62 en el grupo C9ORF72 respecto al grupo, en la fracción soluble (A) e insoluble (B).

## Discusión

El objetivo de este estudio era caracterizar los linfoblastos de pacientes de ELA con la mutación de *C9ORF72*. Existía especial interés en la patología de TDP-43, ya que se ha demostrado que es un aspecto distintivo de la enfermedad (1, 2). El análisis del ARNm de *TARDP43* y de los niveles de las proteínas pTDP-43 y TDP-43 total ofrecieron una visión general acerca de la acumulación en el citoplasma, pero los resultados indican que estos linfoblastos no presentan indicios de patología de TDP-43. Cabe resaltar que dicha proteinopatía es común en la mayoría de los estadios finales de ELA con mutación en el HRE de *C9ORF72*, en donde los pacientes han desarrollado patología de DPRs y la enfermedad ha progresado por completo. Sin embargo, otros autores no han logrado encontrar patología de TDP-43 en pacientes diagnosticados con ELA. Es posible que, al trabajar con muestras de pacientes extraídas en la segunda visita tras recibir un diagnóstico, la patología de TDP-43 no haya tenido tiempo de instaurarse (1). La acumulación de TDP-43 se produce como consecuencia de la acumulación de DPRs o focos de ARN, por lo que podría no haberse manifestado todavía, aunque podría estar desarrollándose (1, 8, 19, 20, 21). Desde otra perspectiva, TDP-43 se sintetiza en el núcleo y ejerce su función procesando el ARN hasta el citoplasma. Ahí, si el ambiente celular es patológico, sufre modificaciones postraduccionales como la fosforilación y ubiquitinación, impidiendo su regreso al núcleo (25). Se han observado únicamente fragmentos de 43 kDa de pTDP-43 y TDP-43 total en el núcleo, lo que confirma que la translocación nuclear de pTDP-43 desde el citoplasma se produce solo en proteínas no patológicas. Sin embargo, en el citoplasma se observan exclusivamente fragmentos de 37 kDa, lo que sugiere que no son transportados al núcleo y que serán modificados y degradados por mecanismos de autofagia. El hecho de no observar la acumulación de los fragmentos de 37 kDa en los linfoblastos con la mutación de *C9ORF72* se podría deber a que la autofagia aún funciona de manera normal y evita que se produzca la acumulación.

Las imágenes de inmunofluorescencia muestran una distribución similar tanto de pTDP-43 como de TDP-43 total en los núcleos y citoplasmas de los linfoblastos derivados de controles respecto a los derivados de pacientes. Ello reafirma los resultados obtenidos en el western blot, sugiriendo que los pacientes con la mutación *C9ORF72* no presentan pruebas de padecer una proteinopatía de TDP-43.

Tras no observar indicios de la patología de TDP-43, nos propusimos caracterizar p62 en las fracciones soluble e insoluble de los linfoblastos. Como suponíamos, los niveles de p62 en la fracción soluble son idénticos entre controles y pacientes de ELA. Interessantemente, hay una acumulación muy marcada de p62 en los linfoblastos derivados de pacientes en la fracción insoluble. Ello se puede deber a que se han comenzado a formar las inclusiones de DPRs, positivas en p62 y negativas en TDP-43 (7, 11). Sin embargo, más experimentos son necesarios para confirmarlo, como ensayos de agregación de DPRs o medidas de ARNm de *p62*.

Los ensayos de viabilidad celular y generación de especies reactivas de oxígeno demostraron que los linfoblastos derivados de pacientes con la mutación *C9ORF72* son más resistentes a las condiciones de ayuno prolongado y generan menos especies respecto al grupo control. Algunos estudios afirman que la autofagia está comprometida en pacientes con esta mutación, mientras que otros han demostrado que está aumentada (15). En este estudio, es probable que la autofagia esté sobreactivada, lo que se refleja en una mayor viabilidad y menor estrés oxidativo. Algunos autores han relacionado el aumento de la autofagia con

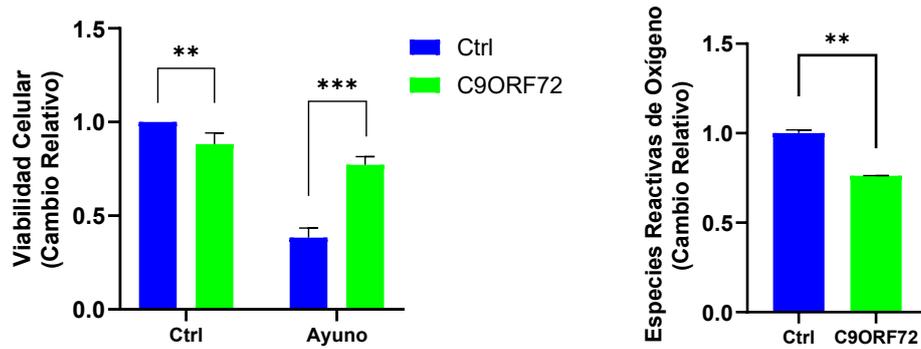


Figura 5. Análisis de la influencia de la mutación de C9ORF72 en la viabilidad celular y en la generación de especies reactivas de oxígeno. (A) Cambio relativo de la viabilidad del grupo C9ORF72 respecto del grupo control en condiciones normales y en condiciones de ayuno durante 24h. (B) Cambio relativo en la generación de especies reactivas de oxígeno del grupo C9ORF72 en relación con el grupo control.

