

**Tesis Doctoral**

---

# **Mecanismos moduladores de MOK en la regulación de la respuesta inflamatoria de la microglía en ELA**



---

**Jesús Ángel Pérez Cabello**

**Sevilla, marzo 2024**

**Directora: Cintia Roodveldt**

**Director: David Pozo Pérez**



# ÍNDICE

---



## Índice

1.	Resumen .....	11
2.	Introducción .....	15
2.1.	Esclerosis lateral amiotrófica (ELA).....	15
2.1.1.	Epidemiología, sintomatología y cuadro clínico .....	15
2.1.2.	Fisiopatología: Contexto genético, molecular y celular .....	20
2.1.2.1.	Genes Implicados en ELA.....	21
2.1.2.1.1.	<i>SOD1 (Superoxide Dismutase 1)</i> .....	21
2.1.2.1.2.	<i>C9orf72 (Chromosome 9 open Reading Frame 72)</i> .....	22
2.1.2.1.3.	<i>FUS (Fused in Sarcoma)</i> .....	23
2.1.2.1.4.	<i>TARDBP (Transactive Response DNA Binding Protein)</i> .....	24
2.1.2.1.5.	Genes implicados con menor frecuencia .....	25
2.1.2.2.	Mecanismos moleculares implicados en ELA.....	26
2.1.2.2.1.	Neuroinflamación .....	27
2.1.2.3.	Componentes celulares .....	31
2.1.2.3.1.	Microglía .....	32
2.2.	Señalización por quinasas en neurodegeneración e inflamación .....	38
2.2.1.	Conceptos generales sobre proteínas quinasas.....	38
2.2.2.	Señalización por proteínas quinasas, su papel en enfermedades neurodegenerativas e inflamación .....	39
2.2.2.1.	<i>GSK-3<math>\alpha/\beta</math> (Glycogen synthase kinase 3)</i> .....	40
2.2.2.2.	<i>TBK1 (TANK-binding kinase 1)</i> .....	41
2.2.2.3.	<i>RIPK1 (Receptor-Interacting Kinase 1)</i> .....	42
2.2.2.4.	<i>ROCK1/2 (Rho-Kinase 1/2)</i> .....	42
2.2.2.5.	<i>EPHA4 (EPH receptor A4)</i> .....	43
2.2.3.	<i>MAPK/MAK/MRK Overlapping Kinase (MOK). Caracterización, funciones y localización celular</i> .....	44
2.3.	Familia de proteínas BET: Brd4.....	46
2.3.1.	Brd4: estructura y mecanismos generales .....	46
2.3.2.	Papel de Brd4 en diversas patologías.....	49
2.3.2.1.	Brd4 y sus mecanismos en la respuesta inmunitaria, neuroinflamación y enfermedades neurodegenerativas .....	50
4.	Materiales y métodos.....	61

4.1. Mantenimiento y tratamientos de los cultivos de líneas celulares .....	61
4.2. Generación de clones SIM-A9 MOK-KO .....	62
4.3. Preparación y tratamiento de agregados de TDP-43 .....	62
4.4. Generación de medios condicionados por líneas microgliales SIM-A9.....	63
4.5. Aislamiento y mantenimiento de cultivo de motoneuronas primarias de embriones de ratón .....	63
4.6. Ensayos de medios condicionados por líneas microgliales SIM-A9 sobre cultivos de motoneuronas primarias.....	67
4.7. Aislamiento de microglía primaria de neonatos de ratón .....	67
4.8. Generación de cultivos organotípicos y tratamientos.....	69
4.9. Determinación de viabilidad por ensayo de MTT de líneas celulares NSC-34 .....	69
4.10. Ensayos de viabilidad de motoneuronas primarias de embriones de ratón con medios condicionados de microglía por microscopía de cribado de alta eficiencia .....	70
4.11. Inmunofluorescencia de cultivos celulares .....	71
4.12. Inmunohistoquímica (IHC).....	72
4.13. Inmunofluorescencia de cultivos organotípicos .....	72
4.14. Determinación de citoquinas mediante ELISA .....	73
4.15. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) .....	73
4.16. Purificación de ADN ChIP .....	75
4.17. Caracterización mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de la sonicación (ChIP).....	76
4.18. Extracción de ARN .....	76
4.19. Retrotranscripción .....	77
4.20. PCR cuantitativa (qPCR).....	77
4.21. PCR convencional .....	78
4.22. Transfección de líneas SIM-A9 para medición de citoquinas intracelulares por citometría de flujo .....	79
4.23. Determinación de citoquinas intracelulares por citometría de flujo .....	79
4.24. Western blot.....	80
4.25. Aislamiento de microglía de ratones adultos .....	81

4.26.	<b>Administración de C13 y monitorización de los animales</b>	
	<b>SOD1<sup>G93A</sup></b> .....	82
4.27.	<b>Preparación de lisados celulares e inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas</b> .....	82
4.28.	<b>LC-MS/MS e identificación de proteínas</b> .....	83
4.29.	<b>Secuenciación del transcriptoma completo por clonación al azar (RNA-Seq)</b> .....	84
4.30.	<b>Procesamiento de datos de RNA-Seq y mRNA-Seq</b> .....	85
4.31.	<b>Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes. Ontología génica (GO), enriquecimiento de vías e <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> (IPA)</b> .....	86
4.32.	<b>Marcaje S4U y análisis de SLAM-Seq</b> .....	86
4.33.	<b>Muestras humanas</b> .....	87
4.34.	<b>Modelos animales</b> .....	87
4.35.	<b>Análisis de imágenes mediante inmunohistoquímica</b> .....	88
4.36.	<b>Análisis de imágenes mediante inmunofluorescencia</b> .....	88
4.37.	<b>Alineamiento de secuencias de ADN</b> .....	89
4.38.	<b>Análisis estadístico</b> .....	89
5.	<b>Resultados</b> .....	95
5.1.	<b>Relación entre agregados de TDP-43 y mecanismos regulatorios mediados por MOK en microglía</b> .....	95
5.2.	<b>Relevancia e implicación de MOK en la señalización de IFN tipo-I en microglía</b> .....	100
5.3.	<b>Modulación por MOK de la respuesta inmune mediante la regulación de los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> y su unión a cromatina en microglía</b> .....	115
5.4.	<b>El eje regulatorio bpMOK-pBrd4<sup>Ser492</sup> está alterado en animales SOD1<sup>G93A</sup></b> .....	120
5.5.	<b>Los niveles celulares de MOK están alterados en ELA</b> .....	122
5.6.	<b>MOK como posible diana terapéutica en ELA</b> .....	125
6.	<b>Discusión</b> .....	131
7.	<b>Conclusiones</b> .....	143
8.	<b>Bibliografía</b> .....	147
9.	<b>Abreviaturas</b> .....	173





# RESUMEN

---



## 1. Resumen

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa actualmente incurable que, en el momento del diagnóstico, establece una esperanza de vida de entre 3 y 5 años. Con la evolución de la enfermedad, las motoneuronas terminan degenerando y provocando síntomas severos de debilidad muscular característicos de esta neuropatía que finalmente termina extendiéndose a los músculos de control involuntario. Entre los mecanismos moleculares alterados y las características patológicas observadas en la enfermedad se encuentran descritas vías de estrés oxidativo y de excitotoxicidad, metabolismo de ARN, disfunción mitocondrial o proteasomal, agregación citoplásmica de TDP-43, autofagia o neuroinflamación crónica mediada por microglía. Conforme afloran los hallazgos acerca de esta neuropatología, se hace patente la idea de que pueda estar provocada por un solo mecanismo desencadenante. En este contexto, la neuroinflamación, a pesar de haber tomado creciente interés en los últimos años en enfermedades neurodegenerativas, aún no está presente como diana en las estrategias de intervención sobre la ELA.

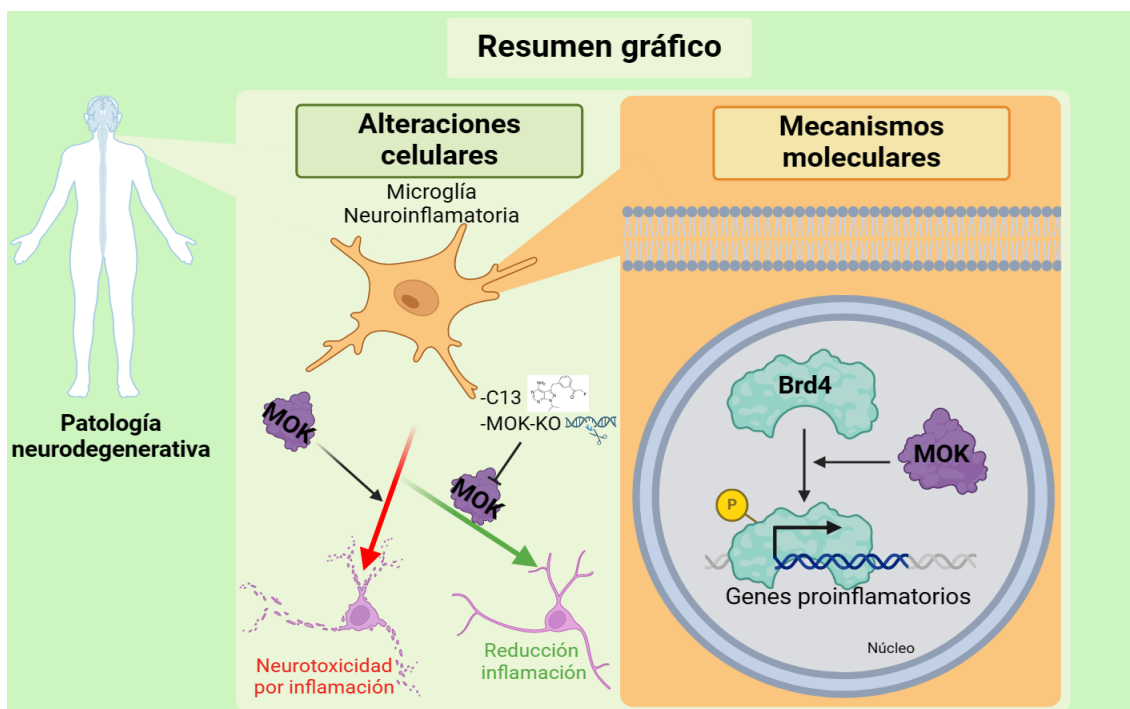
En este contexto inflamatorio, la célula inmune residente del sistema nervioso central (SNC), la microglía, juega un papel relevante en la modulación y desarrollo de la neuroinflamación. Estas células protagonizan las acciones del sistema inmune en el SNC, conduciendo las reacciones de inflamación cuando ocurre un daño, con el objetivo final de volver a un estado de homeostasis. Desafortunadamente, cuando esta comunicación molecular se ve impedida, prolongada en el tiempo o es errática, la microglía puede adoptar funciones neurotóxicas, con un significativo impacto en la fisiología del resto de células del SNC. Numerosas vías de señalización, donde generalmente participan proteínas quinasas, surgen como dianas interesantes de este escenario.

*MAPK/MAK/MRK overlapping kinase* (MOK) es una serina/treonina quinasa poco estudiada que recientemente ha despertado interés en ELA, gracias al hallazgo descrito por nuestro grupo, de su co-localización con agregados de TDP-43 internalizados en el citoplasma de células de microglía. La caracterización realizada en la presente tesis de esta nueva vía de señalización

en un contexto de ELA y neuroinflamación, posiciona a esta proteína como parte del engranaje inmunomodulador de las respuestas inflamatorias y de interferón (IFN) de tipo-I/antiviral. Asimismo, los resultados revelan que la ausencia de la quinasa MOK o su inhibición farmacológica, provocan alteraciones en la respuesta inmune y una consecuente reducción en la liberación de mediadores inflamatorios.

Además, el lector epigenético Brd4 –molécula conocida por sus funciones regulatorias en respuesta inflamatoria–, cuyo estado de fosforilación parece estar modulado por MOK, surge como primera diana funcional de MOK, ganando por tanto un gran interés en este escenario patológico. La investigación realizada en este estudio indica que MOK y Brd4 conforman un eje con funciones en la respuesta inmune, cuya alteración es evidente en modelos preclínicos de ELA. En este escenario, se observan alterados los niveles celulares de MOK bifosforilado (bpMOK) en modelos y pacientes de ELA, poniendo de manifiesto la relación de esta quinasa con la enfermedad.

En resumen, esta investigación desvela nuevas funciones para MOK, que involucran al sistema inmune y al SNC hasta ahora desconocidas, resaltando a Brd4 como la primera molécula regulada por MOK. Además, la modulación de MOK, su estado de activación y sus niveles celulares se encuentran alterados en un contexto de ELA, tanto en modelos preclínicos como en pacientes.



# INTRODUCCIÓN

---



## 2. Introducción

### 2.1. Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

#### 2.1.1. Epidemiología, sintomatología y cuadro clínico

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa mortal y relativamente poco frecuente que afecta al sistema nervioso central (SNC), concretamente a las neuronas motoras superiores e inferiores localizadas en la corteza motora, tallo cerebral y médula espinal (Longinetti & Fang, 2019). Asociado a ello, típicamente se observan inclusiones citoplásmicas de la proteína TDP-43 en neuronas y células gliales en muestras *post-mortem* en casi el 100% de los pacientes de ELA (Amado & Davidson, 2021). Otra característica patológica de la ELA, al igual que ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas, consiste en el desarrollo de microgliosis y neuroinflamación crónica en torno a las regiones afectadas (Bossuyt et al., 2023; Turner et al., 2004).

La ELA presenta una incidencia de 2 casos por cada 100.000 habitantes y una prevalencia en torno a 4,1 y 8,5 pacientes por cada 100.000 habitantes en el mundo (Longinetti & Fang, 2019), siendo reflejados los primeros indicios históricos por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot en 1869 (El Mendili et al., 2019). Por lo general, los síntomas suelen aparecer en individuos adultos al final de la mediana edad (de 45 a 65 años), presentando un avance de la enfermedad inexorable, rápido –más que cualquier otra enfermedad neurodegenerativa (W. Zhang et al., 2023)– y con una progresiva atrofia muscular donde, en última instancia, la afección de los músculos respiratorios produce la muerte, dejando una esperanza de vida a partir del diagnóstico que varía entre 2 y 5 años (Mejzini et al., 2019). A pesar de ello, existe una considerable variabilidad en la edad del diagnóstico, la velocidad de la evolución de la enfermedad o los músculos implicados en la degeneración, pudiendo mostrar un marco de la enfermedad muy diferente de un paciente a otro (Ahmed et al., 2020; Taylor et al., 2016). De la misma manera, el origen de la enfermedad también ofrece un ligero marco temporal diferencial en la

aparición de los primeros síntomas, donde pacientes con ELA familiar (ELA-F, pacientes con algún familiar que haya padecido la enfermedad anteriormente) suelen presentarlos con precocidad en un rango que comienza a los 40 años, mientras que pacientes que padecen ELA esporádica (ELA-E, pacientes sin antecedentes familiares conocidos que hayan padecido la patología aparentemente) presentan los primeros síntomas a los 58-63 años de media (Beghi et al., 2011). Con la evidencia científica actual, los casos familiares representan en torno al 5-10% del total de pacientes, siendo el 90-95% restante casos esporádicos (Suzuki et al., 2023) **(Fig. 1)**.

La ELA es una enfermedad con origen en una región focalizada y que, con el transcurso del tiempo, se va expandiendo por el resto de las regiones motoras del organismo de forma que, en el momento de la aparición de los síntomas, la expansión del daño es considerable. Por lo general, los síntomas suelen aparecer en las extremidades superiores, aunque no son raros los casos donde el inicio se da en las extremidades inferiores (Feldman et al., 2022). Además de la debilidad y espasmos musculares generalizados, también se observan disfagias, disartrias y disneas; aunque los músculos involuntarios por lo general no se ven afectados hasta etapas finales de la patología (Taylor et al., 2016). Con todo ello, actualmente, la ELA se considera una enfermedad neurodegenerativa multisistémica cuyos primeros síntomas suelen originarse en las extremidades y que progresivamente se va extendiendo por el resto de músculos del organismo (Masrori & Van Damme, 2020). En consecuencia, cerca del 50% de los pacientes sufren manifestaciones sintomatológicas más allá de problemas musculares de algún grado, y en torno al 15% pueden sufrir otras enfermedades como la demencia frontotemporal (DFT), e incluso más de un 35% de los pacientes presentan cambios leves en su comportamiento, alteraciones cognitivas o dificultades en la capacidad para hablar (Ahmed et al., 2020). Con todo ello, el resultado es una amalgama heterogénea de patrones sintomatológicos en el desarrollo de la enfermedad a pesar de tener un final común. En etapas terminales de la patología, donde los sistemas musculares encargados de la respiración terminan fallando, los pacientes suelen ser sometidos a ventilación asistida mediante traqueotomía (Kiper et al., 2023). Finalmente, los pacientes terminan por alcanzar un estado de total inmovilidad



materializado en una parálisis facial y oculomotora total de los músculos voluntarios (Kiper et al., 2023; Suzuki et al., 2023).

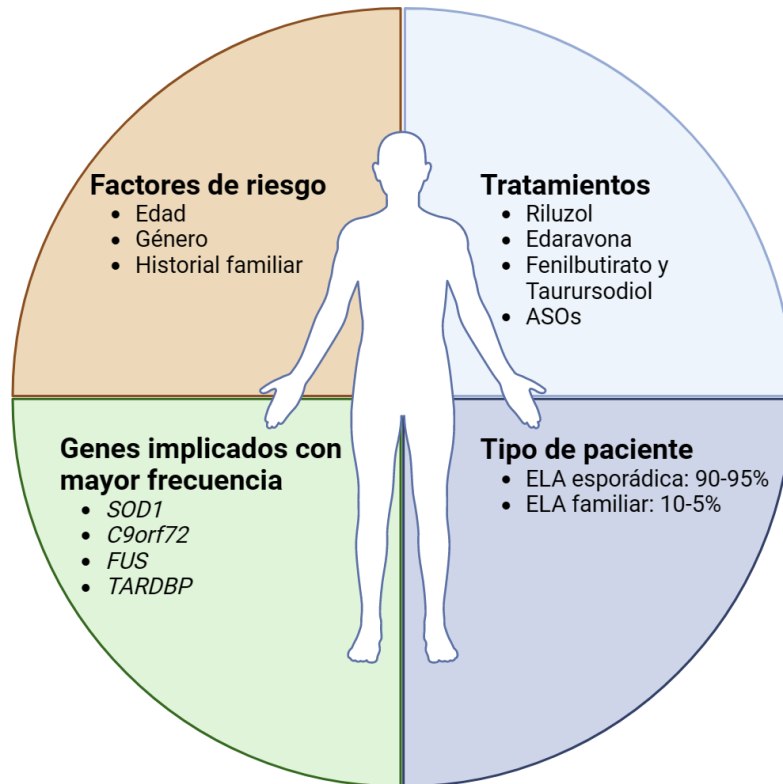
Generalmente, el diagnóstico de la enfermedad suele confirmarse tras un año de la aparición de los primeros síntomas (Suzuki et al., 2023), siendo éste un proceso lento debido en parte al tiempo que transcurre hasta el primer contacto con un profesional que dé comienzo al diagnóstico, o debido a la gran heterogeneidad que esta neuropatía puede presentar de un paciente a otro, lo que aumenta el tiempo sustancialmente. Asimismo, hay que destacar que el diagnóstico de la ELA es de carácter clínico, no existiendo ninguna prueba diagnóstica específica (Falcão de Campos et al., 2021). En este proceso de valoración se realizan numerosas pruebas con el fin de descartar del diagnóstico otras neuropatías cuyos síntomas son coincidentes con los de la ELA, como pueden ser exámenes neurológicos o de electrodiagnóstico, imagen por resonancia magnética (MRI), o también seguir el criterio de diagnóstico de “El Escorial” o el actualizado “*Gold Coast Criteria*” (Feldman et al., 2022; Genge & Chio, 2023).

Aunque se han valorado y estudiado numerosos factores de riesgo como el tabaco, el alcohol, la actividad física intensa o la actividad laboral estresante, no existe una clara relación de causa, siendo una enfermedad extendida entre todos los grupos étnicos del mundo, aunque sí presenta variabilidad geográfica de los diferentes genes implicados (Chapman et al., 2023; Mezzini et al., 2019; Suzuki et al., 2023). Como se ha destacado anteriormente, la aparición de la enfermedad es más frecuente en pacientes con un historial familiar relacionado con ELA y de mayor edad, siendo *de facto* éstos los escasos factores de riesgo claramente identificados (Bagyinszky et al., 2023; Talbott et al., 2016) (**Fig. 1**). Aun así, por ejemplo, se han descrito que los genotipos *UNC13A* y la repetición expandida en el gen de la ataxina-2 (*ATXN2*) pueden ser factores que incrementen la probabilidad de sufrir ELA-E, entre otros (Amado & Davidson, 2021; Goutman et al., 2022; Willemse et al., 2023). Llamativamente, los hombres suelen sufrir la enfermedad de manera esporádica con mayor incidencia que las mujeres, en torno a 1,3 hombres por cada mujer, siendo éste otro factor de riesgo (Ingre et al., 2015). La aparición y diagnóstico suele ser más temprana en hombres, mostrando además características clínicas

relativamente diferentes. Por ejemplo, las mujeres suelen presentar un origen de la enfermedad de tipo bulbar, mientras que en los hombres suele originarse en regiones espinales del SNC. Sin embargo, el género no tiene efecto en el tiempo de supervivencia (McCombe & Henderson, 2010).

El entendimiento de la ELA pasa por una mezcla compleja de factores, tanto genéticos como ambientales, donde el deterioro y senescencia de las motoneuronas es el punto común debido a diferentes mecanismos, como el metabolismo anormal de glutamato, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, respuestas inflamatorias u otras proteinopatías (Caballero-Hernandez et al., 2016; Masi et al., 2022; Moujalled et al., 2021; Suzuki et al., 2023). Desgraciadamente, la falta de tratamiento eficaz ante esta patología repercute en un periodo de supervivencia corto desde el momento del diagnóstico, como se ha resaltado anteriormente (Kim et al., 2020; Kiper et al., 2023). Dichos tratamientos están centrados principalmente en el manejo de la sintomatología, fisioterapia y asistencia respiratoria en etapas finales. A pesar de ser descrita por primera vez hace unos 160 años, y habiéndose realizado numerosos ensayos en modelos animales preclínicos en las dos últimas décadas (L. Chen et al., 2023), en la actualidad los únicos medicamentos aprobados para el tratamiento de la ELA son el Riluzol, la Edaravona, y más recientemente, el Fenilbutirato de sodio y Taurursodiol, aunque solo tienen un modesto beneficio, retrasando el avance de la enfermedad unos pocos meses (Paganoni et al., 2020; Suzuki et al., 2023) (**Fig. 1**). Se conoce muy poco del mecanismo molecular de acción del primero, a pesar de ser el principal tratamiento contra la ELA desde 1995 (Jaiswal, 2019; Saitoh & Takahashi, 2020). Este medicamento alivia la toxicidad glutamatérgica sufrida por las neuronas y que provoca su muerte (Saitoh & Takahashi, 2020). De igual manera, escaso es el conocimiento sobre el mecanismo de acción de la Edaravona, cuyo efecto reduce la aparición de radicales libres de oxígeno gracias a su actividad antioxidante (Jaiswal, 2019). El Fenilbutirato de sodio y Taurursodiol, aprobados como nueva opción de tratamiento para la ELA por la FDA (del inglés, *Food and Drugs Administration*) en 2022, han ganado relevancia gracias a la identificación de su capacidad para inhibir la apoptosis neuronal, ya que se espera que su acción combinada reduzca el estrés oxidativo en mitocondrias y

el retículo endoplasmático (Paganoni et al., 2020; Tzeplaeff et al., 2023). Aun así, los efectos reportados hasta el momento por las diferentes terapias no son significativos en cuanto al curso de la enfermedad, mostrando un beneficio muy pobre.



**Fig. 1. Recopilatorio de los factores de riesgo, medicamentos, genes asociados y origen de los pacientes afectados por la ELA.** ELA: Esclerosis lateral amiotrófica, *SOD1*: Superóxido dismutasa, *C9orf72*: *Chromosome 9 open Reading Frame 72*, *FUS*: *Fused in sarcoma*, *TARDBP*: *Transactive Response DNA Binding Protein*, ASOs: oligonucleótidos antisentido. Imagen generada mediante Biorender.com

En vista de este contexto, es necesario mejorar los conocimientos sobre la etiología y los mecanismos patogénicos de la enfermedad, además de estudiar el perfil genético y molecular de cada paciente, permitiendo así entender el origen de los síntomas con el fin de alcanzar un tratamiento clínico eficaz y personalizado para cada escenario (Fang et al., 2022). Hacia esa dirección avanzan los estudios preclínicos de Korobeynikov y colaboradores, donde un diagnóstico temprano y preciso de la genética tras cada paciente (en concreto, la mutación *FUS*<sup>P525L</sup>) permitiría generar una medicina a la carta mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (ASOs, del inglés *antisense*

*oligonucleotides*) contra la proteína mutada (Korobeynikov et al., 2022). También bajo esta misma estrategia encontramos el Tofersen, medicamento recientemente aprobado por la FDA y cuya aprobación también ha sido recomendada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, 2024), que consiste también en ASOs pero contra el ARN mensajero de *SOD1*, permitiendo una reducción significativa, aunque modesta, de los niveles de *SOD1* –tanto de la forma nativa como de la mutada– en fluidos de pacientes de ELA-F *SOD1* (Blair, 2023; Saini & Chawla, 2023).

Desde 1996, cerca de 40 ensayos clínicos con más de un centenar de participantes cada uno han sido realizados con medicamentos potencialmente beneficiosos para el tratamiento de la ELA, aunque muy pocos con relativo éxito; como es el caso de los ya citados (Shefner et al., 2022). En la actualidad, la propia selección y criba de pacientes juega un papel vital a la hora de obtener conclusiones de dichos ensayos, por lo que se usan criterios de inclusión o exclusión restrictivos, como puede ser el tiempo entre los primeros síntomas y el inicio del tratamiento experimental, que permiten extraer la mayor cantidad de información útil posible (Fang et al., 2022; Shefner et al., 2022). En este momento existen numerosos ensayos clínicos en marcha, donde se busca desde una mejor monitorización de los síntomas, seguimiento y bienestar de los pacientes (NCT05276349), hasta la búsqueda de nuevos biomarcadores por imagen (NCT02567136), pasando por conocer mejor las variantes genéticas de los pacientes y qué impacto puede tener (NCT04819555), o el desarrollo de nuevos medicamentos (NCT04654689).

### **2.1.2. Fisiopatología: Contexto genético, molecular y celular**

Si bien la ELA conlleva un marcado componente genético, los numerosos genes y polimorfismos que predisponen la enfermedad son actualmente bastante desconocidos y requieren aún de estudio, lo que no facilita un conocimiento adecuado de los mecanismos patológicos involucrados (Caballero-Hernández et al., 2016; Sironi et al., 2023). La excesiva variabilidad entre pacientes y la dificultad de generar modelos preclínicos fiables que ejemplifiquen y permitan trasladar correctamente los mecanismos de la enfermedad y de dichos resultados a un contexto clínico beneficioso, sigue

siendo uno de los principales retos que conlleva esta patología (Ahmed et al., 2020). Por este motivo, el estudio minucioso de la detección y caracterización de los componentes implicados (a nivel genético, molecular y celular) juegan un papel vital a la hora de entender los diferentes mecanismos que pueden originar y desarrollar la enfermedad.