la reducción de especies reactivas de oxígeno gracias a vías como la de p62 (26). Por otro lado, se ha visto que la autofagia es un mecanismo secundario para la eliminación de proteínas oxidadas y para la regulación de orgánulos productores de estas especies (27). Hacen falta más experimentos para determinar el estado de autofagia en los linfoblastos y para desenmascarar si p62 está alterado en este proceso. En estudios posteriores sería interesante determinar los niveles de autofagia con el marcador de LC3-II en presencia y ausencia de hidroxiclороquina (HCQ).

Por último, la mutación en el HRE del gen *C9ORF72* modifica los niveles de expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias. *IL-1 $\beta$*  está incrementada de forma notoria, sugiriendo que existe inflamación de la microglía en los pacientes (28).

La ELA familiar causada por la mutación en el HRE del gen *C9ORF72* parece distinguirse de los demás tipos de ELA en, principalmente, el tiempo de aparición de la patología de TDP-43. Mientras que mutaciones en, por ejemplo, *TBK1*, alteran la homeostasis de TDP-43 rápidamente, mutaciones en *C9ORF72* requieren primero de la formación de inclusiones de DPRs, de la formación de focos de ARN, y de pérdida de función de la proteína C9ORF72 para disminuir el aclaramiento de TDP-43 mediante tráfico endosomal (3). Por otro lado, el perfil de expresión de citoquinas proinflamatorias parece ser distinto al de mutaciones en *TBK1* (alta expresión de *IL-6* y baja expresión de *IL-1 $\beta$* ) o *SOD1* (baja expresión de *IL-1 $\beta$*  y alta expresión de *IL-6* y *TNF $\alpha$* ) (3, 29). En relación con las especies reactivas de oxígeno, la mutación en *C9ORF72* disminuye su generación, mientras que mutaciones en *TBK1* y *SOD1* la aumentan (3, 29).

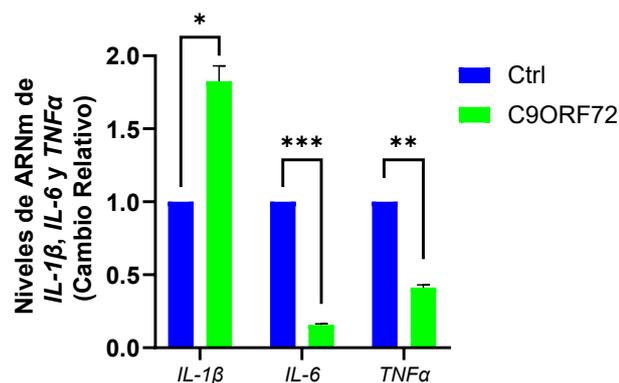


Figura 6. Análisis de los niveles de ARNm mediante q-RT-PCR de *IL-1 $\beta$* , *IL-6* y *TNF $\alpha$* . Se compara el cambio relativo los niveles de ARNm del grupo C9ORF72 respecto al grupo control en los genes de *IL-1 $\beta$* , *IL-6* y *TNF $\alpha$* .

Pese a que se necesitan más estudios para elucidar los mecanismos de esta patología en la mutación de *C9ORF72*, p62 podría ser de especial interés al estar alterado en fases tempranas tras el diagnóstico, al contrario que TDP-43. El enfoque en reestablecer la homeostasis de p62 podría retrasar los síntomas de la ELA, alargando el tiempo y la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, primero será importante conocer la causa de la acumulación de p62 mediante la caracterización de la patología de DPRs en estas células. Además, en caso de que la autofagia esté inducida se observaría una disminución de p62, por lo que sería interesante analizar sus niveles en la fracción soluble tras detener la autofagia con HCQ. Por último, la inhibición de la *IL-1 $\beta$*  podría ser una diana importante para evitar la neuroinflamación.