### **2.1.2.1. Genes Implicados en ELA**

Numerosos genes han sido identificados como potenciales mediadores en esta neuropatía, por lo general, participando con una ganancia de función en la mayoría de los casos y su pérdida o ambas en otros (Siddique N, 2002). Aunque se han identificado más de 50 genes relacionados con la muerte de las neuronas motoras y la ELA, destacan los genes *SOD1*, *C9orf72*, *TARDBP* y *FUS* por su frecuencia de aparición en pacientes (Mejzini et al., 2019; Suzuki et al., 2023) (**Fig. 1**).

#### **2.1.2.1.1. *SOD1* (Superoxide Dismutase 1)**

En 1993 se identificó el primer gen asociado a ELA, cuyo producto origina la superóxido dismutasa 1 (*SOD1*), una proteína de 153 aminoácidos expresada en todos los tejidos cuya función principal es la de proteger a las células del estrés oxidativo mediante la actividad catalítica de transformación de aniones superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (Amado & Davidson, 2021; S. J. Kaur et al., 2016). Las mutaciones en *SOD1*, del cual se conocen hasta la fecha cerca de 220 mutaciones o variantes con implicación en ELA, están presentes en torno al 20% de los casos de ELA-F y al 1 ó 2% de los casos de ELA-E, aunque ambos son clínicamente indistinguibles sin ayuda del historial familiar (Zou et al., 2017). Curiosamente, sí que existe una correlación entre el avance y desarrollo de la enfermedad y la mutación portada en el gen (Bagyinszky et al., 2023). La más estudiada es la mutación humana *SOD1*<sup>G93A</sup> (Gurney et al., 1994), la cual es usada en ratones transgénicos (*SOD1*<sup>G93A</sup>) como el principal modelo preclínico de la enfermedad, ya que agrupa muchas similitudes sintomatológicas de la patología humana (L. Chen et al., 2023; Sironi et al., 2023). Por otro lado, las mutaciones en *SOD1* como A4V muestran una sintomatología agresiva, que comienza con una debilidad muscular de las extremidades y músculos bulbares que deja una esperanza de vida de 2 años de media a los pacientes (S. J. Kaur et al., 2016). En general,

todas estas mutaciones suelen provocar el mal plegado de la proteína, poniendo en compromiso su estabilidad y función, lo que resulta en la oligomerización y agregación de la misma o incluso la formación de agregados de tipo amiloide (Broom et al., 2015; L. Q. Wang et al., 2022). Como resultado, se termina generando daño mitocondrial, estrés oxidativo, desregulación de los niveles de citoquinas y afectación de la homeostasis interna del calcio, entre otros, lo que finalmente perturba a las comunicaciones glía-motoneurona, traduciéndose en la muerte de las mismas (Bagyinszky et al., 2023).

#### **2.1.2.1.2. C9orf72 (Chromosome 9 open Reading Frame 72)**

En el año 2011 tomó gran relevancia el gen *C9orf72* debido a su identificación como gen asociado a la ELA y por ser el producto génico que más frecuentemente se encuentra alterado en esta enfermedad, estando presente en el 40% y en el 5% de los casos familiares y esporádicos, respectivamente (Meijboom & Brown, 2022). Destacablemente, también es la mayor causa genética en DFT, aunque en esta última no está limitada sólo al SNC, sino que también se expresa en sistema nervioso periférico, médula ósea o bazo (McCauley & Baloh, 2019). Brevemente, las mutaciones en este gen consisten en la repetición del hexanucleótido (GGGGCC) que, por lo general, suele estar presente en un número inferior a las 24 copias en personas sanas, pero que puede llegar a miles en pacientes de ELA debido a su expansión y repetición (Dejesus-Hernandez et al., 2012).

A partir de este gen, se dan tres variantes por *splicing* alternativo (V1, V2 y V3) que posteriormente se traducen en proteínas, donde la primera y tercera variante portan la expansión repetida del hexanucleótido antes de su eliminación como intrones (Meijboom & Brown, 2022). En condiciones normales, estas proteínas resultantes en sus tres variantes poseen función en el tráfico de vesículas y generación de lisosomas que se da en motoneuronas (Shi, 2018). Sin embargo, debido a la repetición masiva del hexanucleótido en neuronas, éste termina por alterar su propia transcripción, secuestrando proteínas de unión a ARN y alterando el metabolismo general de ARN, conllevando adicionalmente la ausencia de su propia expresión. Esto a su vez, promueve la agregación y generación de focos de los transcritos generados o de la misma proteína aberrante que porta la repetición del dipéptido,

provocando finalmente respuestas inmunes anormales, como la liberación de citoquinas con resultado proinflamatorio, lo que genera a su vez neurodegeneración (Goutman et al., 2022). Así es el caso, por ejemplo, en modelos preclínicos de ratón, donde la eliminación de *C9orf72* en macrófagos y microglía causa la acumulación de lisosomas, además de un estado de activación que conlleva el aumento de la liberación de citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 $\beta$  (O'Rourke, 2016).

#### **2.1.2.1.3. FUS (*Fused in Sarcoma*)**

Otro gen de relevancia para la aparición de ELA es *FUS* (del inglés *Fused in Sarcoma*, también conocido como “translocado en liposarcoma”) (Meijboom & Brown, 2022). En 2009, se demostró que mutaciones en este gen suele provocar la aparición de síntomas descritos en ELA en pacientes jóvenes de alrededor de 45 años, con un avance y progresión de la enfermedad relativamente rápido (Mejzini et al., 2019). Por lo general, está presente en un 4% de los casos de herencia familiar y en un 1% de los casos esporádicos de la enfermedad (Fang et al., 2022).

El resultado de las mutaciones sufridas en este gen, del cual se conocen en la actualidad más de 120 variantes implicadas en ELA, provoca que su función como proteína de unión a ARN se vea comprometida, generando por tanto su agregación y su deslocalización celular (Mejzini et al., 2019). Dicha proteína, cuya localización nativa es el núcleo celular, se encuentra implicada en mecanismos de reparación de ADN por recombinación homóloga durante la rotura de doble cadena o la unión de extremos no homólogos (Amado & Davidson, 2021; Peters et al., 2015). Sin embargo, también tiene gran importancia en mecanismos relacionados con el metabolismo, procesamiento, transporte y estabilidad de ARN, miARN y ARN no codificante (Amado & Davidson, 2021). De esta forma, es frecuente encontrar en pacientes que células del SNC, como células gliales o neuronas, tengan alteradas la región C-terminal de la proteína –encargada de su localización nuclear–, generando deslocalización hacia el citoplasma (Korobeynikov et al., 2022; Scekcic-Zahirovic et al., 2016). Cabe resaltar que, aunque se ha observado con estudios *in vivo* que, debido a la pérdida de función y su deslocalización al citoplasma provoca toxicidad para las neuronas, también se ha demostrado que una ganancia de

función podría favorecer una muerte celular, por lo que si el efecto se debe a ganancia, pérdida o ambas, sigue siendo tema de debate, al igual que para la mayoría de genes implicados en ELA (Kim et al., 2020).

#### **2.1.2.1.4. TARDBP (*Transactive Response DNA Binding Protein*)**

El gen *TARDBP* (del inglés *Transactive Response DNA Binding Protein*) codifica para la proteína TDP-43, la cual es una molécula con capacidad de unión a ADN y ARN, que en 2006 se descubrió como uno de los elementos característicos de la ELA por su agregación citoplasmática aberrante en neuronas y células gliales en casi todos los pacientes (Arai et al., 2006; M. Neumann et al., 2006). Las más de 50 mutaciones de *TARDBP* identificadas en el marco de la ELA, se localizan en el 5% y 1% de los orígenes familiares y esporádicos, respectivamente (Meijboom & Brown, 2022).

A pesar de no presentar siempre mutaciones en el gen, los agregados hiperfosforilados y ubiquitinados de dicha proteína se han encontrado en el citoplasma de neuronas afectadas en casi la totalidad de los casos diagnosticados de la neuropatía, por lo que sus funciones como regulador en el metabolismo, *splicing* y transporte del ARN se verían afectados (Amado & Davidson, 2021; Masrori & Van Damme, 2020; Peters et al., 2015). Además, tanto la reducción o eliminación de TDP-43 –que aleja a la proteína de sus funciones normales– como su sobreexpresión en modelos preclínicos causan marcos patológicos característicos de la ELA, lo cual coloca a TDP-43 como un elemento principal del eje en la convergencia y origen de la enfermedad (Brown et al 2022; Meijboom & Brown, 2022; Taylor et al., 2016).

El hecho de que su sobreexpresión y acumulación citoplasmática en neuronas recapitule el fenotipo neurodegenerativo en ratones sugiere para TDP-43 una ganancia de función tóxica, por ejemplo, sensibilizando a las neuronas a futuros estímulos de estrés. Otro efecto asociado a la acumulación citoplásmica de la proteína es la reducción de los niveles de TDP-43 nuclear, cuyos mecanismos no están del todo dilucidados (Meijboom & Brown, 2022; Wood et al., 2021). Sin embargo, se acepta que los propios agregados de TDP-43 pueden secuestrar a la forma nativa de la proteína, generando una pérdida de función de la misma en el núcleo celular (Chou et al., 2018). Paralelamente, la



acumulación de TDP-43 citoplásmica y la formación de agregados de la proteína, genera consecuentemente una ganancia de función tóxica, que además se acompaña de la pérdida de función nativa de TDP-43 (Keating et al., 2022; Wood et al., 2021).

Por otro lado, rara vez se encuentran en pacientes de ELA agregados de TDP-43 junto a los de FUS o SOD1, sugiriendo que las vías celulares por la que se dan ambos fenómenos son distintas, y quizás alternativas, a pesar de tener roles y funciones parecidos en la célula (Jeon et al., 2019; Vance et al., 2009; Zeineddine et al., 2017). En resumen, aunque existe un gran consenso acerca de la importancia de esta proteína en el marco patológico de la ELA, los mecanismos que generan toxicidad y disfunción celular, tanto mediante ganancia como pérdida de función, siguen siendo objeto de estudio.

#### **2.1.2.1.5. Genes implicados con menor frecuencia**

Como se han destacado anteriormente, existen numerosos genes con implicación en ELA, entre los que también podemos recalcar por su frecuencia a *TBK1* (Gerbino et al., 2020), *UNC13A* (Suzuki et al., 2023) y *ATXN2* (Amado & Davidson, 2021). La primera proteína, (del inglés *TANK-Binding Kinase 1*), juega un papel notable en la regulación de la autofagia, la inmunidad innata, la apoptosis y la neuroinflamación mediante la producción de interferón (IFN) de tipo-I y la activación de la vía NF- $\kappa$ B e interleuquinas proinflamatorias (Kim et al., 2020; Oakes et al., 2017). *TBK1* ha sido identificado en varios estudios, tanto en ELA-F como ELA-E (Cirulli, 2015; Freischmidt et al., 2015).

Por otro lado, la desaparición de TDP-43 nuclear que se observa de manera concomitante a la formación de agregados de TDP-43 citoplásmicos, genera grandes cambios en el *splicing* alternativo de *UNC13A*, mostrando la implicación de este último en ELA y su posible regulación por TDP-43 (Ma et al., 2022). *UNC13A* está implicado en el transporte de vesículas, siendo numerosos los estudios que le atribuyen un importante papel en la rapidez de progresión y en el tiempo de supervivencia de la enfermedad tomando en cuenta la diversidad que ofrecen sus polimorfismos (Vidal-Taboada et al., 2015).

El gen *ATXN2*, el cual codifica para la proteína ataxina-2, también interacciona con TDP-43 y está implicado en funciones de procesamiento de ARN, endocitosis, maduración de gránulos de estrés y modulación de la vía mTOR (Becker et al., 2017), cuya alteración aumenta el riesgo de padecer ELA (Sproviero et al., 2017).

### **2.1.2.2. Mecanismos moleculares implicados en ELA**

La gran variedad de genes que podemos encontrar en la ELA es un reflejo de las numerosas funciones celulares que se ven implicadas en la misma, ya sea por ganancia o pérdida de función (Kim et al., 2020). Paradójicamente, ello no evita que tengamos una falta de conocimiento acerca de las moléculas y vías de señalización implicadas en dichos mecanismos, lo cual se refleja en los limitados beneficios de las terapias aplicadas hasta la fecha (Amado & Davidson, 2021). Funciones alteradas mencionadas anteriormente, tales como metabolismo de ARN, estrés oxidativo, disfunción de la regulación mitocondrial, agregación de proteínas y alteraciones de la proteostasis, perturbaciones del citoesqueleto, el transporte de vesículas y autofagocitosis o las vías de señalización de la apoptosis, se ven involucradas en esta neuropatología (Peters et al., 2015).

Por lo general, cuando se analizan pacientes con ELA-F y se examinan los genes destacados anteriormente, se observa tanto una ganancia de función tóxica como una pérdida de función, las cuales suelen presentar una herencia autosómica dominante o semidominante (Kim et al., 2020). Estas alteraciones generan cambios en los mecanismos citados provocando el desarrollo de la enfermedad, a pesar de contar con una copia silvestre del gen en el cromosoma homólogo (Peters et al., 2015). En este contexto, el reto es aún mayor ya que, como en el caso de *C9orf72*, el origen de la toxicidad no surge de su función normal, sino de la ganancia de toxicidad al generarse un transcrito o proteína aberrante. Tanto este ARN como la proteína aberrante, independientes de la función normal del gen, se ofrecen como dianas terapéuticas interesantes ya que no afectarían a los mecanismos celulares normales de la proteína (Bagyinszky et al., 2023). Sin embargo, aún no está definida cuál es la función comprometida, sino que se hipotetiza que estas proteínas o ARN aberrantes, al agregarse, terminan generando gránulos de

estrés o alterando a terceros mecanismos celulares, incluso afectando a otras proteínas de unión a ARN (Masrori et al., 2022). Otro ejemplo más se ha observado *in vivo*, donde la acumulación de autofagosomas en el citoplasma de neuronas localizadas en la médula espinal de pacientes ELA (Sasaki, 2011), al igual que en el extendido modelo de ratón SOD1<sup>G93A</sup> (Morimoto et al., 2007), manifiesta alteraciones en el transporte vesicular. En ocasiones, como en el ejemplo de TDP-43, discernir entre ganancia o pérdida de función no es sencillo (Prasad et al., 2019; Taylor et al., 2016). Así, como ocurre en este ejemplo, ambos parecen ir de la mano, perdiéndose la función normal de la proteína en el núcleo y generándose nuevas que repercuten en carencias en el metabolismo de ARN, en alteraciones en el transporte axonal, proteostasis y generación de gránulos de estrés que, además, pueden extenderse a otras células vecinas con un mecanismo de tipo priónico (Meijboom & Brown, 2022). Por estos motivos, cada vez se le otorga más importancia a estudiar los genes y sus proteínas desde un punto de vista tanto de ganancia de toxicidad a la par que de pérdida de función, facilitando potencialmente el desarrollo de terapias más eficaces y personalizadas.

Aunque los mecanismos patológicos de la ELA llevan siendo objeto de estudio durante décadas, éstos siguen siendo una cuestión llena de incógnitas, principalmente en pacientes de ELA-E. Como resultado, la idea de que un solo mecanismo o evento puntual genere la enfermedad va perdiendo fuerza, lo que implica que es la suma de múltiples factores lo que genera esta neuropatía, hecho facilitado por la gran heterogeneidad existente, tanto a nivel genético como fenotípico (Mejzini et al., 2019).

#### **2.1.2.2.1. Neuroinflamación**

Cada vez más, el papel de la neuroinflamación crónica es identificado como un elemento común en enfermedades neurodegenerativas como el Párkinson, el Alzheimer o la ELA, siendo un tema de investigación de relevancia creciente (McGeer & McGeer, 2002a, 2002b; W. Zhang et al., 2023). La activación crónica de la microglía desde etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad en pacientes, incluso antes de la observación de signos de neurodegeneración en modelos animales, es un hecho ampliamente reportado en la literatura (Brites & Vaz, 2014; Kwon & Koh, 2020; Malaspina et al., 2015).

En este sentido, estudios en modelos preclínicos de ELA muestran un fenotipo dual inflamatorio, presentando en principio un efecto mayoritariamente neuroprotector y antiinflamatorio que termina derivando en fenotipos proinflamatorios y neurotóxicos, un fenómeno probablemente extensible a pacientes (Beers & Appel, 2019). De esta forma, se conjetura que en individuos sanos esta neuroinflamación limitada y controlada tiene un cometido crucial en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, la recuperación de daños o la eliminación de patógenos, siendo una respuesta beneficiosa para el individuo. Sin embargo, de alguna manera, este mecanismo por el cual el sistema inmune genera un estado de activación y neuroinflamación leve crónica termina desembocando en la muerte de las neuronas de una manera celular no-autónoma, hecho que ha sido identificado en casi la totalidad de los pacientes de ELA (Beers & Appel, 2019; Brown et al., 2017). Esta neuroinflamación mediada por la activación de microglía y astrocitos –también conocida como microgliosis y astrogliosis, respectivamente–, las infiltraciones de linfocitos T y la producción de citoquinas, ha sido identificada en modelos preclínicos murinos, mostrando un papel neuroprotector en unos casos o perjudicial en otros dependiendo del momento de la enfermedad (Thonhoff et al., 2018). Esta activación microglial y del resto de células inmunes lleva a la liberación de mediadores proinflamatorios –como IL-6, IL-1 $\beta$  o TNF $\alpha$ –, fenómeno observado en pacientes y modelos animales, causante clave de la cronificación y de los efectos neurotóxicos característicos de la neurodegeneración (Beers & Appel, 2019; Cereda et al., 2008; Morello et al., 2017).

A pesar de ser clara la participación de la neuroinflamación en diversas neuropatologías, los mecanismos desencadenantes de la misma no están claramente definidos, teniendo como dogma aceptado que los agregados de proteínas son los principales elementos causales. Actualmente, la evidencia apoya cada vez más la idea de que no es simplemente la propia agregación la desencadenante de la respuesta inmune, sino que, como se ha observado en Alzheimer, la neuroinflamación también contribuiría a la formación de estos agregados en etapas tempranas del proceso patológico (W. Zhang et al., 2023). Hay numerosos candidatos que emergen como posibles iniciadores del

fenómeno neuroinflamatorio crónico: desde factores endógenos, como la mencionada agregación de proteínas aberrantes; factores ambientales, como una infección; el tipo de alimentación; el envejecimiento; o la propia predisposición genética de los individuos (Beers & Appel, 2019; W. Zhang et al., 2023). En cualquier caso, la imposibilidad de resolver este tipo de alteraciones homeostáticas podría facilitar el inicio y cronificación de un estado de gliosis e inflamación.

Como se ha puntualizado, una de las proteínas que casi invariablemente se ve alterada en ELA es TDP-43, encontrándose agregados de dicha proteína en casi la totalidad de los pacientes (M. Neumann et al., 2006). Asimismo, se ha descrito que la sobreexpresión de TDP-43 en líneas celulares de microglía estimula la producción de mediadores proinflamatorios, teniendo un efecto neurotóxico (Y. Z. Liao et al., 2022; Swarup et al., 2011). Por otra parte, en microglía primaria la exposición a agregados extracelulares solubles de TDP-43 y su posterior internalización permitió identificar por primera vez la activación de respuestas inflamatorias neurotóxicas, en particular mediante activación de la vía NF- $\kappa$ B y del inflamasoma NLRP3, resultando en la secreción de IL-1 $\beta$  (Leal-Lasarte et al., 2017; Zhao et al., 2015) y de IL-18 (Leal-Lasarte et al., 2017). Asimismo, se cree que tanto la propia agregación de proteínas SOD1 como de TDP-43 es reconocida como un daño por el sistema inmune innato, generando una respuesta inflamatoria que, por lo general, sería rápidamente eliminada y revertida a una situación de homeostasis inmunológica, pero que en el contexto de ELA se cronifica, forjando un resultado neurodegenerativo (McGrath et al., 2023; Taylor et al., 2016).

Otro mecanismo implicado en ELA y en neuroinflamación es el papel que desempeña la microglía en el SNC o los macrófagos en tejidos periféricos, quienes actúan como células presentadoras de antígenos activando la respuesta inmune adaptativa de linfocitos B y T, lo cual puede desencadenar piroptosis (muerte celular programada citolítica mediada por el sistema inmune) o neurotoxicidad (Goutman et al., 2022; Lyon et al., 2019; Sutter & Crocker, 2022). Paralelamente, en el mantenimiento de la homeostasis, las células inmunocompetentes pueden provocar degeneración errática en los terminales sinápticos o las uniones neuromusculares al realizar mecanismos de

eliminación de restos celulares o reparación de daños (J. Liu & Wang, 2017; Sutter & Crocker, 2022).

En este contexto, se han realizado estudios usando tomografía por emisión de positrones (PET) en pacientes y en modelos de ratón SOD1<sup>G93A</sup>, que correlacionan una mayor activación microglial en la corteza motora con una mayor gravedad de la degeneración de las motoneuronas (Amor et al., 2021; Turner et al., 2004). Otras técnicas de imagen, como la resonancia magnética, han permitido asociar en modelos preclínicos y pacientes de ELA la deposición de hierro en la corteza motora con la inflamación en dichos tejidos. Por otro lado, el estudio *post mortem* del SNC de pacientes de ELA refleja el aumento de genes dependientes de la señalización mediada por TLR4 (del inglés *Toll-like Receptor*) y de la activación constitutiva del factor de transcripción STAT3 en microglía (Amor et al., 2021).

Desde otra perspectiva, es interesante encontrar marcadores de la neuroinflamación tales como CD68, Iba1 y HLA-DR, que aportan información *post mortem* acerca de la activación microglial y neuroinflamación en las regiones afectadas por la neurodegeneración, en tejidos de materia blanca (Woollacott et al., 2020). En la misma línea, se han observado subpoblaciones de células de microglía CD34 y CD11b positivas adyacentes a neuronas en proceso degenerativo en pacientes de ELA, fenómeno no observado en individuos sanos, y que apunta a un efecto inflamatorio y neurotóxico. Es importante recordar que estos cambios celulares e histológicos que perturban la homeostasis podrían ocurrir ya en etapas pre-sintomáticas, caracterizadas por una activación temprana de astrocitos y microglía generando una acumulación de daño previa a la sintomatología (Amor et al., 2021).

Cabe destacar que las biopsias líquidas mediante muestras de sangre podrían servir como fuente de biomarcadores que reflejen la situación neuroinflamatoria, lo que podría facilitar realizar pronósticos y diagnosticar la enfermedad para iniciar los tratamientos lo antes posible (Staats et al., 2022). Un desafío significativo en este aspecto es encontrar biomarcadores de neuroinflamación específicos de ELA, permitiendo discernir perfiles de otras enfermedades neurodegenerativas (Irwin et al., 2023; Staats et al., 2022).

Determinar en qué etapa se encuentra la enfermedad puede aportar una mejora significativa de la eficacia del tratamiento y la consiguiente reducción de la microgliosis y el marco inflamatorio (Zou et al., 2017).

Teniendo en cuenta la importancia de la neuroinflamación en la neurodegeneración y pérdida neuronal, es interesante encontrar tratamientos que pongan el foco en esta inmunomodulación. Mora y colaboradores comprobaron en un ensayo clínico de fase III la eficacia del medicamento Masitinib, gracias a su mecanismo de acción antiinflamatoria mediante la inhibición de receptores tirosina quinasa en mastocitos, neutrófilos, microglía y macrófagos, tanto en SNC como periférico (García-García et al., 2021; Mora et al., 2020). Recientemente, los mismos autores analizaron la supervivencia media de los pacientes con el medicamento y tratamiento estándar frente al estándar y placebo, observando una prolongación de la vida de los pacientes de unos dos años si éste se administra antes de la aparición de una sintomatología severa, en las primeras etapas de la enfermedad (Mora et al., 2021).

Sin embargo y como se ha destacado anteriormente, las terapias que hoy en día se utilizan en el tratamiento de la ELA se basan en fármacos sin diana específica y que reducen modestamente los mecanismos de excitotoxicidad o estrés oxidativo, sin poner además el foco en la neuroinflamación. Resumidamente, la neuroinflamación y la gliosis son eventos prematuros que tienen lugar en etapas pre-sintomáticas de la ELA, aceptándose actualmente que tienen un papel fundamental en la muerte de las neuronas.

### **2.1.2.3. Componentes celulares**

La complejidad de los mecanismos y genes implicados en el desarrollo de la ELA ofrecen como resultado un laberinto molecular donde, además, hay que incorporar los distintos tipos celulares y su propia comunicación en el desarrollo de la neuropatía. A pesar de los diferentes enfoques en el estudio que podemos encontrar en esta enfermedad, todos los puntos de vista intentan explicar el motivo final de dichos procesos, el cual culmina en la muerte de las neuronas que inervan a los músculos relacionados con la sintomatología descrita anteriormente. Aunque las neuronas no son protagonistas en la

modulación del sistema inmune y la inflamación, si su propia homeostasis celular se ve alterada, su sensibilidad a los estímulos exógenos o provenientes del sistema inmune se incrementa (Masrori et al., 2022). Por ejemplo, la reducción de los niveles de C9orf72 en neuronas aumenta los receptores de glutamato que presentan dichas células en las membranas, sensibilizando a estas neuronas y presentando, por tanto, una mayor predisposición a la excitotoxicidad por glutamato extracelular (Shi, 2018). Además, la microglía puede incrementar la liberación de glutamato en los terminales sinápticos, a la par que dificultar la retirada de glutamato extracelular mediante la liberación de mediadores inflamatorios (Armada-Moreira et al., 2020).

Sumado a este contexto, las células encargadas de la limpieza extracelular en el SNC, como son los astrocitos, pueden fallar en la correcta eliminación de glutamato y restos celulares, generando con ello más daño neuronal por excitotoxicidad, que a su vez retroalimenta las propias señales de factores neurotóxicos liberados por las mismas neuronas, activando más a astrocitos y microglía (Kwon & Koh, 2020; Provenzano et al., 2023).

Por otro lado, los oligodendrocitos son células generadoras de mielina que rodean los axones de las neuronas con extensiones de su propia membrana plasmática, permitiendo una actuación rápida sobre éstas, facilitando la transmisión de impulsos nerviosos y el mantenimiento de la homeostasis neuronal. En una situación en la que se generan mediadores proinflamatorios de manera crónica, las células precursoras de los oligodendrocitos, sensibles a estos mediadores, ven interrumpida su maduración y, por tanto, la renovación de las mismas (Festa et al., 2023; Peferoen et al., 2014).

#### **2.1.2.3.1. Microglía**

Las células de microglía son los macrófagos residentes en el SNC y constituyen la principal célula inmunocompetente en este tejido, jugando un papel relevante en el comienzo y la progresión de la ELA (Geloso et al., 2017). Todo ello convierte a estos macrófagos en el primer eslabón en la respuesta inmunológica ante una lesión en el cerebro (Guo et al., 2022). Cada vez más estudios apuntan a que la neuroinflamación que suele acompañar a la neurodegeneración, marcada fundamentalmente por la activación de microglía,



tendría un papel importante en la muerte precoz de las neuronas motoras (Amado & Davidson, 2021).

Existe un considerable consenso en atribuir a la microglía un origen hematopoyético, cuya migración al cerebro sucede en etapas muy tempranas del desarrollo, antes de la formación de la barrera hematoencefálica (Ginhoux et al., 2010; Guo et al., 2022; Paolicelli et al., 2022), teniendo un papel sustancial en el desarrollo correcto de las neuronas en mamíferos desde etapas embrionarias y adultas (Angelim et al., 2018). A pesar de ello, su ausencia no provoca anomalías aparentes en la arquitectura neuronal del cerebro en etapas embrionarias en ratas, aunque sí presentan una leve alteración en el número de oligodendrocitos (Patkar et al., 2021).

La microglía es abundante (siendo en torno al 10% del total de células del SNC) y está distribuida uniformemente en individuos sanos, con funciones en la regulación del número de neuronas, la maduración de oligodendrocitos, promoviendo y madurando la sinapsis, o controlando el exceso de dicha actividad, entre otras (Brites & Vaz, 2014; You et al., 2023) (**Fig. 2**). Por lo general, en personas sanas presenta una forma ramificada en el soma y con prolongaciones móviles, características que se transforman hacia una forma más redondeada, hinchada y ameboide, con numerosos y cortos apéndices cuando se detecta una perturbación en la homeostasis (Kwon & Koh, 2020; Paolicelli et al., 2022). Sin embargo, estos cambios morfológicos no conllevan ninguna función determinada que permita clasificar *a priori* los estados de la microglía. Asimismo, tienen capacidad de comunicación tanto con las células residentes del SNC como con las células inmunes periféricas que se infiltran, lo que añade complejidad y diversidad a la red de comunicación posible que se pueda establecer (Paolicelli et al., 2022).

Al producirse daño en el tejido del SNC o una infección, la microglía se activa, definiéndose clásicamente dos fenotipos opuestos. Uno de ellos, denominado M2, caracterizado por la regeneración de tejidos y neuroprotección, ha sido descrito durante las etapas más tempranas del desarrollo de la ELA en modelos animales (Guo et al., 2022). Este fenotipo se debe principalmente a la influencia de mediadores antiinflamatorios, como el factor de crecimiento

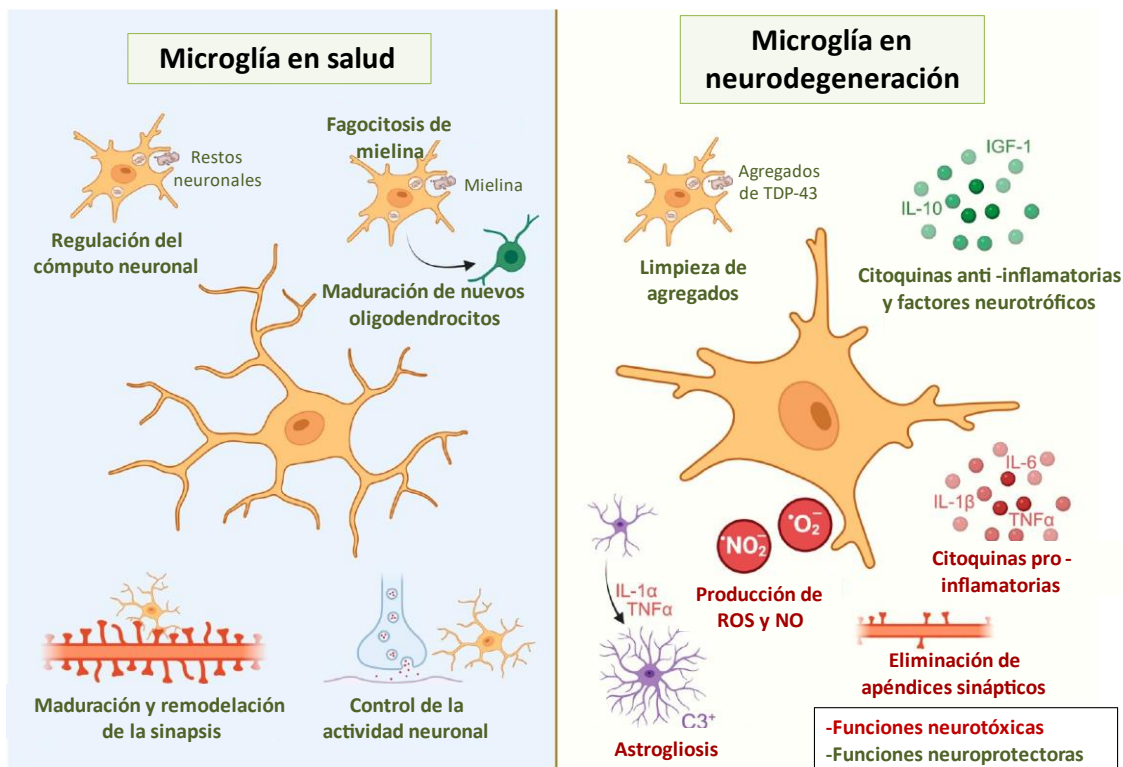
transformante beta (TFG- $\beta$ ), IL-4, IL-13 e inmunorreguladores como IL-10, y al factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF). A su vez, esta reacción provoca la liberación del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) por las propias células microgliales con fenotipo M2 (Colonna & Butovsky, 2017). Paralelamente, células T reguladoras y Th2 infiltradas en el SNC y microglía con fenotipo M2 regularían negativamente las señales tóxicas de estos mismos tipos celulares en condiciones no patológicas (Beers et al., 2011; González & Pacheco, 2014).

Es de resaltar que, con el progreso de la enfermedad y la cronificación en la emisión de señales de daño por parte de las neuronas, el fenotipo de las células gliales e inmunes cambiaría a una versión opuesta (Guo et al., 2022; B. Liao et al., 2012). Ejemplos descritos de este fenómeno son los efectos sobre la respuesta de la microglía causados por la sobreexpresión de *SOD1* mutante (Kim et al., 2020; Xiao et al., 2007), la presencia de TDP-43 extracelular (Zhao et al., 2015), o de agregados solubles extracelulares de TDP-43 (Leal-Lasarte et al., 2017) –que actuarían como DAMPs, patrones moleculares asociados a daño celular–. Es de interés resaltar que esta activación microglial puede ser inducida por una variedad de ligandos de TLRs y otras moléculas proinflamatorias (Colonna & Butovsky, 2017).

En este proceso, la microglía vira a un fenotipo proinflamatorio y citotóxico, que históricamente se ha conocido por fenotipo M1 (Kwon & Koh, 2020). Esta neuroinflamación se materializa generalmente por las vías de las MAPK quinasas, NF- $\kappa$ B e inflammasoma NLRP3 (Masrori & Van Damme, 2020), que promueven la generación de los actores moleculares implicados en este cambio fenotípico. Entre ellos, se encuentran citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y quimioquinas, cuya producción sostenida en el tiempo y sumada a la ocasional incapacidad para eliminar el daño por los astrocitos o la propia astrogliosis, generará una mayor neurodegeneración (Guo et al., 2022; Paolicelli et al., 2022).

Paralelamente, la piroptosis depende de la activación de la vía de la caspasa-1 por inflammasomas, que resulta en un aumento de los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-18 y el

efector piroptótico gasdermina D, mecanismo que se encuentra activado en la corteza motora de modelos preclínicos de ratón y pacientes de ELA, siendo este un factor recurrente en la neurodegeneración (Van Schoor et al., 2022). Aunque numerosas funciones pueden ser beneficiosas para la salud neuronal, otras como la producción sostenida de especies reactivas de oxígeno (ROS) o de óxido nítrico (NO) y la eliminación de apéndices sinápticos terminan por tener un efecto perjudicial sobre las neuronas (Block et al., 2007; Xiao et al., 2007; You et al., 2023).



**Fig. 2. La microglía en la neurodegeneración presenta alteradas sus funciones de regulación de la homeostasis en el SNC.** En condiciones fisiológicas, la microglía ejecuta funciones de mantenimiento como la plasticidad y remodelación de la sinapsis neuronal, la maduración de oligodendrocitos o la limpieza del medio extracelular. Sin embargo, la alteración de sus funciones normales de la homeostasis y la acumulación de señales proinflamatorias o DAMPs, provocan un cambio en la microglía hacia fenotipos patológicos y un estado de microgliosis, lo que se materializa en la generación de más mediadores proinflamatorios, liberando factores que transforman a los astrocitos hacia un estado reactivo y tóxico, o promoviendo la muerte neuronal, concluyendo en una situación generalizada de neurodegeneración. Adaptado de (You et al., 2023).

Es de destacar que, tanto los fenotipos M1 y M2 están involucrados en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, indicando la importancia que tiene el equilibrio entre ambos fenotipos para mantener la homeostasis en el SNC (Song & Suk, 2017). En este sentido, células de microglía aisladas de ratones SOD1<sup>G93A</sup> en un estadio temprano de la enfermedad muestran niveles altos de marcadores M2 junto a bajos niveles de citoquinas proinflamatorias en comparación a ratones en estadio tardío de la enfermedad, en los que por el contrario se observan marcadores M1 junto a niveles elevados de mediadores proinflamatorios, señalando un perfil neurotóxico (B. Liao et al., 2012).

En este contexto en el que la homeostasis se perturba, estudios de RNA-Seq a nivel de célula única han permitido observar en modelos preclínicos murinos que una fracción de células de microglía modifica su fenotipo hacia un estado denominado DAM (del inglés *disease-associated microglia*) o MGnD (del inglés *microglial neurodegenerative phenotype*) (Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017). Este estado caracteriza a la microglía por la regulación negativa de genes con implicación en la homeostasis y una regulación positiva de genes implicados en el metabolismo de lípidos, vías lisosomales y fagocitosis (Xie et al., 2022). Esta subpoblación microglial se ha descrito inicialmente en modelos preclínicos de Alzheimer, aunque se han encontrado perfiles transcripcionales similares en modelos murinos de ELA (Chiu et al., 2013; Hickman, 2013; Keren-Shaul et al., 2017).

Por lo general, se suele describir como un proceso en dos fases, donde en primera instancia una subpoblación de la microglía deriva hacia un estado intermedio independiente del mecanismo del receptor TREM2, caracterizándose por una reducción en la expresión de genes del mantenimiento de la homeostasis, como son *Cx3cr1* o *P2ry12/13*. Paralelamente, aumenta la expresión de ciertos genes como *Clec7a*, *ApoE*, *Axl*, *Spp1*, *B2m* y *Trem2*, entre otros (Keren-Shaul et al., 2017; Paolicelli et al., 2022). El receptor TREM2 es vital para que la microglía sea capaz de sufrir una transición DAM, ya que sin su actividad se pierde la capacidad para responder a estímulos que, en condiciones normales, promueven dicha transición y quedan atrapadas en un estado de permanente de homeostasis (Mazaheri et al., 2017; McQuade et al., 2020).

La segunda fase está promovida por la expresión de *Trem2*, donde se ve incrementada la expresión de genes del metabolismo de lípidos y de la fagocitosis, como son *Cst7*, *Lpl* y *CD9* (Keren-Shaul et al., 2017). Como resultado, se obtiene un perfil de genes característicos y que sirven de marca diferencial para determinar subpoblaciones con fenotipo DAM en la microglía (Deczkowska et al., 2018). De interés son los resultados de Jauregui y colaboradores, que reportaron recientemente que existe una elevada expresión de algunos de los marcadores del fenotipo DAM en médulas espinales de pacientes de ELA, como son CD33 o TREM2 (Jauregui et al., 2023)

En la actualidad, se reconoce que los conceptos M1 y M2 acerca de los fenotipos de la microglía son una simplificación basada en perfiles extremos y que no reflejan fielmente el estado inflamatorio real de las células en cada momento (Paolicelli et al., 2022; Xie et al., 2022). Los últimos estudios muestran que verdaderamente no existe una dicotomía inamovible, sino que la microglía se mueve en un contexto dinámico y diverso, con una influencia muy significativa del ambiente donde conviven distintas subpoblaciones o perfiles moleculares diferentes de la microglía (Paolicelli et al., 2022). Esto conlleva que el espectro fenotípico de la microglía sea considerablemente amplio, representando numerosas funciones efectoras que pueden tener reflejo en la variedad de subtipos y etapas de desarrollo de la ELA (Tam et al., 2019; Xie et al., 2022).

Este complejo escenario lleva a razonar que la activación microglial conducente a un estado inflamatorio ocurre en etapas muy tempranas de la patología, observándose además experimentalmente que los animales *SOD1*<sup>G93A</sup> carentes de microglía o con la eliminación de *SOD1*, ven extendida su vida media, además de un progreso de la enfermedad ralentizado a pesar de portar la mutación (Boillée et al., 2006; Martínez-Muriana et al., 2016). Jara y colaboradores observaron en modelos preclínicos murinos de ELA que se produce un temprano incremento de células MCP1<sup>+</sup> en la corteza motora, muy posiblemente microglía activada dada la morfología y los marcadores detectados (Jara et al., 2017). Por consiguiente, la idea de que esta neuroinflamación es prematura respecto a la sintomatología, se ve asimismo reforzada, dado que los tratamientos usados en neurodegeneración no tienen

capacidad de regenerar o reducir el daño, incluso si estos son aplicados antes del cuadro sintomatológico (Guo et al., 2022). Por todo ello, el manejo inteligente de los fenotipos de microglía gana interés como medida terapéutica frente a terapias antiinflamatorias convencionales, que tendrían en el contexto de la ELA unas expectativas limitadas (Song & Suk, 2017).

## 2.2. Señalización por quinasas en neurodegeneración e inflamación

### 2.2.1. Conceptos generales sobre proteínas quinasas

Conocidos los protagonistas en los procesos de neurodegeneración e inflamación existentes en diversas neuropatías, es también de vital interés identificar qué lenguaje molecular usan en términos de comunicación y señalización. Desentrañar cómo las células microgliales, motoneuronas y el resto de las células implicadas se comunican puede potencialmente ofrecer un elevado número de dianas terapéuticas y/o biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de gran interés para el manejo clínico de la ELA. Siendo las vías de las MAP quinasas (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*) una de las rutas de señalización intracelular más importantes, y participando este tipo de enzimas en numerosas vías de señalización, resulta de gran relevancia ver qué papel pueden jugar en el rol de la neuroinflamación y degeneración sobre las células afectadas. Éstas, junto a las fosfatasas, han sido relacionadas con numerosas enfermedades, desde inflamaciones crónicas, a cáncer o a trastornos del SNC (da Costa et al., 2023; S. H. Lee & Suk, 2017).

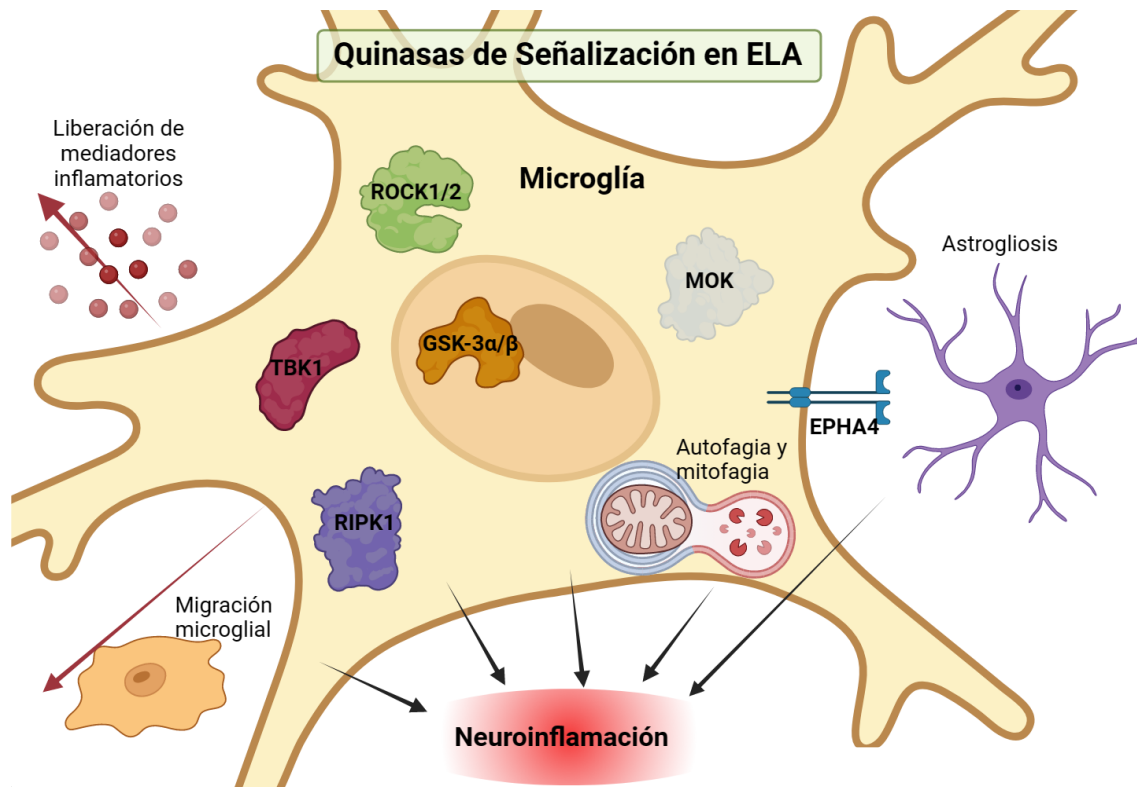
Del total del genoma humano, las quinasas constituyen una gran proporción de las fosfotransferasas, implicadas no solo en inflamación, sino en todo tipo de respuestas celulares relacionadas con el crecimiento, el metabolismo, la supervivencia, etc. (Gunosewoyo, 2017). Las proteínas quinasas, cuya actividad enzimática es la fosforilación de proteínas, se clasifican tomando en consideración a los residuos que fosforilan en las proteínas: principalmente encontramos un gran grupo formado por las quinasas que fosforilan residuos de tirosinas (tirosina quinasas), y otro gran grupo formado por quinasas de serina/treonina (serina-treonina quinasas) que fosforilan residuos del mismo

nombre. Curiosamente, también existen proteínas quinasas menos frecuentes que fosforilan sobre los tres residuos, presentando una actividad dual (S. H. Lee & Suk, 2017).

### 2.2.2. Señalización por proteínas quinasas, su papel en enfermedades neurodegenerativas e inflamación

Las quinasas, como reguladores protagonistas presentes virtualmente en todas las vías de señalización de las células, se ofrecen como uno de los candidatos favoritos en la desregulación, en la aparición y el desarrollo de la neuroinflamación, que finalmente conlleva la muerte de las neuronas motoras ocurrida en ELA. Como veremos a continuación, existe una variedad de proteínas quinasas que han sido relacionadas con alteraciones del sistema inmune en el contexto de la ELA, y que por tanto les dota de alto interés a la hora de estudiar su posible eficacia como nuevas dianas terapéuticas en modelos preclínicos o en ensayos clínicos (García-García et al., 2021) (**Fig. 3**).

Aunque la mayoría de los principios activos aprobados por la FDA como medicamentos en lo que se refiere a la inhibición de la actividad quinasa se utilizan en el tratamiento del cáncer, cada vez existen más ensayos clínicos basados en la administración de moléculas pequeñas (*small molecules*) con capacidad de inhibir proteínas quinasas de interés en neurodegeneración, además de ser aptas para atravesar la barrera hematoencefálica (García-García et al., 2021; Roskoski, 2023). Es por todo ello que identificar y contar con este tipo de herramientas y dianas, descubrir nuevas interacciones y moléculas desde la investigación, arroja en el contexto de la ELA información útil para elucidar los mecanismos moleculares subyacentes en el desarrollo y origen de la inflamación neurotóxica y, eventualmente, establecer el desarrollo de tratamientos basados en las nuevas dianas terapéuticas identificadas.



**Fig. 3. Mecanismos de las principales quinasas de señalización implicadas en ELA en la generación de la neuroinflamación en SNC.** Resumen de los mecanismos modulados por las quinasas RIPK1, TBK1, EPHA4, ROCK1/2 y GSK-3α/β y que juegan un papel en neuroinflamación, además de la hipótesis acerca de la implicación de MOK. Imagen generada mediante Biorender.com

### 2.2.2.1. GSK-3α/β (Glycogen synthase kinase 3)

A pesar de ser descrita inicialmente como la quinasa que fosforila a la glucógeno sintasa, inactivándola con ello y procediendo de ahí su nombre, actualmente se conocen más de 50 proteínas que actúan como sustrato de GSK-3. En mamíferos, esta serina/treonina quinasa presenta dos isoformas, una de 51 kDa denominada GSK-3α y una segunda llamada GSK-3β de 47 kDa la cual se encuentra muy expresada en el sistema nervioso. De hecho, existen evidencias de que su alteración puede provocar desórdenes como el cáncer, el Alzheimer o el Párkinson (Demuro et al., 2021).

Varios estudios muestran un aumento de los niveles de la isoforma β, tanto nativa como fosforilada, en el córtex frontal e hipocampo de pacientes de ELA (Choi et al., 2020; Kihira et al., 2009; W. Yang et al., 2008), por lo que se conjetura que podría afectar a las funciones de TDP-43 y SOD1. Del mismo



modo, se ha correlacionado en pacientes de ELA un aumento y acumulación de TDP-43 fosforilado junto a mayores niveles de expresión de GSK-3 $\beta$ , convirtiéndolo en un potencial marcador de la evolución de la enfermedad (Sreedharan et al., 2015). Asimismo, en modelos preclínicos de ratón transgénico de TDP-43<sup>A315T</sup> se ha observado que el tratamiento con el inhibidor competitivo de GSK-3 $\beta$ , tideglusib, posee un efecto neuroprotector tanto *in vitro* como *in vivo*, además de disminuir los niveles de TDP-43 fosforilados en la médula espinal de los ratones (Martínez-González et al., 2021). Por otro lado, el uso de sales de litio, tratamiento mayoritario para el trastorno bipolar, inhibe la actividad de GSK-3 $\alpha/\beta$  reduciendo la fosforilación de los distintos sustratos de la quinasa, siendo éste un tratamiento cada vez más frecuente en ensayos clínicos de diferentes neuropatías (Gunosewoyo, 2017; King et al., 2015; Leeds et al., 2014).

#### **2.2.2.2. *TBK1 (TANK-binding kinase 1)***

Como ya se ha destacado anteriormente, las mutaciones en *TBK1* juegan un papel en la evolución de la ELA, siendo ésta una proteína quinasa de residuos de serina/treonina con numerosas funciones, destacando principalmente la regulación de la autofagocitosis, mitofagia y la mediación de la inflamación de IFN de tipo-I (Kim et al., 2020).

Gracias a dos estudios independientes realizados por Cirulli y Freischmidt, y sus respectivos colaboradores, se identificaron mediante secuenciación diferentes mutaciones en la secuencia de *TBK1* asociadas directamente con la ELA (Cirulli, 2015; Freischmidt et al., 2015). Asimismo, dada su relevancia en mecanismos de autofagia, varios estudios indican que su pérdida provoca un incremento en la acumulación citosólica de agregados de SOD1 en motoneuronas de modelos preclínicos de ELA, lo cual contribuiría al desarrollo de la neurodegeneración y una aparición temprana de los síntomas (Gerbino et al., 2020; Kiriya & Nochi, 2015). Este mecanismo, que puede venir dado por mutaciones que disminuyen la transcripción de *TBK1* o bien por generación de una versión truncada en el sitio activo de la proteína, termina provocando la acumulación de agregados proteicos dada la falta de autofagia (Oakes et al., 2017). A pesar de no ser diana de ningún tratamiento o ensayo clínico hasta la fecha, sí que se tiene en cuenta como posible biomarcador en el caso de las

diferentes mutaciones que puede presentar dicha proteína, permitiendo conocer mejor los mecanismos celulares implicados en la ELA y en su evolución (Bagyinszky et al., 2023).

#### **2.2.2.3. *RIPK1 (Receptor-Interacting Kinase 1)***

RIPK1 es un receptor de membrana que muestra un papel modulador tanto en funciones de mediación de la apoptosis y necrosis como en la neuroinflamación, gracias principalmente a su función como quinasa de residuos de serina/treonina. Curiosamente, la similitud y el solapamiento de funciones que TBK1 y OPTN (optineurina) poseen sobre las respuestas del sistema inmune innato o la autofagia, parecen tener un punto común aguas abajo de ambos ejes en la regulación de *RIPK1* (Kim et al., 2020; Mou et al., 2022). Uno de los efectos de la reducción de expresión de *TBK1* es la falta de inhibición sobre *RIPK1*, promoviéndose un aumento de la necrosis e inflamación celular presente en ELA. Es importante remarcar que, aunque los efectos de la falta de inhibición sobre *RIPK1* coinciden con el contexto presentado por la ELA, pocos estudios relacionan dicha quinasa directamente con la enfermedad (Kim et al., 2020).

No obstante, aunque actualmente no se aplica en el tratamiento convencional de la ELA, sí existen ensayos clínicos donde se valoran medicamentos con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y de inhibir a RIPK1 en situaciones de inflamación en el SNC y contexto de ELA. Uno de ellos, DNL747, ha sido probado en ensayos clínicos en fase I/Ib mostrando una baja toxicidad del compuesto y una inhibición de RIPK1 periférica, que se cree extensible al SNC donde residen las células diana (microglía y astrocitos) (Mifflin et al., 2020; Vissers et al., 2022). En la actualidad, se siguen llevando a cabo ensayos clínicos con nuevas versiones del compuesto sobre pacientes con ELA, como en el ensayo NCT05237284 en fase II, donde el medicamento DNL788 se espera muestre mejores resultados que sus predecesores.

#### **2.2.2.4. *ROCK1/2 (Rho-Kinase 1/2)***

La quinasa ROCK se expresa como dos proteínas homólogas, ROCK1 y ROCK2, ambas con capacidad de fosforilar residuos de Ser/Thr, siendo la segunda isoforma la más frecuente en SNC (Kimura et al., 2021; Nakagawa et al., 1996). Es conocido que ROCK en su forma activada posee numerosas

dianas, lo que le otorga un papel como modulador de la activación de la microglía, provocando en ella respuestas inflamatorias tales como el aumento de la motilidad, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la liberación de citoquinas gracias a la propia actividad quinasa de la proteína (Roser et al., 2017). A su vez, ROCK se regula aguas arriba por la superfamilia Ras, siendo éstas principalmente las GTPasas RhoA y RhoC (Stankiewicz & Linseman, 2014). Es interesante destacar que se han encontrado en pacientes de ELA niveles altos de ROCK en tejido muscular esquelético (Conti et al., 2014), lo cual la convierte en una posible diana terapéutica sobre la microglía y la reducción de microgliosis en el contexto de la ELA (Roser et al., 2017).

En los últimos años se han desarrollado numerosos medicamentos que actúan como inhibidores de ROCK, que por lo general son inhibidores competitivos del sitio de unión a ATP en la misma. Mediante la administración de los citados inhibidores se han realizado diversos experimentos en modelos preclínicos murinos de ELA (*SOD1<sup>G93A</sup>*) con resultados prometedores, mejorando la supervivencia y la capacidad motora de los animales (Günther et al., 2017; Takata et al., 2013), lo que ha llevado a probar los fármacos fasudil e Y-27632 en pacientes de ELA, a pesar de no ser inhibidores altamente selectivos. El primero ha sido utilizado en un ensayo clínico en fase IIa en tres pacientes de ELA, donde no se llegó a ninguna conclusión definitiva acerca de la eficacia del tratamiento (Koch et al., 2020), pero que estableció el protocolo utilizado en ensayos clínicos actualmente en marcha con el mismo fármaco (EudraCT-Nr. 2017-003676-31).