## Conclusión

Los linfoblastos derivados de pacientes con la mutación de *C9ORF72* no presentan indicios de patología de TDP-43. Esta proteïnopatía se considera un distintivo de la ELA tanto familiar como esporádica, por lo que, aunque exista, es probable que aún no se haya desarrollado en los pacientes de los cuales extrajimos los linfocitos. Sin embargo, se han encontrado valores de p62 elevados en la fracción insoluble, sugiriendo posibles inclusiones de esta proteína. Además, los linfoblastos poseen una mayor resistencia al ayuno y generan menos especies reactivas de oxígeno, por lo que sería interesante estudiar si tienen alterada la autofagia y si ello ha provocado la acumulación de p62 o, si más bien, se deben a inclusiones de DPRs positivas en p62. Por último, el aumento en la expresión de *IL-1 $\beta$*  podría indicar inflamación en la microglía de los pacientes. En vista de estos resultados, podrían ser útiles terapias basadas en la regulación de la homeostasis de p62 y de la *IL-1 $\beta$* , en especial en estadios menos avanzados de la enfermedad.

## Agradecimientos

Quisiera agradecer la elaboración de este trabajo al Máster de Investigación y Desarrollo de Dianas Terapéuticas en Señalización Celular de la Universidad de Alcalá de Henares por concederme la oportunidad de realizar las prácticas en la institución de mi elección y por enseñarme los conocimientos necesarios adquiridos durante el curso. También quiero presentar mis agradecimientos al laboratorio de la Dra. Ana Martínez Gil, por aceptarme en su grupo de investigación y hacerme formar parte de la gran institución que es el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Estar bajo su tutela me ha enseñado mucho acerca de como funciona un laboratorio de investigación y acerca de la línea de investigación en la que quiero especializarme. Dentro de este grupo, quisiera también agradecer especialmente a María de Gracia Porras Franco, quien me ha enseñado y guiado en gran parte de los experimentos; y al resto de compañeros por su ayuda y cariño, son ellos quienes me han hecho sentir parte de este grupo. Por último, quiero agradecer a mi familia, amigos y compañeros del máster por su apoyo durante este último año. Es sin duda un alivio poder contar con todos ellos.

## Bibliografía

- Gendron TF, Petrucelli L. 2018. Disease Mechanisms of *C9ORF72* Repeat Expansions. Cold Spring Harb Perspect Med, 8(4):a024224.
- Smeyers J, Banchi EG, Latouche M. 2021. C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters. Front Cell Neurosci, 15:661447.
- Porras G, Ruiz S, Maestro I, Borrego-Hernández D, Redondo AG, Martínez A, Martín-Requero Á. 2023. Functional Characterization of a Familial ALS-Associated Missense *TBKI* (p-Arg573Gly) Mutation in Patient-Derived Lymphoblasts. Int J Mol Sci, 24(3):2847.
- Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano PF, Pagani W, Lodin D, Orozco G, China A. 2015. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. Surg Neurol Int, 6:171.
- Zhang M, Xi Z, Saez-Atienzar S, Chia R, Moreno D, Sato C, Montazer Haghghi M, Traynor BJ, Zinman L, Rogaeva E. 2021. Combined epigenetic/genetic study identified an ALS age of onset modifier. Acta Neuropathol Commun, 9(1):75.
- Zampatti S, Peconi C, Campopiano R, Gambardella S, Caltagirone C, Giardina E. 2022. C9orf72-Related Neurodegenerative Diseases: From Clinical Diagnosis to Therapeutic Strategies. Front Aging Neurosci, 14:907122.
- Babić Leko M, Župunski V, Kirincich J, Smilović D, Hortobágyi T, Hof PR, Šimić G. 2019. Molecular Mechanisms of Neurodegeneration Related to *C9orf72* Hexanucleotide Repeat Expansion. Behav Neurol, 2019:2909168.
- Balendra R, Isaacs AM. 2018. C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. Nat Rev Neurol, 14(9):544-558.
- Tang D, Sheng J, Xu L, Yan C, Qi S. 2020. The C9orf72-SMCR8-WDR41 complex is a GAP for small GTPases. Autophagy, 16(8):1542-1543.
- Amick J, Ferguson SM. 2017. C9orf72: At the intersection of lysosome cell biology and neurodegenerative disease. Traffic, 18(5):267-276.
- Pang W, Hu F. 2021. Cellular and physiological functions of C9ORF72 and implications for ALS/FTD. J Neurochem, 157(3):334-350.