#### **2.2.2.5. EPHA4 (EPH receptor A4)**

EPHA4 es un miembro de la familia de receptores EPH (del inglés, *Erythropoietin-producing human hepatocellular*), siendo éste un receptor con actividad de tirosina quinasa, y que como ligando tiene tanto efrinas tipo A como B, formando una vía de comunicación celular bidireccional. Tanto en etapas de desarrollo neuronal como en individuos adultos posee funciones relacionadas con la arquitectura sináptica, siendo un regulador negativo del crecimiento axonal y plasticidad neuronal (Coulthard et al., 2012; Van Hoecke et al., 2012). Dichas funciones, además, se acompañan de una modulación de la inflamación en médulas espinales dañadas, probablemente mediante las

vías mTOR y NF- $\kappa$ B (Kowalski et al., 2019). Hoecke y colaboradores, relacionaron la expresión de *EPHA4* con la supervivencia y magnitud de la sintomatología de modelos preclínicos de ELA, aunque no asociaron dicha relación a ningún polimorfismo concreto (Van Hoecke et al., 2012). De interés son los estudios *in vitro* de Dennys y colaboradores, los cuales muestran una reducción de la degeneración de las neuronas promovida por astrocitos provenientes de pacientes clasificados como SOD1 de ELA-F y ELA-E mediante el uso de antagonistas de *EPHA4*, y cuyos resultados estiman que pueden ser extensibles al resto de pacientes de ELA-E (Dennys et al., 2022). Sin embargo, existen numerosos estudios en modelos preclínicos de ELA donde la inhibición de la expresión de *EPHA4* no mejora la función motora o supervivencia de dichos animales, aunque sí muestran una cierta recuperación neuronal e inervación de los apéndices neuríticos que invita a pensar en dichos tratamientos con ASOs como potenciales herramientas terapéuticas (Dominguez et al., 2020; Ling et al., 2018; Rué et al., 2019).

### **2.2.3. MAPK/MAK/MRK Overlapping Kinase (MOK).**

#### **Caracterización, funciones y localización celular**

*MAPK/MAK/MRK Overlapping Kinase* (MOK<sup>1</sup>) (Miyata et al., 1999), también conocida como RAGE-1 o STK30 (Número de acceso: BAA81689), es una Ser/Thr quinasa poco estudiada perteneciente a la superfamilia de las MAP quinastas (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*) con un tamaño de 419 aminoácidos en humanos (420 en ratón) (Miyata et al., 1999) y considerada una MAPK atípica. En lugar de presentar una secuencia Treonina-Aspártico-Tirosina (TDY) en el bucle de activación, contiene un motivo Treonina-Glutámico-Tirosina (TEY), que requiere que esté fosforilado en los residuos Thr<sup>159</sup> y Tyr<sup>161</sup> (bpMOK) para activar sus funciones quinasa (John, 2012; Miyata et al., 1999). La expresión del gen de MOK se ha registrado de forma generalizada en todos los tejidos (T. Chen et al., 2013; Miyata et al., 1999), además de haber sido relacionada con diferentes tipos de cáncer (Broekhuis et al., 2014; Cha et al., 2012; Qian et al., 2015) o, más

---

<sup>1</sup> En la literatura existe otra proteína denominada RAGE (del inglés *Receptor for advanced glycation end-products*), la cual no guarda relación alguna con MOK/RAGE-1/STK30.

recientemente, en enfermedades cardiovasculares (Huang et al., 2019) o ELA (Leal-Lasarte et al., 2017).

MOK se ha descrito localizada a nivel subcelular tanto en el citosol como en el núcleo en diferentes tipos celulares, siendo identificada recientemente también en el espacio intermembrana de las mitocondrias, aunque de forma independiente a su actividad quinasa (H. Zhang et al., 2021). No obstante, se desconoce cuál o cuáles son los sustratos a los que regula y fosforila, y qué quinasas o fosfatasa se encuentran corriente arriba, aunque sí se ha reportado que está implicada en la regulación negativa del crecimiento de cilios del epitelio renal mediante la vía mTOR (Broekhuis et al., 2014). A pesar de que existe escasa información acerca de su modulación, la regulación por el factor de transcripción Cdx2 fue descrita en 2004 como responsable de la unión a la región promotora de MOK, promoviendo su expresión en las criptas de Lieberkühn en el epitelio intestinal (Uesaka & Kageyama, 2004). Posteriormente, Chen y colaboradores definieron para MOK un papel en la diferenciación y maduración de células intestinales, con una expresión dinámica en el desarrollo intestinal y limitada temporalmente a 14 días tras el nacimiento de los ratones (T. Chen et al., 2013). Estos mismos autores elucubran un posible papel como supresor de tumores para MOK en dichas etapas de desarrollo y la aparición de posibles adenomas intestinales (T. Chen et al., 2013). También existe un estudio que describe que reporta mayores niveles de expresión del gen de MOK en células sanguíneas en sujetos con hipertensión (Huang et al., 2019).

Por otro lado, Qian y sus colaboradores estudiaron la regulación del promotor de MOK, demostrando que la hipofosforilación de dicha región puede promover la sobreexpresión de MOK en células leucémicas primarias (Qian et al., 2015). Asimismo, resultados en la misma dirección se han observado en otro tipo de tumores como el carcinoma hepático, donde se ha detectado una correlación entre los altos niveles de ARN mensajero de MOK y la generación de la patología, dotando a MOK de interés terapéutico y de un papel como herramienta de pronóstico (Cha et al., 2012). Del mismo modo en cordoma, un tipo de tumor óseo con origen en la columna vertebral, se ha mostrado que MOK juega un papel en la oncogénesis, ya que el silenciamiento de la

expresión del gen reduce significativamente el crecimiento celular en líneas celulares del tumor (Hang et al., 2022). Respecto a su actividad de quinasa, se predice una cierta inhibición mediante iones de litio análoga a la comentada anteriormente para GSK-3 $\alpha/\beta$ , y mediante el mismo mecanismo gracias a la similitud de ambas en sus sitios de unión a iones de magnesio (Bravo et al., 2019). Desde el punto de vista farmacológico, Garske junto a sus colaboradores consiguieron la inhibición específica de MOK gracias a un compuesto fluorometilcetona llamado Comp13/C13, que se vale de la especificidad de la estructura de MOK, concretamente contra un residuo de cisteína *gatekeeper* en el sitio activo virtualmente único (Garske et al., 2011).

Hasta 2017, la vinculación de MOK con el sistema inmune se limitaba a estudios en los que péptidos derivados de MOK demostraron ser capaces de provocar una respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos tras su exposición por células presentadoras de antígenos (Gaugler et al., 1996; Oehlrich et al., 2005). Sin embargo, gracias al estudio de nuestro grupo, por primera vez se relacionó a MOK con la activación que sufre la microglía frente a los agregados extracelulares de TDP-43 en un contexto de ELA (Leal-Lasarte et al., 2017). Estos experimentos demostraron que dichos agregados –que son capaces de inducir una respuesta proinflamatoria en microglía– co-localizan en el citoplasma junto a MOK en este modelo celular (Leal-Lasarte et al., 2017), indicando que MOK podría tener un papel relevante en la respuesta inflamatoria y neurodegeneración en la ELA y otras enfermedades relacionadas. Recientemente, se ha relacionado a MOK como posible regulador de la apoptosis mediante la vía de las caspasas en una especie de mejillón (*Cristaria plicata*), donde la eliminación de MOK aumentaba los niveles de expresión de diferentes caspasas, citocromo C y los niveles extracelulares de TNF $\alpha$  (An et al., 2022).

## 2.3. Familia de proteínas BET: Brd4

### 2.3.1. Brd4: estructura y mecanismos generales

En la célula, los genes se encuentran formando compactas estructuras alrededor de las histonas, proteínas que pueden sufrir alteraciones epigenéticas como son: las metilaciones, fosforilaciones o acetilaciones, que

terminan por modificar la disponibilidad del ADN para las diferentes maquinarias celulares. Alrededor de estas modificaciones post-traduccionales sobre histonas, podemos encontrar tres grupos de agentes moleculares en función de cómo se relacionan con dichos cambios epigenéticos: estos son los “escritores”, los “borradores” y los “lectores” (Bennett et al., 2020). Alteraciones anormales del funcionamiento de estos actores producen cambios erráticos y modifican la expresión génica normal, degenerando en distintas patologías (N. Wang et al., 2021).

Los bromodominios son dominios de un tamaño de unos 110 aminoácidos altamente conservados, con implicación en las interacciones proteína-proteína y con capacidad de reconocer residuos de lisina acetilados en las histonas u otras proteínas. Las proteínas que contienen estos dominios son capaces de actuar como lectores epigenéticos de la acetilación de histonas, lo que les confiere función para reclutar a los moduladores de la transcripción y elongación hacia la cromatina (N. Wang et al., 2021). Dentro de estas moléculas con bromodominios encontramos a la subfamilia de proteínas llamadas BET (del inglés *bromodomain and extraterminal domain*), las cuales tienen capacidad de reclutar a factores de transcripción positivos (Y.-F. Tan, 2021). A su vez, dentro de la familia de las proteínas BET se encuentra el lector epigenético Brd4 (del inglés *bromodomain containing 4*). Esta proteína se localiza en la mayoría de los tejidos, y su importancia clínica es cada vez mayor por su central implicación como moduladora de señales y por estar involucrada en numerosas patologías como el cáncer o enfermedades que impliquen al sistema inmune. Adicionalmente, este interés se ha visto espoleado por el hallazgo de potentes inhibidores farmacológicos específicos (Ali et al., 2022; Liang et al., 2021), como se verá más adelante.

Brd4, cuya localización celular se restringe mayoritariamente al núcleo (Ali et al., 2022), se compone de: dos bromodominios homólogos, BD1 y BD2; además de un dominio extra-terminal, ET; y un módulo C-terminal, CTM (C. Y. Wang & Filippakopoulos, 2015). En esta conservada arquitectura, los dominios BD1 y BD2 son responsables del reconocimiento de la marca de acetilación en lisinas, mientras que la región C-terminal es la encargada de la interacción con los factores positivos de elongación en la transcripción (C. Y. Wang &

Filippakopoulos, 2015). Por lo general, la acetilación de histonas se asocia a genes cuya transcripción está activa, siendo este uno de los principales factores a la hora de determinar la unión de Brd4 a cromatina, por lo que suele encontrarse frecuentemente en regiones promotoras o *enhancers* de genes al realizar técnicas de ChIP-Seq (Dhalluin et al., 1999).

Se conoce que la unión de Brd4 a las regiones promotoras resulta en el reclutamiento de una gran cantidad de actores moleculares que facilitan y promueven la cinética transcripcional, tales como la propia maquinaria o los denominados *super-enhancers* (C. Wang et al., 2019). Junto a Brd4 interaccionan una gran cantidad de elementos a la hora de regular su actividad como modulador de la transcripción. En este sentido, son de vital importancia en la regulación de Brd4 las modificaciones post-traduccionales que éste puede sufrir, entre las que se incluyen las fosforilaciones, hidroxilaciones, ubiquitinaciones o isomerizaciones, regulando así su estabilidad, abundancia y actividad que, al verse alteradas generalmente promoverán la aparición de cáncer (Liang et al., 2021; Y.-F. Tan, 2021).

Entre éstas, destaca principalmente la fosforilación en el residuo Ser<sup>492</sup> de Brd4, que estaría mediado por la caseína quinasa II (CK2), la cual es responsable de permitir la activación de Brd4 y promover la unión estable a cromatina y el reclutamiento, entre otros, de p53 en su actividad como supresor de tumores (Korb et al., 2015; Wu, 2013). Llamativamente, la actividad de la fosfatasa 2A (PP2A) genera un interruptor molecular mediante el estado de fosforilación de Brd4, siendo esta dualidad CK2/PP2A crítica en la regulación de la activación de Brd4 (Chiang, 2016). Desgraciadamente, poco se conoce acerca de los reguladores aguas arriba para Brd4 aparte de los nombrados, siendo éste un interesante nicho en la investigación de nuevas dianas con un alto potencial terapéutico.

Respecto a sus mecanismos, Brd4 recluta a P-TEFb (del inglés *positive transcription elongation factor*), un factor de transcripción que induce la fosforilación de la ARN polimerasa II, y posteriormente a la maquinaria de elongación. A su vez, gracias de nuevo a P-TEFb se produce la fosforilación e inhibición del factor negativo de elongación (NELF), promoviendo así la



transcripción (Ali et al., 2022). En este escenario, Brd4 juega un papel en la transcripción regulando la interacción con un gran complejo de mediadores que actúan como co-activadores, conformado por unas 30 subunidades diferentes. Asimismo, gracias a la formación de este complejo mediador se da la interacción de Brd4 con las formas activas de P-TEFb: CDK9 y la ciclina T1, reclutándolo hacia la cromatina (Bhagwat et al., 2016; Moon et al., 2005). Es de destacar, que mientras el dominio BD2 de Brd4 interacciona y reconoce a la ciclina T1 en la región promotora de los genes, promoviendo y manteniendo la elongación de la transcripción, paralelamente la región CTM interacciona con CDK9, que a su vez gracias a su actividad quinasa es la encargada de fosforilar a la polimerasa, además de inhibir a los reguladores negativos (Q. Zhou et al., 2012).

### **2.3.2. Papel de Brd4 en diversas patologías**

Brd4 ha sido relacionada con numerosas enfermedades en las que una desregulación y disfunción de la misma lleva a un marco patológico, como ocurre en la oncogénesis. Así sucede con MYC, un protooncogén entre cuyas funciones se encuentran la regulación del ciclo celular, la apoptosis o la transformación celular (Dang, 2012), y junto al que se ha relacionado Brd4 en metástasis, ya que este último mantiene la expresión activa de MYC y otros genes relacionados (C. Y. Lin, 2015). El mal funcionamiento de Brd4 se debería a la deslocalización de la secuencia de aminoácidos de su región C-terminal, provocando cambios estructurales terciarios en Brd4 que comprometen la interacción proteína-proteína (Ali et al., 2022). De igual manera, al ser Brd4 un regulador de la remodelación de cromatina, mantiene la cromatina y nucleosomas compactados en condiciones normales. Por ello, su sobreexpresión en próstata provoca un aumento en la accesibilidad de la cromatina gracias al desplazamiento de nucleosomas y co-activando al receptor andrógeno; situación que suele derivar en un marco de cáncer de próstata (Urbanucci et al., 2017).

El punto común de este contexto patológico es la expresión errática de Brd4 y su activación constitutiva, por lo que en los últimos años el desarrollo de medicamentos con capacidad para inhibir su actividad ha ganado gran importancia en el tratamiento contra este lector epigenético. Entre los

inhibidores más destacables podemos encontrar a I-BET151, I-BET762, PFI-1, OTX015 y JQ1 (Jarausch et al., 2022; C. Y. Wang & Filippakopoulos, 2015). Éstos, por lo general, se basan en la capacidad de unión a los dominios BD de Brd4, de forma que estos compuestos mimetizan la unión de las lisinas acetiladas con los bolsillos de BD, inhibiendo también a otros miembros de la familia BET. Por otro lado, existen inhibidores de Brd4 que promueven su degradación mediante el proteasoma, los llamados PROTAC (del inglés *Proteolysis-Targeting Chimeras*). En esta categoría encontramos inhibidores como dBET1, BETd-246 o MZ1 (Winter, 2016). Existe un tercer grupo que se basa en la inhibición por especificidad hacia los dominios BD, ya que la evidencia cada vez más resalta las diferencias funcionales entre ambos dominios. En esta categoría encontramos a GSK778, el cual reconoce e inhibe específicamente a BD1, mientras que ABBV-744 o GSK046 tienen como objetivo al segundo bromodominio (Faivre et al., 2020; Martella et al., 2023). Aunque los citados inhibidores son muy eficaces y específicos para la familia de proteínas BET, es necesario investigar nuevos medicamentos que aumenten la ventana terapéutica en la que son útiles en un marco clínico. Asimismo, otro interesante enfoque poco estudiado es el desarrollo de fármacos que tengan como diana dominios diferentes a BD, como serían el ET o CTM, los cuales poseen funciones indistintamente vitales e importantes que permitirían ampliar el rango de herramientas en esta línea de tratamientos (Liang et al., 2021).

### **2.3.2.1. Brd4 y sus mecanismos en la respuesta inmunitaria, neuroinflamación y enfermedades neurodegenerativas**

Las proteínas de la familia BET juegan un papel muy significativo en las respuestas inflamatorias mediante la promoción y activación directa de la transcripción de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores (N. Wang et al., 2021). Aunque al suceder el daño, esta respuesta inflamatoria asiste y facilita la defensa y la reparación de las heridas del tejido, su cronificación puede llevar a enfermedades inflamatorias, como se ha destacado anteriormente (G. Y. Chen & Nuñez, 2010). Dada su relación con la producción de citoquinas, Brd4 gana interés en el contexto de enfermedades autoinflamatorias y del SNC como posible diana para reducir los efectos de esta respuesta inmune. Como se ha

adelantado en el apartado anterior, se han realizado numerosos avances con los inhibidores de la familia BET en casos de inflamación, con resultados muy positivos en modelos preclínicos. Por ejemplo, Nicodeme y colaboradores realizaron un estudio muy significativo en el que, usando inhibidores de la familia BET, observaron la reducción de mediadores proinflamatorios en macrófagos activados *in vivo*, además de detectar una protección contra el shock letal producido por LPS. Curiosamente, el uso del inhibidor no solo impidió la transcripción de un subconjunto de genes mediadores de la inflamación, sino que además la mayoría de genes restantes apenas vieron alterada su expresión, indicando una inhibición selectiva de genes inflamatorios en este tipo celular (Nicodeme et al., 2010). Recientemente, Baek y colaboradores han observado resultados similares en líneas microgliales, poniendo de manifiesto una importante inhibición de genes inflamatorios dependientes de Brd4 bajo estímulos por LPS en combinación con sus inhibidores, además de ver alterada su motilidad y capacidad de atracción hasta las zonas dañadas (Baek et al., 2021). Bajo este contexto, los inhibidores de BET regulan negativamente a citoquinas proinflamatorias como son IL-17 o GM-CSF, mientras que aumentan la producción de mediadores antiinflamatorios como LAG3, IL-10 o EGR2 en linfocitos T colaboradores (DeMars et al., 2018). Desde otro enfoque, se ha observado una función de Brd4 como modulador del *splicing* alternativo del ARN de genes inflamatorios clave, como *IFRD1* o *XBP1* (del inglés *Interferon-related Developmental Regulator 1* y *X-Box Binding Protein 1*, respectivamente), frente a una infección vírica por vías aéreas (Mann et al., 2023).

En la práctica, se han realizado estudios relevantes acerca del papel de Brd4 en enfermedades del SNC, observándose un importante beneficio funcional del uso de inhibidores de la familia BET en modelos de isquemia cerebral, tanto en el alcance de los infartos como en los déficits sufridos por las neuronas, gracias a la regulación inflamatoria y de vías NF- $\kappa$ B (DeMars et al., 2019; Y. Zhou et al., 2019). Este efecto estaría facilitado por la reducción de mediadores proinflamatorios cerebrales como TNF $\alpha$ , CCL2, CXCL1 o CXCL10. De hecho, en modelo isquémico de rata, y tras 24 horas de daño, los animales tratados con el inhibidor JQ1 mostraban un menor déficit neurológico y magnitud del

infarto, además de una atenuación en la expresión de mediadores proinflamatorios como IL-1 $\beta$ , IL-6 o TNF $\alpha$  (L. Liu et al., 2021). Es interesante destacar que, en modelos preclínicos se ha observado cómo JQ1 reduce significativamente los niveles de NF- $\kappa$ B p65 en el núcleo, aumentando los del inhibidor I $\kappa$ B en dicho contexto (Y. Zhou et al., 2019). Por mecanismos alternativos mediante el eje MAPK-Mnk1/2-eIF4E, y gracias a ratones *knockout* condicionales de Brd4, se ha demostrado el papel de Brd4 en la respuesta inmune innata, ya que dichos animales ganaban una resistencia a estímulos por LPS a la vez que eran más susceptibles a infecciones bacterianas. Los macrófagos de estos animales veían reducida significativamente la expresión de genes de la respuesta inflamatoria mediada por TLRs, tales como citoquinas, además de un aumento de los niveles del inhibidor de la vía NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , mediante el citado eje (Bao et al., 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, al ocurrir un daño y generarse una respuesta inflamatoria, dicha respuesta inmune puede aumentar las consecuencias de un daño secundario más allá del deterioro original. Terapias dirigidas contra la familia BET reducen drásticamente los niveles de moduladores proinflamatorios y el reclutamiento de células inmunes al tejido lesionado 3 días tras el daño en la médula espinal de ratón, aunque sin beneficio en la contención del área dañada o recuperación de las funciones motoras (Rudman et al., 2018; J. Wang et al., 2019). Curiosamente, el tratamiento con JQ1 mantenido en el tiempo, unos 28 días tras el daño, ayuda en la reducción de la activación de microglía y del resto de macrófagos (Sánchez-Ventura et al., 2019).

Por otro lado, también se ha encontrado beneficio en el uso de estos inhibidores en patologías como la esclerosis múltiple (EM) y el Alzheimer. En modelos de ratón de EM se ha observado que el uso de I-BET-762 inhibe la capacidad de los linfocitos T colaboradores para inducir la neuroinflamación en fases tempranas de la enfermedad (Bandukwala et al., 2012) mientras que otros inhibidores, como I-BET151 reducen la aparición de los primeros síntomas (Barrett et al., 2014). Chen y colaboradores ponen a Brd4 en la diana para el tratamiento de la EM gracias a la aplicación de un compuesto dirigido al dominio BD1, logrando una reducción de la expresión de transcritos de

citoquinas proinflamatorias en modelos murinos (X. Chen et al., 2024). Asimismo, en modelos de ratón de Alzheimer se ha observado, además de los efectos antiinflamatorios ya citados de JQ1, una reducción de la fosforilación de la proteína tau en el córtex frontal e hipocampo de dichos animales (Magistri et al., 2016).

En estudios recientes, se ha comenzado a poner en valor el uso de inhibidores de la familia BET como herramienta molecular para la ELA. Así, por ejemplo, se ha encontrado que la acumulación nuclear peptídica debida a la repetición del hexanucleótido, en concreto por la repetición de residuos arginina, provoca un efecto tóxico en modelos C9orf72 (Mizielinska et al., 2014; Wen et al., 2014). Este fenómeno tóxico se ve reducido mediante el tratamiento con JQ1 e I-BET-762 en líneas celulares expuestas a estos péptidos, provocando la relocalización citoplásmica de los polipéptidos, con un efecto protector. Sin embargo, este mecanismo no se ha observado en células gliales o neuronales (M. Chen et al., 2024). Desde el punto de vista de ELA, se ha observado que el uso de ciertas estrategias que conlleven un aumento en la expresión de *C9orf72* nativo resultan beneficiosas en dicho contexto neuropatológico (Bennett et al., 2020; Meijboom & Brown, 2022). Con esta idea, Zeier y sus colaboradores mostraron que dicho aumento era posible usando inhibidores de BET en motoneuronas del modelo C9/ALS (Zeier et al., 2015). Recientemente, se ha observado que el inhibidor de Brd4, PFI-1, induce en el modelo C9/ALS las variantes transcritas mutantes de *C9orf72*, facilitando la formación de agregados de ARN nucleares y evitando con ello la acumulación de agregados peptídicos mediante el secuestro de ARN portando la repetición del hexanucleótido, con un efecto neuroprotector (Quezada et al., 2021).



# OBJETIVOS

---





### 3. Objetivos

---

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

- ❖ Identificar si la quinasa MOK juega un papel en la modulación de las respuestas inflamatorias desencadenadas en el modelo de agregación de TDP-43 y estimulación proinflamatoria, así como evaluar el efecto del compuesto C13 en cultivos primarios de microglía.
- ❖ Caracterizar el fenotipo inmunológico inducido por estimulación proinflamatoria de células microgliales bajo la inhibición o ablación de MOK.
- ❖ Conocer vías de señalización moduladas por MOK de las que forma parte como regulador en la respuesta inmune en microglía.
- ❖ Estudiar el impacto de MOK en los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> y de unión de Brd4 a promotores de citoquinas, en la respuesta inflamatoria de microglía.
- ❖ Analizar el eje bpMOK-pBrd4<sup>Ser492</sup> y encontrar posibles alteraciones bajo estímulos inflamatorios en cultivos organotípicos de médulas espinales de animales SOD1 frente a animales silvestres.
- ❖ Identificar si MOK se encuentra alterado en tejido del SNC, en modelos preclínicos de ratón y pacientes de ELA.
- ❖ Evaluar el impacto de la administración de C13 *in vivo* en ratones SOD1<sup>G93A</sup> en el transcurso de la enfermedad y determinar los efectos en el desarrollo de la neuroinflamación.



# MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Mantenimiento y tratamientos de los cultivos de líneas celulares

Las líneas celulares semiadherentes de SIM-A9 silvestres (ATCC CRL-3265), obtenidas de la *American Type Culture Collection (ATCC)*, fueron mantenidas en medio DMEM-F12 (D6421, Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 5% de suero de caballo (HS) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Thermo Fisher), 100 U/mL de penicilina (Thermo Fisher) y 100 µg/mL de estreptomina (Thermo Fisher) en condiciones de 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y saturación de humedad. Cada 48 horas o al alcanzar la confluencia de los cultivos, se procedió a realizar un pase, que consistió en un paso de lavado con PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) seguido de tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) durante 5 minutos a 37 °C, se recogieron las células con DMEM-F12 suplementado y fueron centrifugadas a 400 x g por 5 minutos. Finalmente, se retiró el sobrenadante y el *pellet* de células fue resuspendido en DMEM-F12 suplementado hasta la concentración celular necesaria para la siembra de mantenimiento en frascos de cultivo o experimentos en placas.

Las estimulaciones con lipopolisacáridos bacterianos (LPS) de *Escherichia coli* (L3137, Sigma-Aldrich) se realizaron a diferentes tiempos de 1, 4, 5, 16 y 24 horas dependiendo de las necesidades experimentales y a una concentración final estándar de 1 µg/mL previa dilución de un stock concentrado 1000X en agua estéril bidestilada. Los tratamientos previos a LPS con el inhibidor de Brd4 (+)-JQ1 (SML1524, Sigma-Aldrich), (-)-JQ1 (SML1525, Sigma-Aldrich) o con el inhibidor específico de MOK Comp13/C13 (cedido por el laboratorio del Profesor Kevan Shokat, UCSF, EE. UU.) se diluyeron en DMSO y se usaron a una concentración final de 10 µM durante 1 hora. En los experimentos donde fuese necesario el uso de reactivos disueltos en DMSO, las condiciones experimentales de control se usó una concentración similar de DMSO para simular la posible toxicidad del vehículo.

La línea celular de motoneuronas NSC-34 (CLU140, Cedarlane) fue mantenida en cultivo en medio DMEM (D5768, Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de

estreptomycin en condiciones de 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y saturación de humedad. El mantenimiento de la línea NSC-34 siguió el mismo protocolo de trabajo que la línea SIM-A9, con la variación de uso de rascador debido a su adherencia. Para la diferenciación celular de la línea el medio usado fue DMEM-F12 (D6421, Sigma-Aldrich) suplementado con antibióticos como anteriormente se ha descrito, y con la reducción a 1% de FBS y la adición de 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco). Tras un periodo de una semana en condiciones de diferenciación, se sembraron en placas de 96 pocillos para ser estimuladas con dosis crecientes de glutamato monosódico (G5889, Sigma-Aldrich) o MG132 como control de muerte (J63250-M).

#### 4.2. Generación de clones SIM-A9 MOK-KO

Los clones MOK *knock-out* de SIM-A9 fueron generados mediante ingeniería CRISPR/Cas9 por Synthego al igual que el control de calidad de los *knock-out*. Las mutaciones diseñadas y esperadas fueron confirmadas en nuestro laboratorio por secuenciación *Sanger* y validados por Western blot y RT-qPCR contra la proteína MOK o sus transcritos, respectivamente. Las condiciones de cultivo y el mantenimiento de los clones MOK-KO fueron similares a las descritas para las SIM-A9 silvestres.

#### 4.3. Preparación y tratamiento de agregados de TDP-43

Los agregados de TDP-43 y agregados señuelo (Sham) fueron generados purificando la fracción de los cuerpos de inclusión sobreexpresada gracias a un plásmido con la proteína de fusión TDP-43-His<sub>6</sub> (cedido por el laboratorio del profesor Yoshiaki Furukawa, departamento de Química, Universidad de Keio, Japón) o el vector vacío, respectivamente, en bacterias quimiocompetentes *E. coli* de la cepa BL21(DE3) como se ha descrito anteriormente, al igual que la caracterización *in vitro* de los agregados de TDP-43 (Leal-Lasarte et al., 2017). Tanto células de la línea SIM-A9 como microglía primaria fueron pretratadas con C13 o DMSO (como se ha descrito anteriormente) a una concentración final de 10 µM durante 1 hora, tras las que se estimularon con 5 µg/mL de agregados de TDP-43 o agregados señuelo en medio complementado con 10 µg/mL de polimixina B (Sigma-Aldrich) por 4 horas o toda la noche. Los sobrenadantes se retiraron para la medición de IL-1β e IL-18 por ELISA o

Western blot, respectivamente, y las células fueron lisadas para la determinación de niveles de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por Western blot como control de carga, como se describe a continuación.

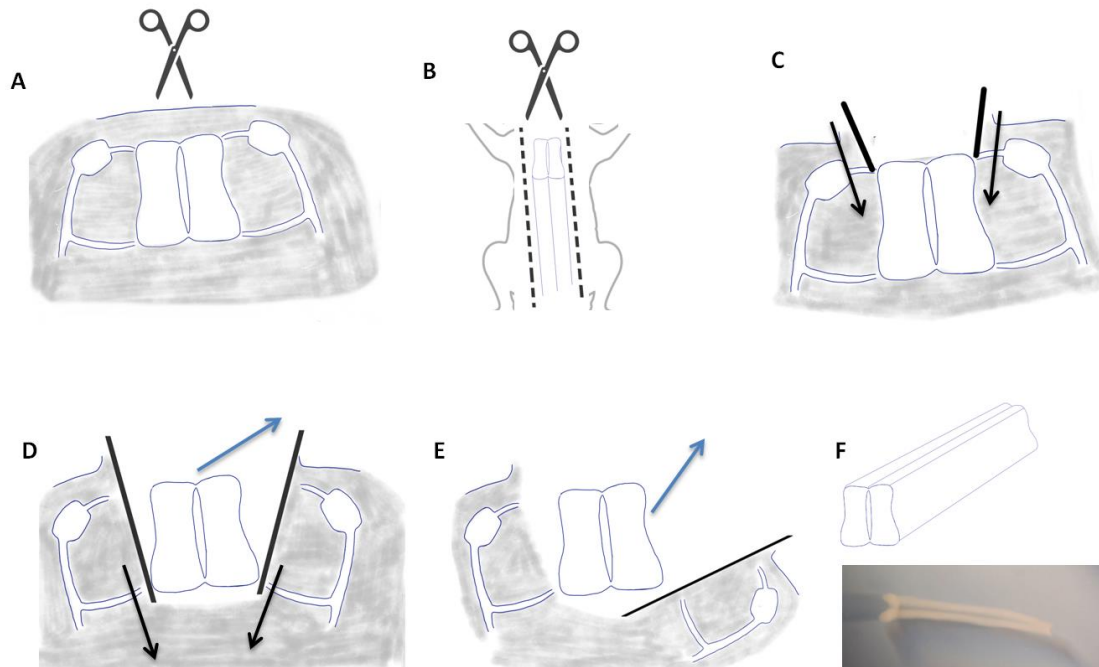
#### **4.4. Generación de medios condicionados por líneas microgliales SIM-A9**

Para la generación de medios condicionados por los clones de microglía SIM-A9 silvestre y MOK-KO se estimularon cultivos de dichas líneas con LPS o control como se ha descrito durante 16 horas, tras las que pasado el tiempo se tomó el sobrenadante, se centrifugó 500 x g durante 5 minutos para eliminar la fracción celular. Dichos sobrenadantes condicionados se guardaron a -20 °C para la posterior medición de sus niveles de citoquinas y uso en cultivo de motoneuronas en un plazo de tiempo menor al mes. Durante todo el proceso se mantuvo la esterilidad de los medios condicionados.

#### **4.5. Aislamiento y mantenimiento de cultivo de motoneuronas primarias de embriones de ratón**

Para la obtención cultivos puros de motoneuronas primarias se tomaron embriones de ratón de 12,5 días de edad que fueron extraídos de ratonas preñadas de la cepa FVB (Centro de Experimentación Animal Óscar Pintado, Universidad de Sevilla, Sevilla, España). Se anestesió y sacrificó a los ratones y los embriones fueron extraídos del útero y depositados en una placa de Petri con medio salino casero (135 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 22 mM D-glucosa, 25 mM HEPES pH 7.5, 10 U/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomina, y pH ajustado a 7.4) sobre hielo. Para la extracción de las médulas espinales se colocaron los embriones dejando la sección dorsal hacia arriba y fijándolos con ayuda de agujas sobre una superficie blanda. Posteriormente, se decapitaron y se eliminó la cola de los embriones para facilitar su manipulación y recolocación en caso de ser necesario. Con ayuda de unas tijeras finas, se realizó una escisión rostro-caudal en la parte dorsal que permite la observación directa de la médula espinal. Con ayuda de pinzas finas, la médula se fue liberando hasta finalmente escindirla del resto del cuerpo, tal y como muestra la figura (**Fig. 4**). Tras aislar las médulas espinales, se eliminaron cuidadosamente las meninges con ayuda de las pinzas finas y seguidamente

se fragmentaron en 3 ó 4 porciones para facilitar la digestión. Las médulas espinales fragmentadas fueron depositadas en un tubo con medio salino casero frío para preservar la mayor viabilidad posible mientras se procesan el resto de las médulas.

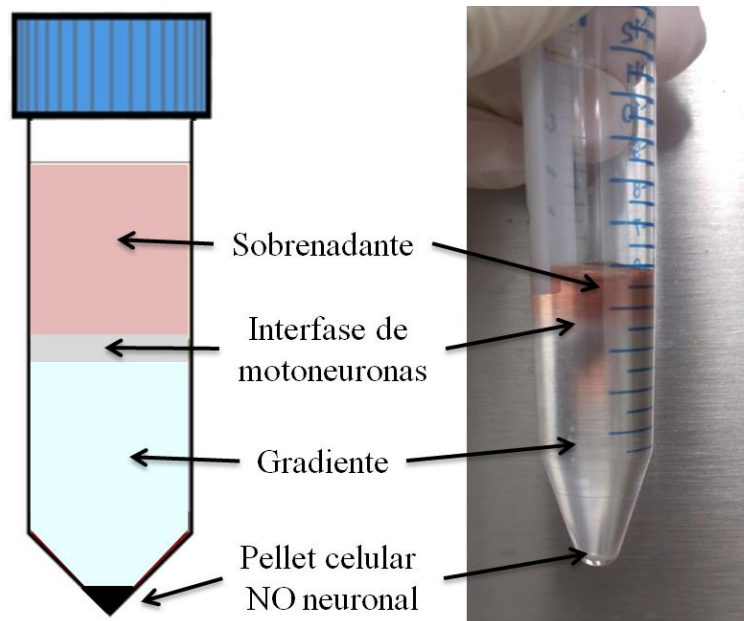


**Fig. 4. Procedimiento del procedimiento de disección y aislamiento de médulas espinales a partir de embriones de ratón.** Una vez inmobilizado el embrión con agujas y dejando a la vista la parte dorsal, se realiza una escisión rostro-caudal que permite la visualización directa de la médula (**A y B**). Posteriormente con ayuda de pinzas se va liberando la médula del resto del cuerpo (**C, D y E**) hasta liberarla completamente, retirando finalmente las meninges (**F**).

Una vez todas las médulas espinales fueron extraídas y fragmentadas, se realizaron dos lavados con medio salino y seguidamente se realizó un paso de tripsina-EDTA 0,25% diluida diez veces en medio salino (concentración final 0,025%) durante 10 minutos con agitación cada 2 minutos a 37 °C. Tras esta incubación, las médulas fueron transferidas a un nuevo tubo que contiene 800  $\mu$ L de medio L15 suplementado (20 mM D-glucosa, 100 U/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina, 1% de suplemento N2 (Thermo Fisher) y 2% HS) y 100  $\mu$ L de albumina sérica bovina (BSA) al 4% en PBS a las que seguidamente se les añadió 100  $\mu$ L de ADNasa (200 U total). Tras ello, se agitaron los tubos vigorosamente con la mano durante 2 minutos y posteriormente se aspiró y expulsó todo el contenido de los tubos con la pipeta



P1000 cuatro veces, tras lo cual se dejó decantar los fragmentos de médula no homogenizados por 2 minutos. Pasado este tiempo, se transfirió a un tubo nuevo la suspensión homogénea de células disociadas para repetir un nuevo paso de disgregación enzimática con ADNasa de los fragmentos no digeridos. Para ello, a los fragmentos sin disociar se les añadió nuevamente 900  $\mu$ L de L15 suplementado como se ha descrito anteriormente y 100  $\mu$ L BSA al 4%, pero esta vez con 40 U de ADNasa, sin repetir el paso de agitación y pipeteando nueve veces los fragmentos restantes. Se transfirió de nuevo el volumen que contiene la suspensión celular y este paso se repitió en caso de no lograrse la digestión completa de los fragmentos de médulas espinales. Posteriormente, bajo la suspensión celular se depositó un volumen de 4 mL de BSA al 4% en PBS, generando un gradiente BSA-suspensión celular, el cual al centrifugar a 200 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente permitió limpiar la suspensión celular y generar un *pellet*, que seguidamente fue resuspendido en 1 mL de L15 suplementado una vez aspirado el sobrenadante. Finalmente, este volumen de suspensión celular se depositó cuidadosamente sobre 4 mL del gradiente de separación formado por una dilución 1:8 de OptiPrep (D1556, StemCell) en medio DMEM no suplementado (31053-028, Sigma-Aldrich). Posteriormente se procedió a centrifugar a 520 x g durante 10 minutos reduciendo la aceleración y deceleración a 4 y 3 puntos sobre 10, respectivamente, y a temperatura ambiente. Tras este paso, se recuperó la interfase enriquecida en motoneuronas formada entre el gradiente OptiPrep y el sobrenadante del medio superior como ejemplifica la figura **(Fig. 5)**.



**Fig. 5. Separación para el aislamiento de motoneuronas primarias tras centrifugación en gradiente de densidad.** Tras el paso de centrifugación, las motoneuronas, de mayor tamaño y menor densidad que el resto de células, no son capaces de superar el gradiente y quedan formando una interfase de apariencia blanquecina rica en este tipo celular. Las células no neuronales son capaces de sobrepasar este gradiente y formar un pellet al final del tubo.

La suspensión celular se diluyó hasta la concentración necesaria para los experimentos en medio Neurobasal (21103049, Gibco) suplementado con 5% HS, 2% de suplemento B-27 (17504044, Gibco), 0,5 mM L-glutamina, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol (Thermo Fisher), 100 U/mL de penicilina, 100  $\mu$ g/mL de estreptomina, 10 ng/mL de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (PeproTech), 10 ng/mL de factor neurotrófico ciliar (CNTF) (PeproTech), 10 ng/mL de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (PeproTech) y 10 ng/mL de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (PeproTech). 24 horas tras la siembra, se realizó un cambio de medio al 50% añadiendo medio Neurobasal fresco suplementado como se ha descrito, además del inhibidor de crecimiento citarabina (Thermo Fisher) 2  $\mu$ M final, evitando la proliferación de otros tipos celulares no neuronales. Tras 24 horas de la adición de la citarabina, se procedió a un nuevo cambio de medio al 100% por nuevo Neurobasal fresco suplementado para retirar los restos del inhibidor.

Para la siembra de las motoneuronas y obtener una correcta generación de apéndices neuríticos y una adherencia efectiva, es necesario el previo tratamiento de las placas de cultivo. Para ello, las placas fueron tratadas antes

de sembrar con 35 µg/mL de poli-DL-ornitina (Sigma-Aldrich) diluida en una solución de 150 mM tetraborato sódico y 150 mM ácido bórico a pH 8.3 durante al menos 4 horas. Tras este primer tratamiento de las placas, el volumen fue aspirado y los pocillos lavados 3 veces con agua bidestilada estéril y se dejó secar completamente antes del segundo tratamiento. Tras este paso, se añadieron 3,8 µg/mL de laminina (Sigma-Aldrich) diluida en L15 sin suplementar y se incubó durante al menos 1 hora a 37 °C, volumen el cual fue retirado justo antes de sembrar las motoneuronas sin dejar secar.

Para comprobar la pureza de los cultivos de motoneuronas primarias y la eficiencia del protocolo, se realizó inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-ISLET1 (#38866, SAB) (**Tabla 3**) específico para un factor de transcripción presente sólo en motoneuronas en etapas embrionarias.

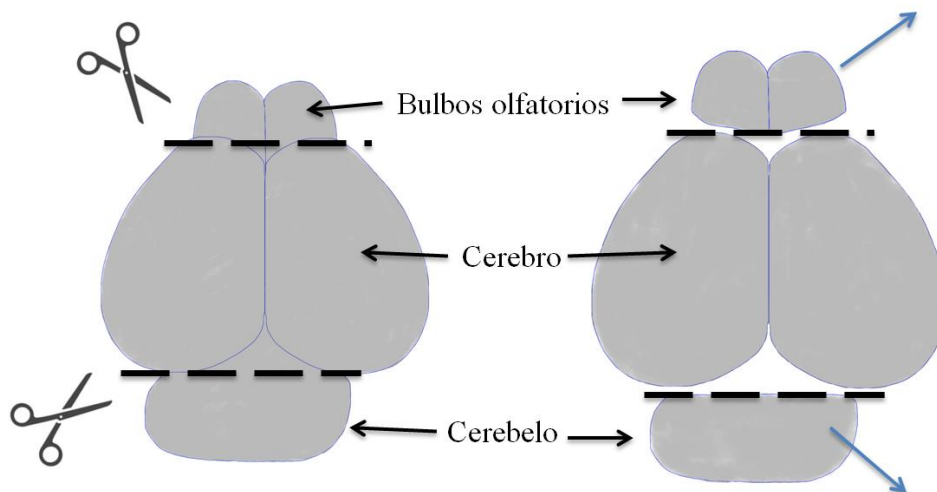
#### **4.6. Ensayos de medios condicionados por líneas microgliales SIM-A9 sobre cultivos de motoneuronas primarias**

Se tomaron cultivos primarios de motoneuronas puras tras 5 días en cultivo a los que se les realizó un cambio de medio completo por un 50% de medio Neurobasal suplementado y fresco con una concentración 2X de factores tróficos (BDNF, CNTF, GDNF y HGF) y 50% medio condicionado por líneas microgliales SIM-A9 anteriormente descrito.

#### **4.7. Aislamiento de microglía primaria de neonatos de ratón**

Para los cultivos de microglía primaria puros se tomaron de 12 a 16 neonatos de 1-3 días de edad de la cepa C57BL/6 (Centro de Experimentación Animal Óscar Pintado, Universidad de Sevilla, Sevilla, España). Tras el sacrificio, se tomaron los encéfalos y se les eliminó el cerebelo, bulbo olfatorio y las meninges con pinzas sobre HBSS frío (Thermo Fisher) (**Fig. 6**). Seguidamente, se procedió a la digestión de los cerebros con tripsina-EDTA 0,25% durante 15 minutos a 37 °C. La reacción fue detenida añadiendo un volumen igual de DMEM-F12 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% FBS, 2 mM de L-glutamina, 10 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 100 U/mL de ADNasa y agitando unos minutos hasta la eliminación de grandes fragmentos de cerebro. La suspensión resultante fue transferida a un tubo nuevo a través de un filtro con

tamaño de poro de 70  $\mu\text{m}$  para evitar el paso de fragmentos sin digerir. Posteriormente se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos. Dicho *pellet*, conformado por una suspensión mixta de células gliales, fue resuspendido en medio DMEM-F12 suplementado como se ha descrito (sin ADNasa) y sembrado en cuatro placas de seis pocillos previamente tratadas durante 2 horas con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de poli-D-lisina. Se realizó cambio de medio por medio completo fresco 2 veces por semana.



**Fig. 6. Disección realizada sobre cerebros de ratones neonatos para la preparación de cultivos de microglía primaria.** Una vez extraído el encéfalo, se colocó sobre HBSS frío, y mediante el instrumental adecuado se retiró el cerebelo, bulbos olfatorios y las meninges, dejando el cerebro totalmente limpio.

Tras la formación de una monocapa de células gliales mixtas confluyente que cubriese la totalidad del pocillo, aproximadamente 4 semanas tras la siembra, se procedió a aislar células microgliales del cultivo mixto. Para ello, se retiraron y guardaron los sobrenadantes y se realizó un lavado con DMEM sin suplementar, posteriormente se realizó un paso de tripsinización suave al 0,015% durante 20-45 minutos a 37 °C hasta lograr retirar el resto de las células no microgliales, como astrocitos u oligodendrocitos. Posteriormente se aspiró el sobrenadante de células desprendidas y se realizó un lavado con PBS. Seguidamente se añadió acutasa (StemPro) y se incubó 15 minutos a 37 °C. Finalmente se procedió a levantar las células de los pocillos con ayuda de un rascador para transferir la suspensión celular a un tubo y se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos. El *pellet* fue resuspendido en el medio guardado

previamente junto a un 50% de medio fresco y sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad de 120.000 células por pocillo durante 72 horas antes de realizar cualquier tratamiento.

#### **4.8. Generación de cultivos organotípicos y tratamientos**

Los cultivos organotípicos fueron generados a partir de regiones lumbares de médulas espinales de ratones macho de 4 semanas de edad de la cepa C57BL/6. Tras anestesiarse, los ratones fueron perfundidos con 10 mL de PBS seguido de 10 mL de buffer de extracción KREBS frío (126 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 72 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,8 g/L D-glucosa, 0,1 M HEPES, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina). Tras ello, las secciones lumbares de las médulas espinales fueron escindidas del cuerpo y depositadas en KREBS frío. Las médulas se colocaron en agarosa al 4% a 37 °C y se cortaron en secciones transversales de 250 µm con una cuchilla vibratoria (VT1000S, Leica *Biosystems*, Nussloch, Alemania) a 75 Hz y a una velocidad de 0,1 mm/segundo. Los cortes se mantuvieron en cultivo con un medio compuesto por 50% (v/v) de Medio Mínimo Esencial (MEM) (Sigma-Aldrich) suplementado con 25 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 25% de HS, 2 mM de L-glutamina, y 25% de HBSS suplementado con 25,6 mg/mL de glucosa con un pH final de 7.2. Los cortes se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y saturación de humedad. Los cultivos se dejaron estabilizar los primeros cuatro días, y posteriormente el medio cambiado cada 3 días. Tras una semana, se realizaron los estímulos con LPS o control como se ha descrito durante 16 horas. Tras este periodo, se guardaron los sobrenadantes como se ha descrito para posteriormente confirmar la correcta estimulación por ELISA de la interleuquina IL-6. Tras los ensayos y confirmadas las respuestas a los estímulos, se procedió a realizar inmunofluorescencias a los cortes como se describe más adelante.

#### **4.9. Determinación de viabilidad por ensayo de MTT de líneas celulares NSC-34**

Para valorar la viabilidad celular de la línea NSC-34 se utilizó el kit de proliferación celular basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (#11465007001, Roche) el cual permite medir

la transformación de la sal de tetrazolio a MTT gracias al metabolismo de las células activas. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se sembraron  $1,5 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer como se ha indicado. Tras finalizar el estímulo requerido por los experimentos, se procedió a añadir 10  $\mu$ L del reactivo salino marcador a cada pocillo y se dejó incubar a 37 °C durante 4 horas para permitir la generación de MTT. Tras esta incubación se añadieron 100  $\mu$ L del reactivo de solubilización y se procedió a una nueva incubación a 37 °C durante 16 horas. Tras este tiempo, el color púrpura generado fue analizado en un lector de microplacas *Varioskan* (Thermo Fisher) a una longitud de onda entre 550 y 600 nm formando una relación directamente proporcional de la viabilidad celular respecto a la generación de color y tomando los controles experimentales como el 100% de viabilidad celular.

#### **4.10. Ensayos de viabilidad de motoneuronas primarias de embriones de ratón con medios condicionados de microglía por microscopía de cribado de alta eficiencia**

Se realizaron ensayos de viabilidad celular usando el kit de valoración de viabilidad LIVE/DEAD (Invitrogen) por fluorescencia en un microscopio de cribado de alto rendimiento. Este kit tiñe las células vivas gracias a la actividad esterasa por la que las células son capaces de metabolizar el precursor no fluorescente de la calceína y generar color verde. Por otro lado, la membrana plasmática de las células necróticas se vuelve permeable y permite el paso del homodímero de etidio 1 el cual se une a ácidos nucleicos generando color rojo. Se sembraron motoneuronas primarias de ratón en placas de 96 pocillos (Nunc) compatibles con el equipo de visualización a una densidad de  $1,5 \times 10^4$  por pocillo.

Al terminar los tiempos de estimulación con medios condicionados sobre las motoneuronas y siguiendo las recomendaciones del fabricante, se retiró el medio de cultivo y se añadieron a cada pocillo los reactivos colorantes del kit diluidos en PBS para ser incubados durante 5 minutos a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, se tomaron 16 campos de imágenes por cada pocillo con el microscopio de escrutinio masivo confocal *IMAGEPRESS MICRO SYSTEM*

(Molecular Devices) a longitudes de onda de excitación/emisión de 494/517 nm para el verde y 528/617 nm para el rojo.

Los resultados de las imágenes fueron analizados mediante el programa *MetaExpress*, el cual permite contabilizar el número de células muertas (marcadas en rojo) presentes en un área determinada del pocillo.

#### 4.11. Inmunofluorescencia de cultivos celulares

Para los ensayos de inmunofluorescencia, se utilizaron células SIM-A9, cultivos de microglía primaria puros o motoneuronas primarias obtenidos como se ha descrito anteriormente, excepto que, en este caso, los cultivos se sembraron en cubreobjetos de vidrio pretratados como corresponde a cada tipo celular primario. Para el proceso de inmunomarcaje, tras terminar los tiempos requeridos por los experimentos, los cultivos se fijaron en PBS frío que contenía un 4% de paraformaldehído (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos a 4 °C, que luego se lavaron con PBS antes de ser permeabilizados y los sitios inespecíficos bloqueados con una solución de bloqueo que contenía un 0,5% (v/v) de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) y un 3% de BSA en PBS (buffer de bloqueo) durante 1 hora a 4 °C. Tras este tiempo, las células se incubaron durante la noche a 4 °C con los diferentes anticuerpos primarios (**Tabla 3**) diluidos en buffer de bloqueo. Tras lavar con PBS, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo (**Tabla 4**) diluido en buffer de bloqueo nuevamente. Después de 3 lavados con PBS, los núcleos se tiñeron con 1 µg/mL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente para la correcta contra tinción de los núcleos. Finalmente, los cubreobjetos se depositaron sobre un portaobjetos en el que previamente había sido colocada una gota de medio de montaje (H-1000, VectaShield).

Las imágenes de fluorescencia se capturaron con un microscopio de epifluorescencia (DM6000B; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) o un microscopio de escaneo láser confocal (Confocal Lase Scanning Microscope TCS SP5; Leica Microsystems). Las imágenes de fluorescencia se tomaron a una magnificación de 63X en 10 campos elegidos al azar.

#### 4.12. Inmunohistoquímica (IHC)

Tanto los ensayos de inmunohistoquímica (IHC) como los análisis posteriores fueron realizados bajo doble ciego. Fragmentos previamente fijados de la región lumbar de las médulas espinales de ratones Tg<sup>TDP43</sup> o ratones silvestres y cortes de pacientes diagnosticados con ELA-E o pacientes sanos, fueron embebidos en parafina y seccionados en rodajas de 10 µm de grosor. Tras desparafinar, los cortes fueron incubados en buffer de citrato 1X (#C9999, Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 95 °C para desenmascarar los epítomos. Seguidamente, se realizó una incubación con 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p/v) para inhibir la actividad peroxidasa endógena. Tras ello, los cortes fueron incubados con 1% de BSA para bloquear lugares inespecíficos durante una hora a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se realizó la incubación con el anticuerpo primario anti-bpMOK (pThr159+pTyr161, #SPC-1030, StressMarq) (**Tabla 3**) durante toda la noche. Tras la incubación, las muestras fueron lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado apropiado y seguidamente incubadas con el complejo avidina-biotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (*Vectastain ABC-HRP Kit, Peroxidase-Rabbit IgG, Vector Laboratories*, EE. UU.). Finalmente, los cortes fueron tratados con el sustrato cromógeno diaminobencidina-niquel (DAB-nickel, *Vector Laboratories*) y visualizadas bajo un microscopio Leica DM6000B con el que se tomaron imágenes a una magnificación 40X.

#### 4.13. Inmunofluorescencia de cultivos organotípicos

El protocolo de inmunofluorescencia de cultivos organotípicos fue similar al aplicado para inmunofluorescencia de cultivos celulares, pero con ligeros cambios. Tras los tiempos de estimulación pertinentes, los cultivos organotípicos se fijaron durante 3 horas a 4 °C, tiempo tras el cual se bloquearon con 5% de suero de burro y 0,5% (v/v) de Triton X-100. Tras ello, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 3**) diluidos en el mismo buffer de bloqueo. Tras este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS con 0,2% de Tween-20 y se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente apropiado (**Tabla 4**) diluido en PBS con 1% de suero de burro y 0,5% de Triton X-100 por 2 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI diluido en PBS durante 15 minutos a



temperatura ambiente, montados en portaobjetos como se ha descrito para las inmunofluorescencias de cultivos celulares y visualizados en un microscopio confocal como se ha referenciado.