12. Tang BL. 2016. C9orf72's Interaction with Rab GTPases-Modulation of Membrane Traffic and Autophagy. *Front Cell Neurosci*, 7;10:228.
13. Jiang L, Zhang T, Lu K, Qi S. 2022. The progress in *C9orf72* research: ALS/FTD pathogenesis, functions and structure. *Small GTPases*, 13(1):56-76.
14. McEachin ZT, Parameswaran J, Raj N, Bassell GJ, Jiang J. 2020. RNA-mediated toxicity in C9orf72 ALS and FTD. *Neurobiol Dis*, 145:105055.
15. Beckers J, Tharkeshwar AK, Van Damme P. 2021. C9orf72 ALS-FTD: recent evidence for dysregulation of the autophagy-lysosome pathway at multiple levels. *Autophagy*, 17(11):3306-3322.
16. Lee KH, Zhang P, Kim HJ, Mitrea DM, Sarkar M, Freibaum BD, Cika J, Coughlin M, Messing J, Molliex A, Maxwell BA, Kim NC, Temirov J, Moore J, Kolaitis RM, Shaw TI, Bai B, Peng J, Kriwacki RW, Taylor JP. 2016. C9orf72 Dipeptide Repeats Impair the Assembly, Dynamics, and Function of Membrane-Less Organelles. *Cell*, 167(3):774-788.e17.
17. Vatsavayai SC, Nana AL, Yokoyama JS, Seeley WW. 2019. C9orf72-FTD/ALS pathogenesis: evidence from human neuropathological studies. *Acta Neuropathol*, 137(1):1-26.
18. Shi Y, Lin S, Staats KA, Li Y, Chang WH, Hung ST, Hendricks E, Linares GR, Wang Y, Son EY, Wen X, Kisler K, Wilkinson B, Menendez L, Sugawara T, Woolwine P, Huang M, Cowan MJ, Ge B, Koutsodendris N, Sandor KP, Komberg J, Vangoor VR, Senthilkumar K, Hennes V, Seah C, Nelson AR, Cheng TY, Lee SJ, August PR, Chen JA, Wisniewski N, Hanson-Smith V, Belgard TG, Zhang A, Coba M, Grunseich C, Ward ME, van den Berg LH, Pasterkamp RJ, Trotti D, Zlokovic BV, Ichida JK. 2018. Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nat Med*, 24(3):313-325.
19. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Hosokawa M, Shimozawa A, Hirai S, Okado H, Hasegawa M. 2018. C9ORF72 dipeptide repeat poly-GA inclusions promote intracellular aggregation of phosphorylated TDP-43. *Hum Mol Genet*, 27(15):2658-2670.
20. Ryan S, Rollinson S, Hobbs E, Pickering-Brown S. 2022. C9orf72 dipeptides disrupt the nucleocytoplasmic transport machinery and cause TDP-43 mislocalisation to the cytoplasm. *Sci Rep*, 12(1):4799.
21. Cook CN, Wu Y, Odeh HM, Gendron TF, Jansen-West K, Del Rosso G, Yue M, Jiang P, Gomes E, Tong J, Daugherty LM, Avendano NM, Castanedes-Casey M, Shao W, Oskarsson B, Tomassy GS, McCampbell A, Rigo F, Dickson DW, Shorter J, Zhang YJ, Petrucelli L. 2020. *C9orf72* poly(GR) aggregation induces TDP-43 proteinopathy. *Sci Transl Med*, 12(559):eabb3774.
22. Budini M, Buratti E, Morselli E, Criollo A. 2017. Autophagy and Its Impact on Neurodegenerative Diseases: New Roles for TDP-43 and C9orf72. *Front Mol Neurosci*, 10:170.
23. Posa D, Martínez-González L, Bartolomé F, Nagaraj S, Porras G, Martínez A, Martín-Requero Á. 2019. Recapitulation of Pathological TDP-43 Features in Immortalized Lymphocytes from Sporadic ALS Patients. *Mol Neurobiol*, 56(4):2424-2432.
24. Agosta F, Al-Chalabi A, Filippi M, Hardiman O, Kaji R, Meininger V, Nakano I, Shaw P, Shefner J, van den Berg LH, Ludolph A; WFN Research Group on ALS/MND. 2015. The El Escorial criteria: strengths and weaknesses. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 16(1-2):1-7.
25. Eck RJ, Kraemer BC, Liachko NF. 2021. Regulation of TDP-43 phosphorylation in aging and disease. *Geroscience*, 43(4):1605-1614.
26. Li L, Tan J, Miao Y, Lei P, Zhang Q. 2015. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell Mol Neurobiol*, 35(5):615-21.
27. Zhou J, Li XY, Liu YJ, Feng J, Wu Y, Shen HM, Lu GD. 2022. Full-coverage regulations of autophagy by ROS: from induction to maturation. *Autophagy*, 18(6):1240-1255.
28. McCauley ME, Baloh RH. 2019. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol*, 137(5):715-730.
29. Lastres-Becker I, Porras G, Arribas-Blázquez M, Maestro I, Borrego-Hernández D, Boya P, Cerdán S, García-Redondo A, Martínez A, Martín-Requero Á. 2021. Molecular Alterations in Sporadic and SOD1-ALS Immortalized Lymphocytes: Towards a Personalized Therapy. *Int J Mol Sci*, 16;22(6):3007.