#### 4.14. Determinación de citoquinas mediante ELISA

Los cultivos de microglía primaria o células SIM-A9 fueron estimulados como se describió anteriormente. Tras el tiempo estimado para cada citoquina o experimento, los sobrenadantes de cultivo recolectados se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos a 4 °C, se recuperaron los sobrenadantes libres de células y se almacenaron a -20 °C hasta la determinación de citoquinas. Los niveles de IL-6 (#555240), TNF $\alpha$  (#555268) e IFN $\beta$  (#559603) se determinaron con el kit correspondiente de ELISA BD OptEIA™ para ratón (BD Biosciences). Para la cuantificación de IL-1 $\alpha$  (#DY400-05) se utilizó el kit de DuoSet®. Todas las cuantificaciones de citoquinas se realizaron siguiendo los protocolos del fabricante y se utilizó un lector de placas *Varioskan* para realizar las mediciones.

#### 4.15. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Los clones de SIM-A9 control y MOK-KO fueron sembrados en placas de Petri de 100 mm de diámetro hasta alcanzar el 80% de confluencia para cada condición experimental. Tras realizar las estimulaciones experimentales, a los cultivos se le añadió formaldehído (Sigma-Aldrich) a una concentración final del 1% en buffer de *crosslinking* (**Tabla 5**) para fijar las uniones proteína-ADN durante 10 minutos a 37 °C. Tras este tiempo, se procedió a detener la reacción añadiendo glicina (Sigma-Aldrich) a una concentración final 125 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se aspiró el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con PBS frío. Tras retirar el PBS del último lavado, se añadieron nuevamente 2 mL de PBS frío suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete Mini cocktail, #11836170001, Merck y 1 mM PMSF, #A0999, PanReac AppliChem), procediendo inmediatamente al rascado y traspaso a un tubo para su posterior centrifugación a 3.300 x g durante 5 minutos a 4 °C. Tras centrifugar, se procedió a lisar el contenido celular con 2,5 mL de buffer de lisis 1 (**Tabla 5**) (suplementado nuevamente con el cóctel de inhibidores de proteasas) e incubando esta suspensión durante

10 minutos sobre hielo. Posteriormente, se centrifugó el lisado celular a 3.300 x g 5 minutos durante 4 °C. Seguidamente, el *pellet* fue resuspendido y homogenizado en 1 mL de buffer de lisis 2 (**Tabla 5**) (suplementado nuevamente con inhibidores de proteasas) y dejado incubar 10 minutos en hielo. Tras la lisis celular, se procedió a la rotura de la cromatina mediante ondas sónicas en un bioruptor (Branson), permitiendo la generación de fragmentos de una longitud aproximada entre 200 y 500 pares de bases. El programa usado para la sonicación de la línea celular SIM-A9 fue de 13 ciclos de 30 segundos *on* y 30 segundos *off*, con una amplitud del 10% de trabajo. Tras el paso de sonicación, se procedió a centrifugar las muestras a 1.500 x g durante 5 minutos a 4 °C. Tras pasar el sobrenadante a un tubo nuevo se siguió con una segunda centrifugación a 16.200 x g durante 10 minutos a 4 °C, tras la que el sobrenadante fue recuperado a 4 °C en un tubo nuevo, conteniendo la cromatina fragmentada. Habiendo comprobado que la mayoría de los fragmentos de cromatina tenían el tamaño esperado mediante purificación y corrido en un gel de agarosa como se describe en el apartado siguiente, se tomaron 30 µg de cromatina para cada muestra a inmunoprecipitar. Por lo general, de cada condición experimental se realizaron tres inmunoprecipitaciones: una con el anticuerpo de interés (Anti-Brd4, #A301-985A100, Bethyl), un control negativo de la unión inespecífica de la inmunoglobulina (Anti-IgG no inmunógena, #I5006, Sigma-Aldrich) y un control positivo contra histona (Anti-histona H2A.X, Ab11175, Abcam) (**Tabla 3**). Cada muestra fue diluida hasta 1 mL de volumen final en buffer de inmunoprecipitación (IP) (**Tabla 5**) suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas descrito. A cada muestra se le añadieron 3 µg de anticuerpo y se dejó incubar la mezcla en rotación lenta (40 revoluciones por minuto) a 4 °C durante 16 horas para permitir la unión de los anticuerpos. Tras este tiempo y antes de seguir con la inmunoprecipitación, es necesario lavar los *protein G Dynabeads* (#10004D, Invitrogen) y sustituir el buffer del fabricante por el buffer IP. Para ello se tomaron 900 µg por muestra (30 µL) de *Dynabeads* los cuales fueron lavados 3 veces con buffer IP, sometiendo los *Dynabeads* a campo magnético al retirar los sobrenadantes para no descartarlos. Tras lavar los *Dynabeads*, se añadieron 30 µL de ellos a cada muestra a inmunoprecipitar y se dejó incubar nuevamente en rotación lenta a 4 °C durante 2 horas. Pasado

este tiempo, se procedió a una serie de lavados, todos ellos sometiendo a las muestras a campo magnético al retirar sobrenadantes y con tiempos de incubación de 5 minutos en rotación lenta y a 4 °C. Se realizó un primer lavado con el buffer de lavado 1 (**Tabla 5**), un segundo con el buffer de lavado 2 (**Tabla 5**) y un tercero con el buffer de lavado 3 (**Tabla 5**). Tras ello, se realizaron 2 lavados con el buffer TE 1X (**Tabla 5**). Tras retirar el sobrenadante del último lavado, se añadieron 50 µL de buffer de elución (**Tabla 5**) recién preparado y la muestra fue incubada a 65 °C durante 10 minutos sin rotación. Pasado el tiempo, las muestras fueron sometidas al campo magnético nuevamente para retirar y guardar en un tubo limpio 30 µL del sobrenadante. A los 20 µL restantes de inmunoprecipitado se les añadieron otros 30 µL de buffer de elución y se repitió la última incubación. Tras esta incubación, nuevamente se colocaron los tubos en un campo magnético y se traspasó otros 30 µL de eluido a los 30 µL previos. A cada muestra se le añadieron 90 µL más de buffer de elución hasta un total de 150 µL. Paralelamente, es necesario generar las condiciones *INPUT* con la cual se normalizaron los resultados de las qPCR para cada condición experimental. Para ello, se tomó una décima parte del volumen de cromatina tomado para el paso de inmunoprecipitación y este volumen fue llevado hasta 150 µL en buffer de elución, generando así una cuarta muestra para cada condición experimental que sirve de normalizador. Para romper la unión de las proteínas al ADN y poder purificar este último, las muestras fueron incubadas a 65 °C durante 16 horas. Tras esta incubación, a las muestras se les añadieron 150 µL de buffer TE 1X que contenía 250 µg/mL de proteinasa K y se incubaron 1 hora a 37 °C. Finalmente las muestras fueron purificadas usando un kit de lavado y concentrador de muestras para qPCR (Zymo Research) y mantenidas a -20 °C para su almacenamiento hasta su posterior análisis por qPCR.

#### 4.16. Purificación de ADN ChIP

Para comprobar la eficacia de la sonicación, se tomaron 50 µL de cromatina de cada condición experimental a la que se añadieron 250 µL de buffer de lisis 1 (usado en el apartado anterior) y 250 µg/mL de proteinasa K (10 µL) y se incubó a 65 °C durante al menos 2 horas. Tras este tiempo, se añadieron 500 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamilo (25:24:1 v/v) (P4557, Sigma-Aldrich), se

agitó vigorosamente durante 20 segundos y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras este paso, se transfirió el sobrenadante superior de la fase acuosa formada a un tubo nuevo al que se le añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y un décimo de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y seguidamente se mezcló el contenido. Para precipitar el ADN, se incubaron las muestras a -20 °C durante 20 minutos. Tras la precipitación y centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos, se realizaron 2 lavados con etanol 70%, centrifugando nuevamente a 12.000 x g por 10 minutos y eliminando el sobrenadante en cada lavado. Tras el último lavado, se eliminó la mayor cantidad de etanol posible y se dejó secar el *pellet* unos minutos para posteriormente resuspenderlo en agua bidestilada y calcular su concentración y calidad en un dispositivo Nanodrop (Thermo Fisher). Las extracciones de ADN de líneas celulares se realizaron de forma similar.

#### **4.17. Caracterización mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de la sonicación (ChIP)**

Para cada condición experimental se tomaron 1,5 µg de ADN ya purificado junto a tampón de carga para facilitar su siembra en gel y visualización en el proceso. Se prepararon geles de agarosa al 1,2% en TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA a pH 8.3) teñido con *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Fisher) para la observación correcta de un perfil homogéneo de bandas en un rango de 200-500 pares de bases con la ayuda de un marcador de tamaño (MWD01, Nippon Genetics). Los geles fueron sometidos a una corriente de 100 voltios durante 50 minutos que permitiese la correcta separación del marcador de tamaño. Finalmente, los geles fueron revelados en un transiluminador (Bio-Rad) a un tiempo de exposición adecuado. Tras la comprobación de la obtención de un tamaño de bandas correcto, se procedió con la inmunoprecipitación de cromatina como se ha descrito anteriormente.

#### **4.18. Extracción de ARN**

Tras las estimulaciones de los cultivos celulares y según los tiempos que las condiciones experimentales requiriesen se procedió con la extracción de ARN para el cual se utilizó el reactivo *TRIzol* (Canvax). Las células fueron lisadas con dicho reactivo, recogidas en un tubo eppendorf limpio libre de

ARNasas e incubadas 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió un quinto del volumen de cloroformo por cada volumen de PRImeZOL usado y se mezcló vigorosamente durante 15 segundos. Tras incubar la mezcla unos 3 minutos a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Tras este paso, la fase acuosa superior fue traspasada a un tubo nuevo y el resto descartado. Para proceder con la precipitación de ARN, al volumen recuperado se le añadió medio volumen de isopropanol por la cantidad de PRImeZOL usado anteriormente y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y seguidamente se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante, se realizó un paso de lavado con etanol 70% y se procedió nuevamente a centrifugar a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C. Finalmente, se descartó el máximo volumen posible de sobrenadante y se dejó secar el *pellet* unos minutos a temperatura ambiente para posteriormente resuspender dicho *pellet* en agua libre de ARNasas.

#### 4.19. Retrotranscripción

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron gracias al kit de dos pasos de TaKaRa *PrimeScript™ RT reagent* (#RR047Q). Se utilizó 1 µg de ARN por cada muestra a la que se le realizó un primer paso de eliminación de ADN genómico seguido de un paso posterior de retrotranscripción siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para el control de los ciclos de temperatura se utilizó un termociclador (Bio-Rad). Una vez obtenido ADN complementario, se procedió a realizar qPCR.

#### 4.20. PCR cuantitativa (qPCR)

Las PCRs cuantitativas en tiempo real se realizaron con el kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en un equipo de PCR en Tiempo Real *QuantStudio 5* (Applied Biosystems). Los pares de oligonucleótidos (Merck) fueron diseñados específicamente para unirse en diferentes secuencias localizadas en exones diferentes, y mostradas en la **Tabla 6**. Se realizaron 40 ciclos utilizando un perfil térmico optimizado y recomendado por el fabricante (**Tabla 1**). Los cambios en la expresión génica se determinaron utilizando el  $\Delta C_t$ , tomando el gen de la *hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa* (*HPRT1*)

como control endógeno para la normalización. Los valores de  $\Delta\Delta Ct$  se calcularon restando los valores promedio de  $\Delta Ct$  obtenidos para las muestras de células no tratadas control.

Respecto a las PCR cuantitativas para analizar los experimentos ChIP, los resultados fueron representados respecto al porcentaje de enriquecimiento de la condición *INPUT*.

**Tabla 1. Condiciones generales de qPCR.**

Paso		Tiempo	Temperatura
Desnaturalización y activación de la polimerasa		20 segundos	95 °C
Desnaturalización	40 ciclos	15 segundos	95 °C
Alineamiento y extensión		60 segundos	60 °C
Análisis de curva de separación ( <i>melt curve</i> )		Desde 65 hasta 95 °C, con incrementos de 0.5 °C cada 2 segundos	

#### 4.21. PCR convencional

Para la comprobación de que las mutaciones introducidas por CRISPR/Cas9 coinciden a los referidos por el fabricante, se realizaron PCR tradicionales del ADN genómico de los clones previamente purificado como se ha para la posterior secuenciación *Sanger*, que se realizó con la polimerasa *MyTaq Red DNA Polymerase* (#BIO-21108, Meridian Bioscience) en un termociclador (Bio-Rad) (**Tabla 2**). Los oligonucleótidos usados se diseñaron para la amplificación de las regiones mutadas (**Tabla 6**). Las muestras fueron secuenciadas por el servicio de secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid) y los resultados analizados con el programa *SnapGene* y la herramienta *online* de alineamiento de secuencias Multalin.

**Tabla 2. Condiciones de PCR convencional.**

Paso		Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		60 segundos	95 °C
Desnaturalización	30 ciclos	15 segundos	95 °C
Alineamiento		15 segundos	68 °C
Extensión		10 segundos	72 °C

#### 4.22. Transfección de líneas SIM-A9 para medición de citoquinas intracelulares por citometría de flujo

Para la sobreexpresión de las versiones silvestre y “no actividad quinasa” (*Kinase Dead*) de MOK unido a la marca *FLAG* sobre la línea de microglía SIM-A9, se utilizaron plásmidos con dicha construcción previamente descritos (Miyata et al., 2001) y cedidos por el grupo de Yoshihiko Miyata (Universidad de Kyoto, Japón). Para ello, se utilizó el reactivo de transfección específico para células microgliales *Glial Mag* (KGL0250, OzBiosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se diluyó en medio Optimem (31985962, Gibco) 1  $\mu$ L del reactivo de *Glial Mag* y 0,5  $\mu$ g del plásmido para cada muestra en placa de 24 pocillos. El tiempo total de transfección fue de 30 horas, siendo las 5 últimas horas bajo condiciones de estimulación con o sin LPS además de GolgiStop (554724, BD Biosciences).

#### 4.23. Determinación de citoquinas intracelulares por citometría de flujo

Tras los tiempos experimentales para la sobreexpresión y estimulación, las células SIM-A9 fueron fijadas y permeabilizadas gracias al reactivo *Fixation/Permeabilization solution* (555028, BD Biosciences) durante 20 minutos a 4 °C. Tras lavar 2 veces con el buffer de lavado (2 mM EDTA, 2% FBS v/v en PBS), las células fueron incubadas en *Perm/Wash buffer* (555028, BD Biosciences) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para el inmunomarcaje, se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados: APC-conjugado anti-FLAG (Ab72569, Abcam) y PE-conjugado anti-IL-6 (AB395367, BD Biosciences) a una dilución 1:40 (**Tabla 3**) en *Perm/Wash buffer*. Tras agregar los anticuerpos a las muestras, se dejó incubar 30 minutos a 4 °C en condiciones de oscuridad. Tras este tiempo, las muestras fueron lavadas con *Perm/Wash Buffer* 2 veces, resuspendidas finalmente en buffer de lavado y mantenidas a 4 °C y oscuridad hasta su análisis en el citómetro *LSR Fortessa X-20* (BD Biosciences).

#### 4.24. Western blot

Para los ensayos de Western blot se sembraron las células en placas de 24 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  por pocillo con las líneas de SIM-A9 y se trataron 24 horas tras la siembra según las condiciones experimentales requeridas. Después de la incubación pertinente, las células se lavaron una vez con PBS frío y tras retirarlo se provocó la lisis celular sobre hielo con buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl pH 7.4, 0,25% deoxicolato sódico, 10% glicerol, 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS), 1% IGEPAL CA-630) complementado con inhibidores de proteasas (cOmplete Mini cocktail y PMSF) e inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP, #04906845001, Roche). Con ayuda de la pipeta, aspirando y expulsando el volumen de buffer de lisis, se recogió del pocillo todo el volumen con el contenido celular lisado en un tubo y se incubó 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, se incubó en hielo durante 20 minutos con agitación leve cada 5 minutos y después se centrifugaron las muestras a 12.000 x g por 5 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó usando el kit *Micro BCA™ Protein Assay* (Thermo Fisher) y un lector de placas *Varioskan*.

Conociendo la concentración de proteína total en la muestra, se tomaron volúmenes (20 µL aproximadamente) y concentraciones comparables de proteína (40-50 µg aproximadamente), conteniendo buffer de carga y 50 mM de ditioneitol (DTT). Las muestras se sometieron a 95 °C durante 10 minutos para provocar la desnaturalización de las proteínas antes de ser cargadas a un gel de poliacrilamida del 12, 10 ó 7% con SDS (SDS-PAGE). Las muestras fueron sometidas a electroforesis a 180 V durante el tiempo necesario para que las proteínas de interés se resuelvan convenientemente con ayuda del marcador de peso molecular como referencia (#1610374, Bio-Rad). Tras este tiempo, todas las muestras fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o nitrocelulosa mediante transferencia húmeda o semi-húmeda, respectivamente.

Tras transferir las proteínas a la correspondiente membrana, se procedió a bloquear los sitios inespecíficos de unión para anticuerpo de las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación con ayuda de una solución de bloqueo formada por 5% de leche desnatada en polvo o 5% de BSA, en



solución salina tamponada con Tris (TBS) y 0,1% de Tween 20 (TBST). Tras el proceso de bloqueo, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBST y seguidamente se incubaron las membranas con los respectivos anticuerpos primarios necesarios diluidos en TBST y 1,5% de BSA o TBST y 1% de leche desnatada (**Tabla 3**), durante 16 horas a 4 °C en agitación. Posteriormente, las membranas fueron lavadas de nuevo 3 veces con TBST por 10 minutos cada uno para después ser incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en TBST y 1,5% de BSA o TBST y 1% de leche desnatada (**Tabla 4**) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Nuevamente se realizaron 3 lavados en TBST y finalmente se detectó la unión de los anticuerpos con ayuda del kit de revelado por quimioluminiscencia (WBKLS0500, Merck) cuya señal fue capturada gracias al equipo *ChemiDoc™ MP System* (Bio-Rad). Las imágenes obtenidas fueron analizadas y cuantificadas por densitometría con el programa *Image Lab™*, y la expresión relativa de las muestras fue normalizada a su respectivo control de carga endógeno. Como control endógeno se utilizaron los anticuerpos contra los genes constitutivos GAPDH y  $\alpha$ -tubulina (**Tabla 3**).

#### 4.25. Aislamiento de microglía de ratones adultos

Para el aislamiento de microglía a partir de médulas espinales de ratones adultos se tomaron animales con 14 semanas de edad, tanto WT como SOD1<sup>G93A</sup>, a los que se les extrajo la médula espinal tras ser anestesiados y posteriormente perfundidos. Éstas fueron fragmentadas en porciones de 2-3 mm y depositadas sobre HBSS frío. Posteriormente, las médulas fueron digeridas enzimáticamente con tripsina-EDTA 0,25% durante 10 minutos a 37 °C. Tras este tiempo, la reacción enzimática fue detenida añadiendo medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de FBS. Finalmente, los restos medulares fueron disociados mecánicamente mediante pipeteo y pasando la solución generada por un filtro de 70  $\mu$ m, que posteriormente se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos a 4 °C para formar un *pellet* celular. Para eliminar restos de mielina, el *pellet* celular fue resuspendido con 2 mL Percoll isotónico al 70% (#1644, Sigma-Aldrich) al que posteriormente se le depositó con cuidado encima una capa de 3 mL Percoll al 35% en PBS y una capa final de 2 mL PBS. Este gradiente discontinuo fue centrifugado a 850 x g

durante 35 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron tomadas de la interfase y lavadas con PBS, centrifugadas y finalmente resuspendidas en RPMI 1640 suplementado con 2% de FBS para los ensayos de citometría.

#### **4.26. Administración de C13 y monitorización de los animales SOD1<sup>G93A</sup>**

Cada ratón fue inyectado intraperitonealmente en días alternos con un total de 100  $\mu$ L con 20  $\mu$ g de C13 en PBS o 2% de DMSO como vehículo. El tratamiento tuvo una duración de 3 semanas, teniendo comienzo en la semana 11 de edad de los ratones. A los ratones se les realizaron pruebas en Rotarod y sus masas corporales fueron pesadas dos veces por semana.

#### **4.27. Preparación de lisados celulares e inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas**

Tras el tratamiento de células de microglía primaria con los agregados de TDP-43 o Sham, como se ha descrito anteriormente, se recogieron y guardaron los sobrenadantes. Tras 2 lavados con PBS, las células se lisaron con tampón de lisis no desnaturante NP-40 (#FNN0021, Invitrogen) suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa ya citado, y se siguió el protocolo anterior para la generación de lisados celulares. Previamente a la inmunoprecipitación, se generaron los complejos *beads*-anticuerpo. Para ello se incubó *Protein A Dynabeads* (#10001D, Invitrogen) con 2  $\mu$ g de anticuerpo anti-fosfo-Ser/Thr (#ab17464, Abcam) durante 1 hora a temperatura ambiente en rotación, produciéndose la generación de los complejos gracias al buffer de BS3 (bis(sulfosuccinimidil)suberato) (#21580, Thermo-Fisher). Tras este tiempo, se añadieron los complejos *beads*-anticuerpo a los lisados celulares y se incubaron bajo rotación durante 1 hora a temperatura ambiente para producir la inmunoprecipitación. Finalmente, tras lavar, la elución se llevó a cabo con una solución de glicina 50 mM (pH 2.8) y el pH del eluido resultante se equilibró con PBS para el posterior análisis por cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

#### 4.28. LC-MS/MS e identificación de proteínas

Los eluidos resultantes de la inmunoprecipitación, se sometieron a precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y acetona cuyo resultado se resuspendió en una solución de RapiGest al 0,2% en bicarbonato amónico 50 mM. Se añadió DTT a una concentración final de 5 mM y se incubó durante 30 minutos a 60 °C. A continuación, se añadió cloroacetamida a una concentración final de 10 mM y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Seguidamente se realizó una digestión con tripsina durante una noche a 37 °C en una proporción de 1:40 de tripsina:proteína. Al día siguiente, la tripsina se inactivó con ácido fórmico y se añadió acetonitrilo hasta una concentración final del 2%. El volumen de inyección fue de 10 µL por serie.

Los análisis LC-MS/MS se realizaron en un sistema TOF (5600 Plus, Sciex) de triple cuadrupolo equipado con una fuente de nano electrospray acoplada a un nanoHPLC *Eksigent*. Se utilizó el programa *Analyst TF 1.7* para el control del equipo y la adquisición y procesamiento de datos. En primer lugar, los péptidos se cargaron en una "columna trampa" (*Acclaim PepMap 100 C18*, 5 µm, 100 Å, 100 µm id × 20 mm, Thermo Fisher) de forma isocrática en una solución de ácido fórmico al 0,1% y 2% de acetonitrilo (v/v) a un flujo de 3 µL/min durante 10 minutos. A continuación, se eluyeron en una columna analítica de fase inversa (*Acclaim PepMap 100 C18*, 3 µm, 100 Å, 75 µm id × 150 mm, Thermo Fisher) acoplada a un "emisor PicoTip" (F360-20-10-N-20\_C12, *New Objective*). Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de 2-35% (v/v) de disolvente B durante 60 minutos a un flujo de 300 nL/minuto. Los disolventes A y B fueron ácido fórmico al 0,1% (v/v) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% (v/v), respectivamente. El voltaje de la fuente se seleccionó a 2600 V y la temperatura del calentador se mantuvo a 100 °C. El gas 1 fue seleccionado a 15 psi, el gas 2 a cero y el gas cortina a 25 psi. Para la identificación de proteínas, la adquisición se llevó a cabo con un método dependiente de datos (DDA) consistente en un TOF-MS con una ventana de barrido de 400-1250 m/z, tiempo de acumulación de 250 ms, seguido de 50 MS/MS con una ventana de barrido de 230-1500 m/z, tiempo de acumulación de 65 ms y un tiempo de ciclo total de 3,54 segundos.

Para la identificación de proteínas, se utilizó el programa *ProteinPilot* (v5.0.1, Sciex) con el método Paragon, con tripsina como enzima y yodoacetamida (IAA) como agente alquilante de cisteínas utilizando el proteoma de referencia del ratón (*Mus musculus*) descargado de uniprot.org (02/2021) en formato FASTA, fusionado con los contaminantes Sciex. Se realizó un análisis de falsos positivos y las proteínas con FDR (*False Discovery Rate*) inferior al 1%.

#### **4.29. Secuenciación del transcriptoma completo por clonación al azar (RNA-Seq)**

Los análisis de RNA-Seq fueron realizados por la Unidad de Genómica de CABIMER (Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa). Se tomaron cultivos celulares de SIM-A9 silvestres y MOK-KO a los que se les retiró el sobrenadante y se les realizaron 2 lavados con PBS, tras los que se realizó la extracción de ARN mediante *RNeasy Mini Kit* (#74104, Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras de ARN fueron cuantificadas mediante *Qubit RNA HS Assay Kit* y tanto el tamaño de las muestras como la integridad de las mismas fue analizado con el sistema *Bioanalyzer 2100* (Agilent). La calidad del ARN fue calificada de “excelente” y la integridad estimada para todas las muestras oscilaba entre 9,7 y 10,0. Tras la eliminación del ARN ribosómico, siguiendo las indicaciones del fabricante se generó la biblioteca de ADN complementario (ADNc) con especificidad de hebra (*strand-specific*) mediante *Stranded TOTAL RNA prep Ligation* junto a *RIBO-ZERO PLUS kit* (Illumina). Tras la amplificación mediante PCR, se realizaron todos los controles de calidad necesarios. La librería generada se normalizó usando *Qubit* y el control de calidad se realizó de nuevo con *Bioanalyzer 2100*. Todas las librerías fueron mezcladas en proporciones equimolares a una concentración de 1,2 nM aproximadamente. Esta mezcla de librerías fue desnaturalizada y seguidamente diluida previamente antes de ser sometida a secuenciación. La secuenciación de extremos pareados se realizó utilizando *NovaSeq6000 SP y 2x50bp* (Illumina), generando un recuento de lecturas brutas de >68 millones de lecturas por muestra. La calidad de la secuenciación, que fue evaluada con el software *BaseSpace Hub* (Illumina), fue de 89,8% >Q30 y >106 Gb de profundidad y considerada como alta.

Para el caso de los análisis de RNA-Seq mensajeros (mRNA-Seq) de cultivos de microglía primaria, el procedimiento fue similar al descrito, pero con los siguientes cambios. El ARN mensajero fue purificado mediante partículas recubiertas de *Poly-dT* y la librería generada con *TruSeq Stranded mRNA kit* (Illumina). Tras la amplificación de la librería por PCR y la realización de los controles de calidad necesarios, las librerías fueron mezcladas en proporciones equimolares y diluidas a unos 1,4 pM. La secuenciación por pares se realizó con *NextSeq 500 Mid Output y 2x75pb* (Illumina), generando un recuento de más de 24 millones de lecturas por muestra. La calidad de la secuenciación se evaluó con el software *BaseSpace Onsite* (v. 3.22.91.158, Illumina) resultando en una calidad alta (88% >Q30 y >24 Gb de profundidad).

#### **4.30. Procesamiento de datos de RNA-Seq y mRNA-Seq**

Se generaron datos de secuenciación de RNA-Seq a partir de cuatro tratamientos celulares con 3 réplicas biológicas cada uno (12 muestras en total), utilizando el método de extremos emparejados de Illumina. Los archivos *fastq* de extremos emparejados totales se utilizaron para el análisis de RNA-Seq mediante el flujo de trabajo: *FastQC-Trimomatic-STARFeatureCounts-DESeq2*. La versión 2.7.9a de *STAR aligner* fue usada para realizar el alineamiento y mapeo del genoma de referencia, la cual era la última versión de la base de datos de genoma de ratón publicado en *ENSEMBL* (*Mus musculus*). Para la extracción de todos los recuentos de las lecturas en bruto de cada una de las muestras se utilizó el paquete de *R Rsubread* (v. 2.0.1.) con el módulo *Counts*. Seguidamente se utilizaron dichos datos para realizar análisis de expresión diferencial mediante el paquete *DESeq2* (v. 1.32.0.) en *R*, cuyo análisis de resultados fue analizado por *Bencos Research Solutions Pvt. Ltd* (Thane, Maharashtra 400615, IN).

Los datos de secuenciación de mRNA-Seq se generaron a partir de dos tratamientos celulares con 3 réplicas biológicas cada uno (6 muestras en total), como se ha descrito con anterioridad, pero con los siguientes cambios: Los archivos *Fastq* se generaron con el protocolo *FASTQ Toolkit* (v1.0.0, Illumina) con filtrado, recorte y des-multiplexado de datos. El genoma de referencia fue *Mus musculus* (UCSC mm10). Se utilizó *Cufflinks Assembly & DE, BaseSpace Workflow* (v. 2.1.0, Illumina) para realizar el análisis de expresión diferencial.

#### 4.31. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes. Ontología génica (GO), enriquecimiento de vías e *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA)

Para cada grupo de comparación de la línea celular SIM-A9 (WT, WT+LPS, MOK-KO, MOK-KO+LPS), se realizaron análisis de ontología génica y enriquecimiento de vías utilizando el paquete de R *PathfindR* (v1.6.2). Todos los genes expresados diferencialmente (DEGs) obtenidos tras aplicar el filtro de valores  $\text{Log}_2 \text{ Fold Change} > 2$  ó  $< -2$  junto con un valor  $p < 0,05$  se utilizaron como entrada para realizar el enriquecimiento para las siguientes categorías: GO Proceso Biológico, GO Componente Celular, GO Función Molecular y *KEGG Pathway* con análisis realizados por *Bencos Research Solutions Pvt. Ltd.* (Thane, Maharashtra, India). Se aplicó el *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) a los DEGs definidos anteriormente.

#### 4.32. Marcaje S4U y análisis de SLAM-Seq

Tras el pretratamiento con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de polimixina B, las células de la línea SIM-A9 en cultivo se incubaron con 10  $\mu\text{M}$  de C13 (o DMSO) durante 1 hora. A continuación, se añadió una décima parte del volumen de medio sin suero que contenía TDP-43 o agregados señuelo (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  final) y se incubó durante 2,5 horas. Tras ello, se añadió 4-tiouridina (S4U, *Cayman Chemical*, #16373) a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  (concentración a la cual hemos observado que mantiene el 80% de la viabilidad de las células mediante ensayo MTT a las 2 horas) y se incubó durante otros 90 minutos en condiciones de oscuridad. Tras lavar con PBS, se extrajo el ARN total con *easy-BLUE* (*iNtRON Biotechnology*) y se protegió de la luz durante el procedimiento para evitar la unión de puentes disulfuro (S-S). Se utilizaron 5  $\mu\text{g}$  de ARN para las modificaciones SLAM-seq. La yodoacetamida (Sigma I1149) fue conjugada con 4SU en un buffer fosfato 50 mM pH 8.0 en DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1). La reacción se detuvo con DTT y el ARN se reprecipitó con etanol y NaOAc. Las librerías se prepararon utilizando *Quantseq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit* (Lexogen). El análisis SLAM-Seq se realizó de forma similar a la descrita anteriormente por Neumann (T. Neumann et al., 2019).

#### 4.33. Muestras humanas

Las muestras de la médula espinal humana se obtuvieron gracias a la donación voluntaria del Banco de Cerebros de la Región de Murcia (BCRM) por pacientes diagnosticados de ELA esporádica. Como control se usaron pacientes sin antecedentes de enfermedades neurológicas donadas nuevamente por el BCRM y de edades equivalentes. La recolección de muestras en el BCRM cumplió con los estándares éticos institucionales: IMIB-Arrixaca e ISCIII National Biobank Network Review Boards aprobaron el protocolo (anonimización/custodia/conservación en muestras de control y custodia/conservación de las muestras de pacientes) necesarias para la aprobación del ensayo clínico (NCT00855400, EudraCT 2006-00309612), así como la declaración de Helsinki de 1964 y sus modificaciones posteriores o normas éticas comparables. Antes de la extracción de la médula espinal, se realizó exploración *in situ* para detectar posibles malformaciones anatómicas. Se incluyeron segmentos en serie transversales de 1,0 cm en parafina, se cortaron a 7  $\mu\text{m}$  y se montaron en 10 series paralelas para inmunohistoquímica.

#### 4.34. Modelos animales

Los ensayos con ratones transgénicos de TDP-43 se realizaron con ratones Prp-TDP43<sup>A315T</sup>, el cual es un modelo de ELA y DFT previamente descrito en la bibliografía (Chennampally et al., 2021). Como control se utilizaron ratones silvestres de edades similares. De estos ratones se obtuvieron cortes de médula espinal, tanto lumbar como sacra a los que se realizó inmunohistoquímica como se ha descrito.

También se utilizó el modelo de ELA de ratón transgénico B6SJL-TgN (SOD1-G93A) 1Gur/J (Jackson Laboratory, EE. UU.) que porta el gen humano de SOD1 con la mutación puntual G93A. Estos animales fueron emparejados a ratones silvestre sin la mutación como control y fueron mantenidos en las instalaciones de la unidad de recursos biológicos de CABIMER, en ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, en cajas de 4 a 8 animales con temperatura (22 °C) y humedad constante (60%), y con alimentación y agua *ad libitum*. Todos los animales usados en la experimentación fueron genotipados para asegurar la mutación en SOD1 y el número de copias. Al momento del destete, los ratones

fueron marcados en la oreja y separados en cajas según sexo. El tejido retirado en el marcaje fue utilizado para genotipar mediante RT-qPCR. Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con una mezcla de ketamina (100 mg/kg de la masa del ratón) y xilazina (10 mg/kg de la masa del ratón). Todos los experimentos se realizaron bajo los protocolos institucionales aprobados por CABIMER para el cuidado y uso de animales de laboratorio, con comités éticos nº 25-2010 y 02-2016 y cumplieron con la legislación nacional y de la Unión Europea (RD 53/2013 y Directiva UE 2010/63) para la protección de los animales utilizados con fines científicos.

#### **4.35. Análisis de imágenes mediante inmunohistoquímica**

Para el análisis de las cortes de médula espinal de ratones Tg<sup>TDP43</sup> o control y de pacientes ELA-E o sanos tras la tinción por inmunohistoquímica como se ha descrito, se usó el programa *ImageJ*. Con este fin, se tomaron un promedio de 8 campos de cada médula espinal con una magnificación 40X a las que se les realizó una deconvolución que permitiese separar los marcajes siguiendo un vector hematoxilina-diaminobencidina (H-DAB). Se definió el umbral mínimo que discierne el ruido de fondo de la señal para todas las imágenes de cada experimento, seleccionando 5 regiones al azar de 4 campos diferentes sin células. Tras ello, se analizó el tamaño celular y la intensidad de señal de todas las células presentes en cada imagen analizada (al menos 50 células por condición experimental que presentasen un núcleo visible y diferenciado) expresando la intensidad de señal en unidades arbitrarias (AU) y en  $\mu\text{m}^2$  el área. En el caso de las imágenes correspondientes a pacientes de ELA, las poco frecuentes células de mayor tamaño correspondientes a un área mayor a  $110 \mu\text{m}^2$  fueron excluidas del análisis.

#### **4.36. Análisis de imágenes mediante inmunofluorescencia**

Las imágenes de inmunofluorescencia de cultivos organotípicos fueron analizadas con el software *Metamorph Offline* (versión 7.5.1.0, *MDS Analytical Technologies*). Para ello, se tomaron 10 imágenes RGB de cada condición experimental que se procesaron para separar las señales y convertirlas en canales diferentes y monocromáticos para posteriormente transformarlas



aritméticamente en imágenes de 16 *bits*. Finalmente, se analizó la intensidad de cada señal respecto al ruido de fondo de las imágenes.

#### 4.37. Alineamiento de secuencias de ADN

El alineamiento de secuencias para comprobar los cambios introducidos mediante ingeniería CRISPR/Cas9 en células SIM-A9 se realizó mediante la herramienta online Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

#### 4.38. Análisis estadístico

Los datos se presentan como medias  $\pm$  S.E.M. de N experimentos independientes, a menos que se indique lo contrario. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba *post hoc* de Tukey, o la prueba t-Student en el programa *GraphPad Prism* (v.8), con una o dos colas, según se indica en la leyenda de la figura correspondiente. Los valores de *p* iguales o inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

**Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios usados.**

Anticuerpo	Huésped	Fabricante	Referencia	Aplicación	Dilución
Anti-fosfo-Ser/Thr	Conejo	Abcam	Ab17464	Co-IP	1:100
Anti-MOK	Conejo	Abxexa	Abx129598	WB, IHC	1:1000
Anti-bpMOK (pThr159+pTyr161)	Conejo	StressMarq Biosciences	SPC-1030	IF, FC, IHC, WB	1:250
Anti-Brd4	Conejo	Bethyl	A301-985A100	WB, ChIP	1:1000
Anti-fosfo-Brd4 (Ser492)	Conejo	Millipore	ABE1451	IF, WB	1:500
Anti-IgG no inmunógena	Conejo	Sigma-Aldrich	I5006	ChIP, Co-IP	1:1000
Anti-GAPDH	Ratón	Millipore	MAB-374	WB	1:2500
Anti- $\alpha$ -tubulina	Ratón	Sigma-Aldrich	T6199	WB	1:6500
Anti-IL-18	Conejo	Mybiosource	MBS559603	WB	1:1000
Anti-p65	Conejo	Cell Signaling	3034	WB	1:1000
Anti-fosfo-p65	Conejo	Thermo Scientific	PA5-17782	WB	1:1000
Anti-histona H2A.X	Conejo	Abcam	Ab11175	ChIP	1:1000
Anti-FLAG, APC conjugado	Ratón	Abcam	Ab72569	FC	1:40
Anti-IL-6, PE conjugado	Rata	BD Biosciences	AB_395267	FC	1:40

Anti-ISLET	Conejo	SAB	38866	IF	1:200
Anti-CD11b, APC conjugado	Rata	BD Biosciences	553312	FC	1:200

**Leyenda tabla 3.** WB: Western blot, IF: inmunofluorescencia, ChIP: inmunoprecipitación de cromatina, Co-IP: co-inmunoprecipitación, IHC: inmunohistoquímica, FC: citometría de flujo.

**Tabla 4. Lista de anticuerpos secundarios usados.**

Anticuerpo	Huésped	Fabricante	Referencia	Aplicación	Dilución
Anti-IgG de conejo HRP-conjugado	Cabra	Pierce	31460	WB	1:10000
Anti-IgG de ratón HRP-conjugado	Cabra	Pierce	32430	WB	1:2500
Alexa Fluor488 anti-IgG de conejo	Burro	Thermo-Fisher	A-21206	IF	1:1000
Alexa Fluor594 anti-IgG de conejo	Burro	Thermo-Fisher	A-21207	IF	1:800
Alexa Fluor647 anti-IgG de ratón	Burro	Thermo-Fisher	A-31571	IF	1:1000

**Leyenda tabla 4.** WB: Western blot, IF: inmunofluorescencia.

**Tabla 5. Lista de buffers usados en ChIP.**

<b>Buffer de crosslinking</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM Hepes pH 8.0</li> <li>• 0,1 M NaCl</li> <li>• 1 mM EDTA pH 8.0</li> <li>• 0,5 mM EGTA</li> <li>• 1% formaldehido (añadido al momento de usar)</li> </ul>
<b>Buffer de lisis 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 mM Pipes pH 8.0</li> <li>• 85 mM KCl</li> <li>• 0,5% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich)</li> <li>• Inhibidores de proteasas (añadido al momento de usar)</li> </ul>
<b>Buffer de lisis 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1% SDS</li> <li>• 10 mM EDTA</li> <li>• 50 mM Tris-HCl pH 8.1</li> <li>• Inhibidores de proteasas (añadido al momento de usar)</li> </ul>
<b>Buffer de inmunoprecipitación (IP)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,01% SDS</li> <li>• 1,1% Tritón X-100</li> <li>• 1,2 mM EDTA</li> <li>• 16,7 mM Tris-HCl</li> <li>• 167 mM NaCl</li> </ul>
<b>Buffer de lavado 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1% SDS</li> <li>• 1% Tritón X-100</li> <li>• 2 mM EDTA</li> <li>• 20 mM Tris-HCl pH 8.1</li> <li>• 150 mM NaCl</li> </ul>
<b>Buffer de lavado 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1% SDS</li> <li>• 1% Tritón X-100</li> <li>• 2 mM EDTA</li> <li>• 20 mM Tris-HCl pH 8.1</li> <li>• 500 mM NaCl</li> </ul>
<b>Buffer de lavado 3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,25 mM LiCl</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1% NP-40</li> <li>• 1% deoxicolato de sodio</li> <li>• 1 mM EDTA</li> <li>• 10 mM Tris-HCl pH 8.1</li> </ul>
<b>Buffer TE 1X</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 mM EDTA</li> <li>• 10 mM Tris-HCl pH 8.1</li> </ul>
<b>Buffer de elución</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1% SDS en buffer TE 1X</li> </ul>

**Tabla 6. Lista de oligonucleótidos para qPCR y PCR**

Nombre del oligonucleótido	Secuencia sentido	Secuencia anti-sentido
<b>MOK1</b>	5'-GTTCTACGAGATTGCCAGCCT-3'	5'-CTGCTTTCTGCCTTCCTGTGAGA-3'
<b>HPRT1</b>	5'-GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC-3'	5'-CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA -3'
<b>IL-6</b>	5'-TCCGGAGAGGAGACTTCACA-3'	5'-TTCTGCAAGTGCATCATCGT-3'
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	5'-GCCTCTTCTCATTCTGCTTG-3'	5'-CTGATGAGAGGGAGGCCATT-3'
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	5'-CGAAGACTACAGTTCTGCCATT-3'	5'-GACGTTTCAGAGGTTCTCAGAG-3'
<b>IRF7</b>	5'-GGTCGTAGGGATCTGGATGA-3'	5'-ACCTTATGCGGATCAACTGG-3'
<b>IFN<math>\beta</math></b>	5'-CCACCAGCAGACAGTGTTC-3'	5'-GAAGATCTCTGCTCGGACCA -3'
<b>IL-6_prom</b>	5'-TGTGGGATTTTCCCATGAGT-3'	5'-TGCCTTCACTTACTTGCAGAGA-3'
<b>TNF<math>\alpha</math>_prom</b>	5'-GGACTAGCCAGGAGGGAGAA-3'	5'-TGTCTTTTCTGGAGGGAGATGT-3'
<b>IFN<math>\beta</math>_prom</b>	5'-GCCAGGAGCTTGAATAAAATG-3'	5'-CTGTCAAAGGCTGCAGTGAG-3'
<b>MOK_Geno</b>	5'-TCTCCTGAATGCTGGGTTTCC-3'	5'-TCACGTCTCTGTGAAAGATCCC-3'



# RESULTADOS

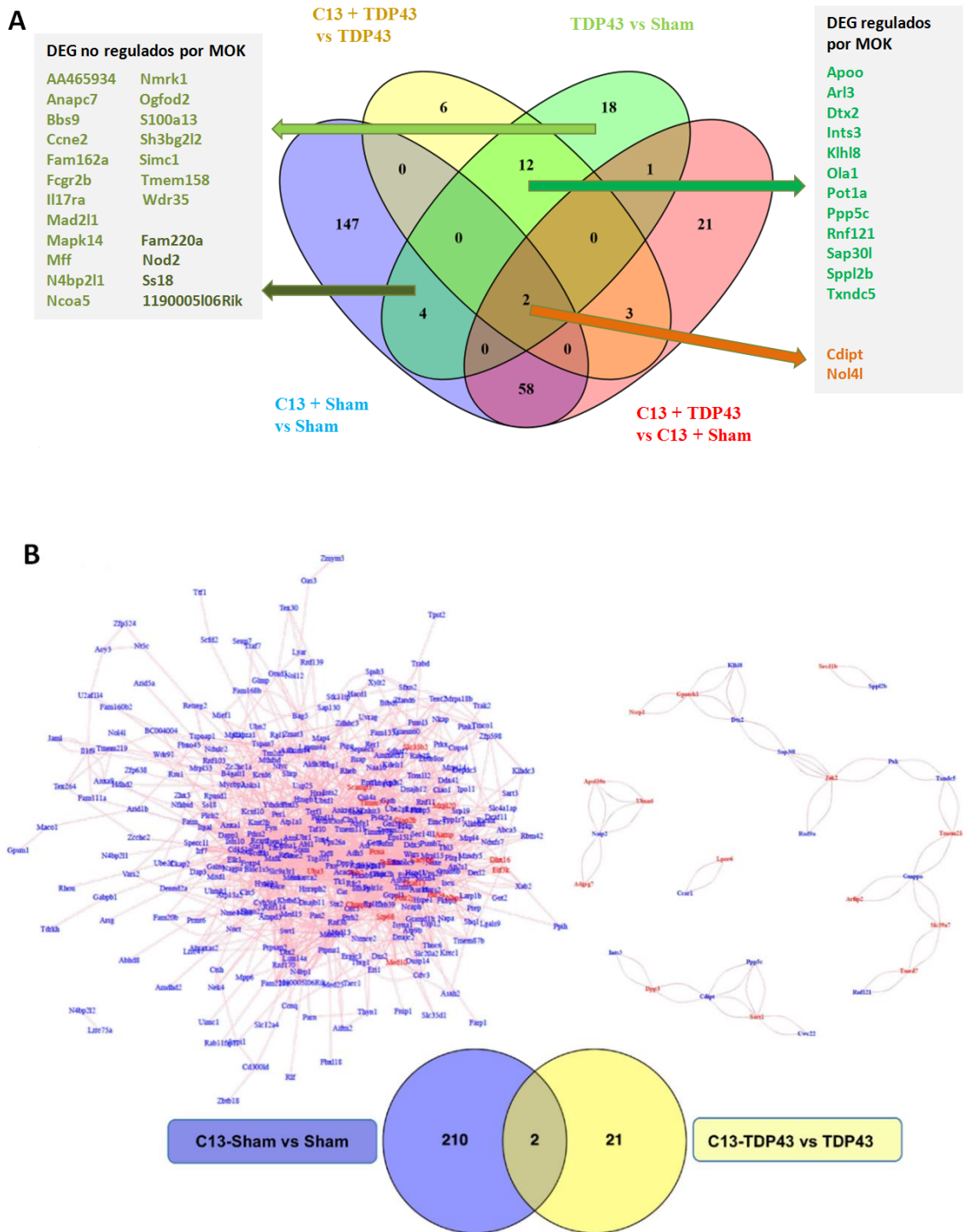
---



## 5. Resultados

### 5.1. Relación entre agregados de TDP-43 y mecanismos regulatorios mediados por MOK en microglía

En primer lugar, para poder evaluar si la proteína MOK se encuentra involucrada en un contexto patológico de ELA, como es el ampliamente descrito fenómeno de agregación de TDP-43 (Mejzini et al., 2019; M. Neumann et al., 2006), se realizó un análisis de SLAM-Seq con el objetivo de poder detectar cambios inmediatos en la síntesis de ARN en células microgliales bajo dicha exposición y cómo esta síntesis es alterada por la inhibición de la quinasa MOK. Para ello, se tomaron cultivos de la línea celular de microglía SIM-A9 silvestre, expuestas a agregados de TDP-43 (TDP43) o controles negativos de agregados que no contienen TDP-43 (Sham), con o sin el pretratamiento con el compuesto C13 descrito anteriormente (Comp13/C13) (Garske et al., 2011). De esta forma, se sembraron células microgliales murinas SIM-A9 a las que tras 24 horas en cultivo se les realizó un pretratamiento con C13 a una concentración de 10  $\mu$ M, o cantidades similares de DMSO (compuesto usado como vehículo para C13) durante 1 hora, para posteriormente exponerlas durante 4 horas a 5  $\mu$ g/mL de agregados de TDP-43 o Sham. Los resultados obtenidos manifiestan un patente cambio en la transcripción inmediata debido al pretratamiento con C13 en un importante número de genes (**Fig. 7 y Fig. 8**).

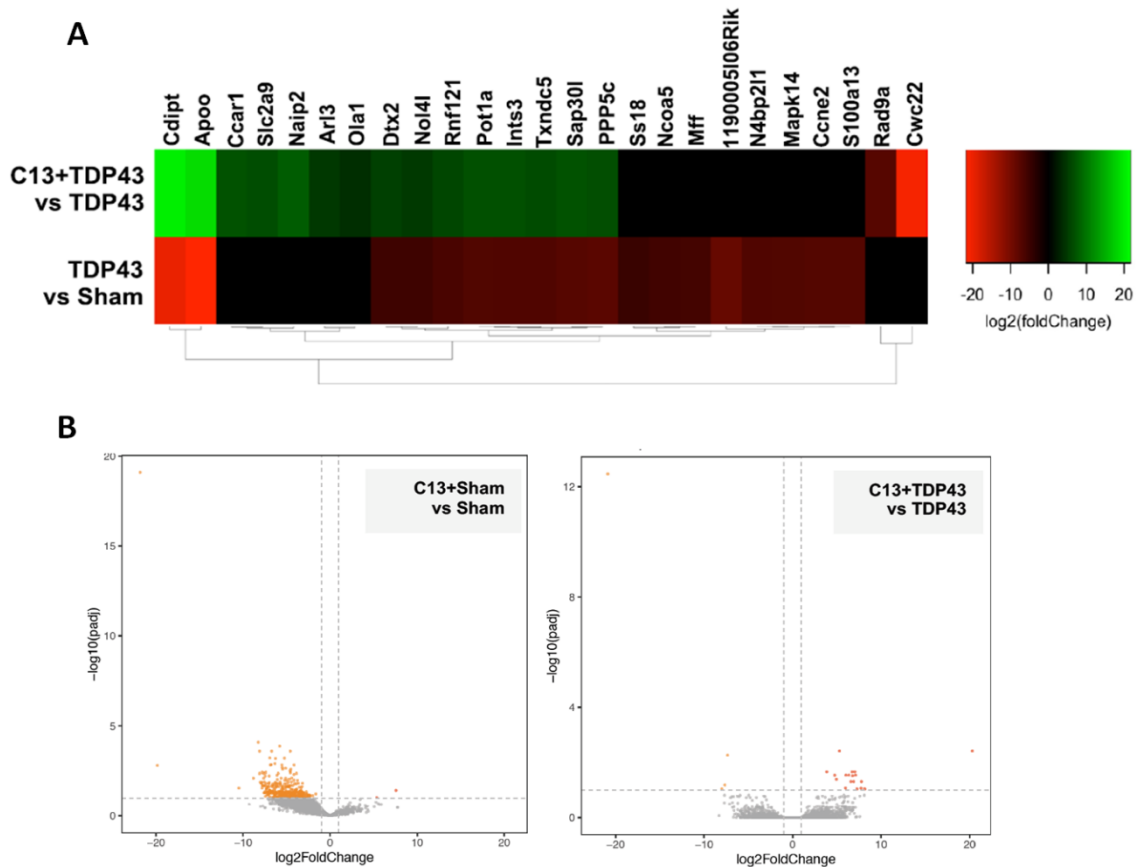


**Fig. 7. C13 promueve cambios en la transcripción temprana en células microgliales en el modelo de agregación de TDP-43 (parte I).** **A.** Diagrama de Venn mostrando el total de genes diferencialmente expresados (DEG) resultante de SLAM-Seq de células SIM-A9 tras la estimulación con 5  $\mu\text{g/mL}$  de agregados de TDP-43 o Sham durante 4 horas y previo tratamiento de una hora con 10  $\mu\text{M}$  de C13 o su vehículo (DMSO). Los resultados mostrados son correspondientes a 3 experimentos independientes ( $N = 3$ ). Para las comparaciones “C13+Sham vs. Sham” y “C13+TDP43 vs. C13+Sham” se tomó un valor de  $p$  ajustado menor de 0,05 ( $p_{\text{Adj.}} < 0,05$ ), mientras que para las comparaciones “TDP43 vs. Sham” y “C13+TDP43 vs. TDP43” fue menor de 0,1 ( $p_{\text{Adj.}} < 0,1$ ). Las listas de DEGs “Regulados por MOK” y “No regulados por MOK” fueron generadas con los genes que sufrían cambios bajo la exposición a



agregados de TDP-43. **B, Inferior.** Diagrama de Venn mostrando el número de DEGs identificados por Slam-Seq en cultivos de SIM-A9 estimulados como se ha descrito (N = 3). Para las condiciones mostradas, “C13+Sham vs. Sham” y “C13+TDP43 vs. TDP43” se tuvieron en cuenta genes con un  $p$  ajustado menor de 0,05 ( $p_{Adj.} < 0,05$ ) o menor de 0,10 ( $p_{Adj.} < 0,10$ ), respectivamente. **B, Superior.** Predicción de redes basadas en los dos sets de datos indicados mediante GeneMANIA, donde los rótulos azules corresponden a DEGs y las rojas a genes inferidos.

De manera interesante, dicha inhibición mostró un significativo cambio en los genes diferencialmente expresados (DEGs), además de verse afectadas las redes de interacción estimadas bajo el contexto de estimulación generado por los agregados de TDP-43 frente a Sham (**Fig. 7**). Es llamativo que en torno al 45% de los DEGs revelados bajo la estimulación de los agregados de TDP-43 dejan de expresarse diferencialmente ante el tratamiento por C13, insinuando una participación de MOK en los procesos microgliales suscitados por los agregados de TDP-43 (**Fig. 8**). Esta regulación diferencial en la expresión génica entre ambas comparaciones indica un efecto de C13 y la consecuente inhibición de MOK en el perfil transcripcional de las células microgliales tras la exposición a dichos agregados de TDP-43.

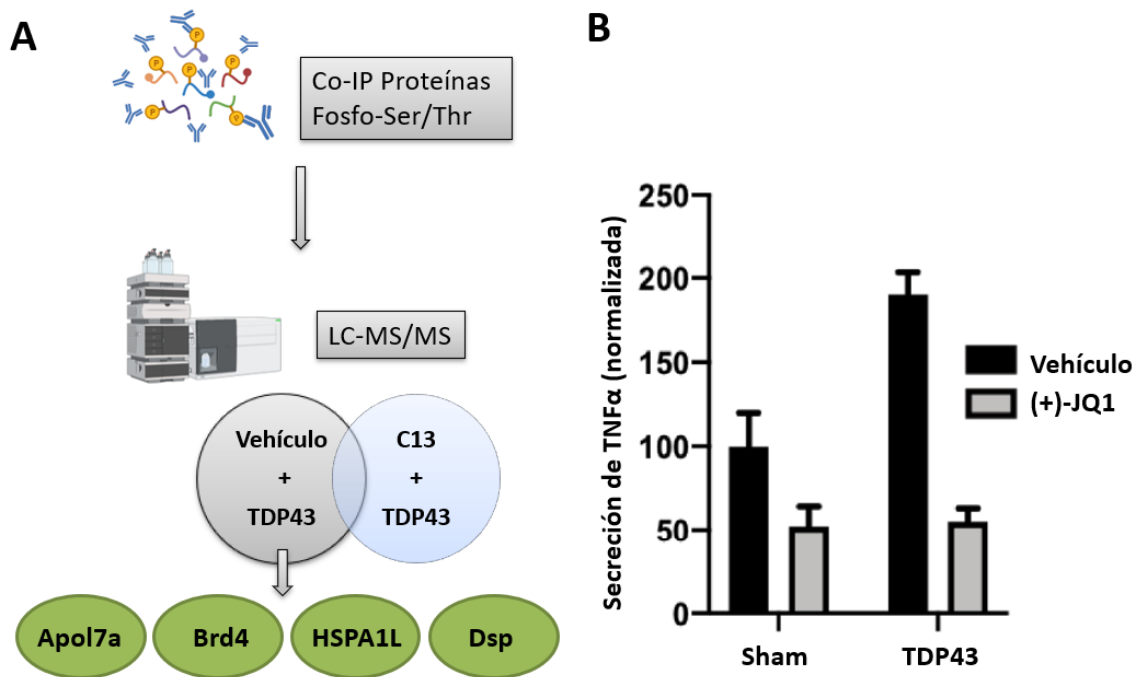


**Fig. 8. C13 promueve cambios en la transcripción temprana de células microgliales en el modelo de agregación de TDP-43 (parte II).** **A.** Representación mediante mapa de calor (*heatmap*) de los perfiles de expresión relativos de los tratamientos “TDP43 vs. Sham” y “C13+TDP43 vs. TDP43”, tomando un  $p$  ajustado menor de 0,05 ( $p_{Adj.} < 0,05$ ) en ambos casos. **B.** Gráfico de volcán (*volcano plot*) representando a los DEGs de las comparaciones “C13+Sham vs. Sham” y “C13+TDP43 vs. TDP43” ( $p_{Adj.} < 0,05$ ). Para ambas figuras, las estimaciones corresponden a las descritas en la figura anterior (N = 3).

Tras ello, para detectar posibles proteínas cuyo estado de fosforilación pudiera estar regulado por la quinasa MOK en un contexto de ELA, se procedió a realizar una co-inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en residuos de serina/treonina utilizando un anticuerpo anti-fosfo-Ser/Thr. Para ello, se tomaron células de microglía primaria sometidas a estimulación con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de agregados de TDP-43 durante 24 horas y pretratados o no con 10  $\mu\text{M}$  del inhibidor de MOK o su vehículo, como se ha descrito anteriormente. Una vez se obtuvieron los eluidos inmunoprecipitados a partir de las células lisadas, las muestras fueron sometidas a cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), lo que permitió identificar una serie de proteínas, algunas de ellas exclusivamente en la ausencia del inhibidor de

MOK (**Fig. 9A**). Entre ellas, la apolipoproteína 7a (Apo17a), la proteína de choque térmico 1L de 70 kDa (HSPA1L), desmoplaquina (DSP) y Brd4, teniendo esta última un creciente interés e implicación en procesos inflamatorios en microglía revisados en apartados anteriores (DeMars et al., 2018; H. Wang et al., 2018; J. Wang et al., 2019).

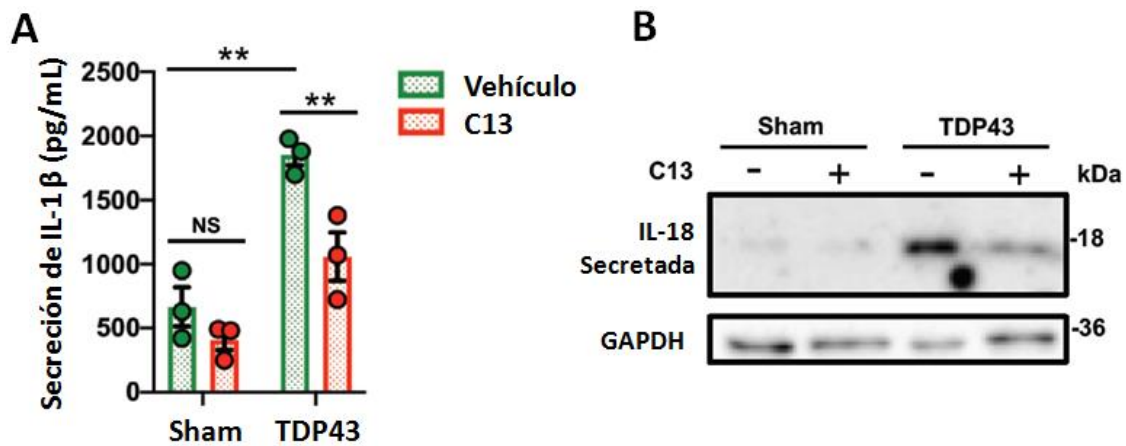
Para identificar y cerciorar la participación de Brd4 en el contexto de inmunomodulación y activación de microglía de nuestro modelo, nuevamente bajo la estimulación de dichos agregados de TDP-43 o Sham durante 16 horas, se realizó un pretratamiento durante 1 hora con 10  $\mu$ M del inhibidor específico de la familia de proteínas BET, JQ1 (H. Wang et al., 2018) o DMSO (usado como vehículo), valorándose posteriormente mediante ELISA los niveles de TNF $\alpha$  extracelulares secretados por la microglía primaria (**Fig. 9B**). Con ello, se observa que efectivamente la liberación de citoquinas propiciada por los agregados de TDP-43 se ve indudablemente suprimida bajo la inhibición de Brd4 por JQ1 en células primarias de microglía, revelando la implicación del lector epigenético en este modelo de ELA. Recapitulando y teniendo en cuenta todos estos resultados, se observan indicios de que MOK juega un papel en la modulación de las respuestas inflamatorias microgliales inducidas por la agregación de TDP-43 y que, posiblemente, regula la fosforilación de ciertas proteínas, entre ellas Brd4, con un significativo rol en la respuesta inmune.



**Fig. 9. Identificación de Brd4 como posible diana regulada por MOK a través de su estado de fosforilación.** **A.** Proteínas identificadas y esquematización del análisis por LC-MS/MS de los eluidos obtenidos mediante ensayos de co-inmunoprecipitación con anti-fosfo-Ser/Thr (**Tabla 3**) a partir de lisados de microglía primaria expuesta a 5  $\mu$ g/mL de agregados de TDP-43, pretratados durante 1 hora con 10  $\mu$ M de C13 o DMSO (vehículo). **B.** Determinación de los niveles de TNF $\alpha$  mediante ELISA a partir de microglía primaria expuesta a 5  $\mu$ g/mL de agregados de TDP-43 (TDP43) o agregados Sham durante 16 horas, pretratados durante 1 hora con 10  $\mu$ M de (+)-JQ1 o su vehículo. Los valores mostrados se normalizaron respecto al control Sham, siendo estas medias  $\pm$  D.E. correspondiente a 2 experimentos independientes (N = 2).

## 5.2. Relevancia e implicación de MOK en la señalización de IFN tipo-I en microglía

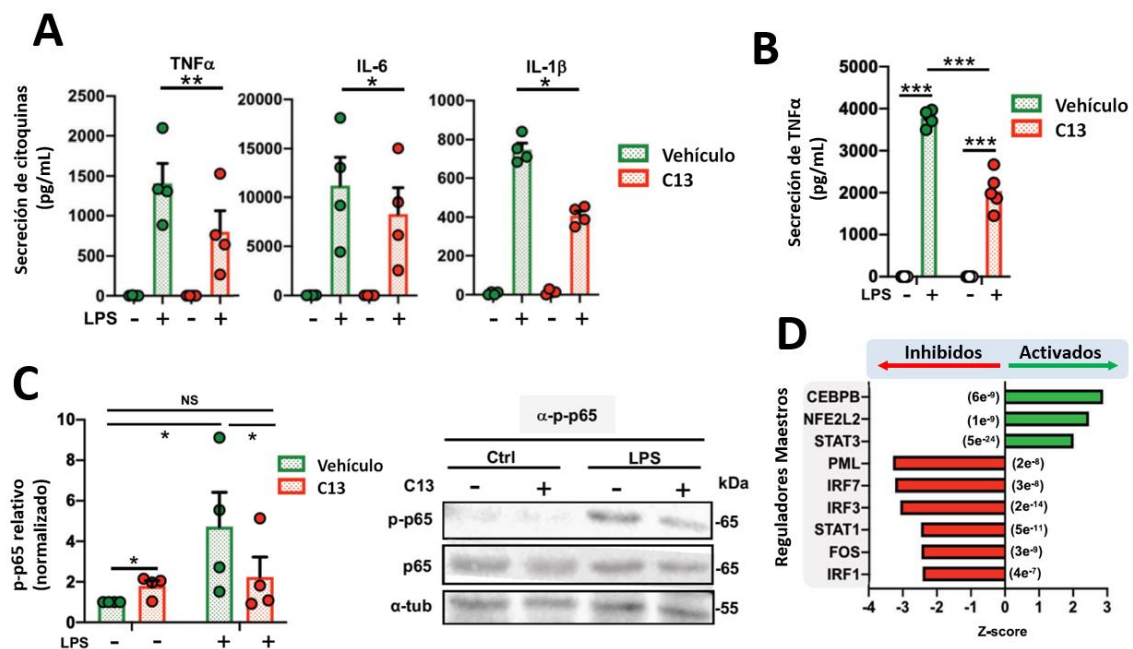
Dado que la exposición de células microgliales a los agregados de TDP-43 descritos en el contexto patológico de ELA ha mostrado activar a NLRP3 vía inflammasoma (Deora et al., 2020; Leal-Lasarte et al., 2017; Zhao et al., 2015), se procedió a valorar el impacto que puede tener la inhibición de MOK en dicha activación. Coherentemente, en microglía primaria los niveles de citoquinas dependientes del inflammasoma, como son IL-1 $\beta$  o IL-18, se ven significativamente reducidos frente al estímulo de agregados de TDP-43 cuando se realiza un pretratamiento con el inhibidor de MOK, observado por ELISA y por Western blot, respectivamente (**Fig. 10**).



**Fig. 10.** Los agregados de TDP-43 disparan la respuesta inflamatoria, que se ve atenuada por la aplicación de C13 en microglía primaria. Determinación por ELISA (N = 3) (A) y Western blot (N = 2) (B) de citoquinas liberadas al medio por células de microglía primaria estimuladas con 5 µg/mL de agregados de TDP-43 o Sham durante 16 horas, previo tratamiento por una hora con el inhibidor C13 o su vehículo (DMSO). Inmunomarcaje realizado con el anticuerpo anti-IL-18 (Tabla 3). Los datos mostrados para la figura A son medias ± S.E.M. y el test estadístico usado t-Student, no pareado y de una cola (\*\* $p < 0,01$ , NS = No significativo). La imagen B es representativa de 2 experimentos.

Con la misma idea, se procedió a comprobar el posible papel de MOK en la modulación de la respuesta inflamatoria general en microglía frente a LPS, valorando la liberación de citoquinas en condiciones de tratamiento con C13. Para ello, se tomaron células de microglía primaria que fueron pretratadas con C13 o DMSO, como se ha descrito con anterioridad, y posteriormente estimuladas o no con 1 µg/mL de LPS a diferentes tiempos (4 horas en el caso de TNF $\alpha$  o 16 horas en el caso de IL-6 e IL-1 $\beta$ ), y en cuyos sobrenadantes se determinaron las diferentes citoquinas mediante ELISA. Como resultado, todas las citoquinas sufrieron una reducción significativa en sus niveles extracelulares bajo la estimulación con LPS cuando se realiza un tratamiento previo con C13 (Fig. 11A). Paralelamente, se obtuvieron resultados similares en la línea celular SIM-A9 en cuanto a la secreción de TNF $\alpha$  frente al mismo estímulo (Fig. 11B), en las que además se observaron mediante Western blot los niveles de p65 fosforilado en la Ser<sup>536</sup> (p-p65) en dichas condiciones experimentales, observándose un incremento de p-p65 que no se replica cuando sea realiza el pretratamiento con C13, indicando la alteración de la vía NF- $\kappa$ B (Fig. 11C).

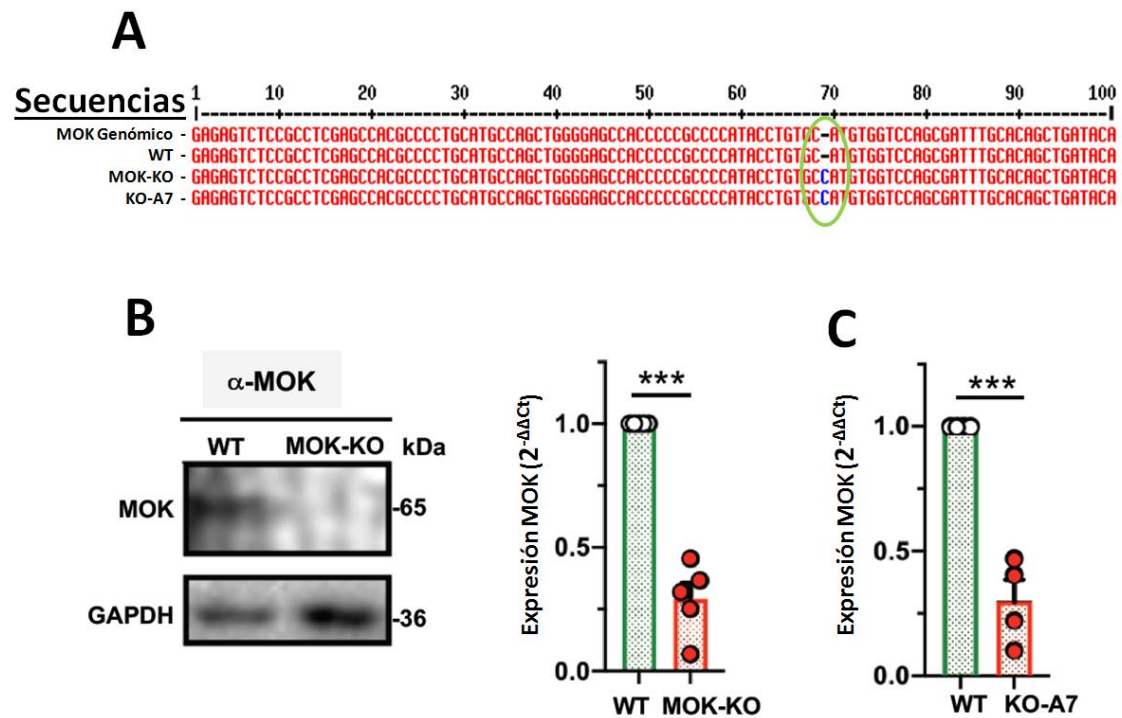
Posteriormente, para valorar los cambios transcripcionales ocurridos al realizar el tratamiento con C13, en nuevamente un contexto inflamatorio promovido por LPS, se tomaron células primarias de microglía a las que se les sometió a dicho estímulo por 5 horas, en presencia o no de pretratamiento con C13. Tras la extracción de ARN, se procedió a realizar un RNA-Seq, el cual reveló 158 DEGs. Con dichos genes se utilizó un análisis basado en *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) que permitió revelar y predecir reguladores maestros de la expresión génica. Gracias a este análisis se revelaron interesantes genes reguladores aguas arriba de MOK que se encontraban inhibidos, como *PML*, *IRF1/3/7* o *STAT1*, mientras que otros como *CEBPB*, *NFE2L2* y *STAT3*, aparecen activados en bajo el tratamiento con el inhibidor de MOK (**Fig. 11D**).



**Fig. 11. La estimulación por LPS dispara la respuesta inmune, se ve atenuada por C13 y revela reguladores maestros mediante RNA-Seq en células microgliales. A.** Determinación de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  mediante ELISA (N = 4) en sobrenadantes de células de microglía primarias estimuladas o no con 1  $\mu$ g/mL de LPS durante 5 (TNF $\alpha$ ) ó 16 horas (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) previo tratamiento con C13 (10  $\mu$ M) durante 1 hora. Se realizó un análisis de varianzas mediante el test de ANOVA unidireccional seguido por una prueba post-hoc de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  y NS = no significativo. **B.** Determinación por ELISA de TNF $\alpha$  a partir de sobrenadantes de la línea celular SIM-A9 bajo las mismas condiciones experimentales que en el apartado (A) (N = 5). **C.** Cuantificación de bandas por densitometría (izquierda) e imagen representativa de Western blot (derecha) obtenidos de lisados celulares de SIM-A9, tratados o no con 1  $\mu$ g/mL de LPS durante 5 horas, previo tratamiento con 10  $\mu$ M de C13. Los datos representan medias  $\pm$  S.E.M. normalizados respecto al control no tratado y el test estadístico usado t-Student, no pareado y de una cola (\* $p < 0,05$ , NS = No significativo) (N = 4). Inmunomarcaje realizado con los anticuerpos anti-p-p65 y anti-p65 (Tabla 3). **D.** Reguladores maestros de MOK con mejor puntuación de predicción mediante IPA a partir de

los 158 DEGs revelados mediante RNA-Seq respecto a las condiciones “C13 vs. Vehículo” ( $p_{Adj.} < 0,05$ ) en microglía primaria estimulada con LPS por 5 horas ( $N = 3$ ). Los  $p$ -valores de cada superposición se muestran entre paréntesis para cada regulador.

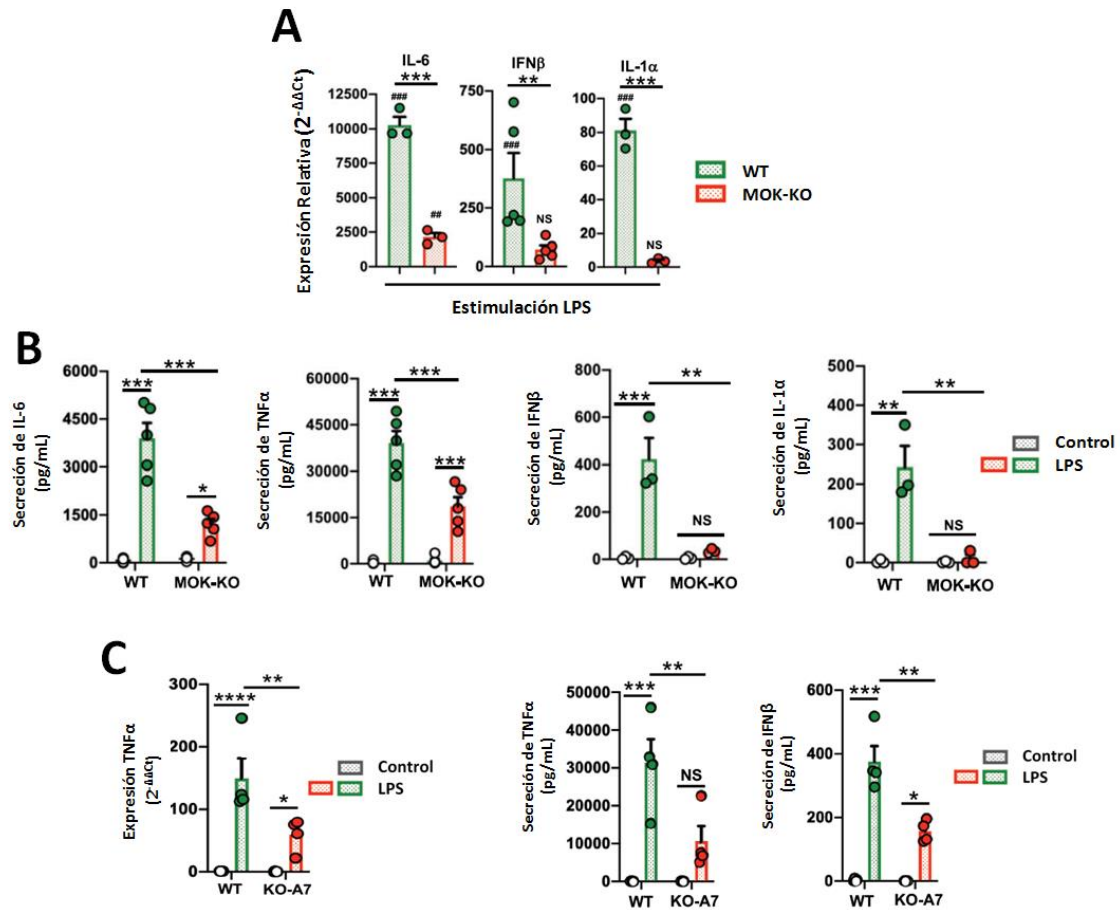
Para indagar en el papel y participación de la quinasa MOK en la respuesta inflamatoria llevada a cabo por microglía, se generaron mediante ingeniería CRISPR/Cas9 células microgliales de la línea SIM-A9 *knockout* para MOK (MOK-KO) y su correspondiente versión silvestre control (WT). Tanto el clon WT como los 2 clones *knockout* para MOK (referidos aquí como MOK-KO o KO-A7) fueron tratados y analizados como se ha descrito anteriormente en líneas SIM-A9 silvestres o cultivos primarios de microglía, a excepción de la secuenciación. En primer lugar, se secuenciaron los 3 clones (WT, MOK-KO y KO-A7) para cotejar y confirmar los cambios realizados a nivel de secuencias genómicas respecto a las secuencias de MOK genómico publicadas en bases de datos (**Fig. 12A**). Los resultados muestran la adición de una citosina localizada en el exón 5 del gen (Cromosoma 12: 110.815.136) en homocigosis que rompe la pauta de lectura normal de la proteína. Paralelamente, se analizó la expresión de MOK mediante Western blot y RT-qPCR (**Fig. 12B y C**). Por Western blot se observó en células WT una banda para MOK de aproximadamente 65 kDa de tamaño aparente –coincidiendo con lo reportado para tejido nervioso murino (T. Chen et al., 2013)– que no se observa en las células *knockout*.



**Fig. 12. Caracterización de los clones obtenidos por CRISPR/Cas9.** **A.** Alineamiento múltiple mediante la herramienta online *Multialin* de las secuencias de los clones y del ADN genómico de MOK de referencia. Se observa la adición de una citosina en el cromosoma 12:110.815.136. Para la secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos “MOK\_Geno” (**Tabla 6**). Comprobación mediante Western blot (**B, izquierda**) y RT-qPCR (**B, derecha y C**) de la expresión de MOK en los modelos de SIM-A9 silvestre (WT) y dos clones *knockout* para MOK generados por CRISPR/Cas9, MOK-KO (**B**) y KO-A7 (**C**). El inmunomarcaje de Western blot se realizó con el anticuerpo anti-MOK, revelando una banda de tamaño aparente esperado de 65 kDa (**Tabla 3**). El test estadístico realizado fue t-test, no pareado y de dos colas ( $***p < 0,001$ ).

Paralelamente, se midió y determinó la expresión de citoquinas ante el estímulo por LPS y se observó un decremento de la secreción de citoquinas como IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\beta$  e IL-1 $\alpha$  en los clones KO de MOK, valorado por RT-qPCR y ELISA (**Fig. 13**).

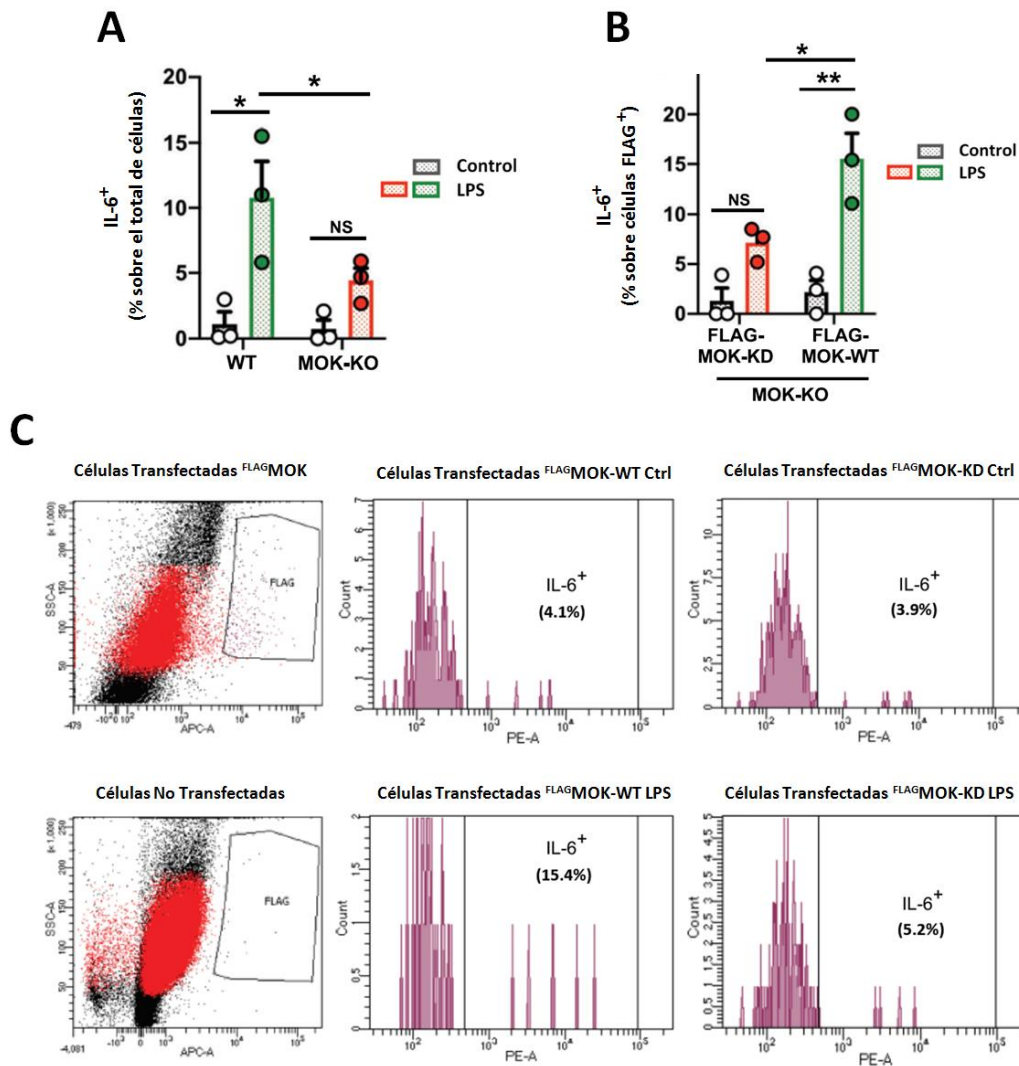




**Fig. 13. Caracterización del fenotipo inflamatorio de los clones MOK *knockout*. A.** Cuantificación por RT-qPCR de los niveles de los transcritos de diferentes citoquinas proinflamatorias (IL-6, IFN $\beta$  e IL-1 $\alpha$ ) de células de SIM-A9 WT y MOK-KO estimuladas o no con 1  $\mu$ g/mL de LPS durante 5 horas ( $N \geq 3$ ). Los datos muestran los valores de nivel de cambio (*fold-change*) relativos a condiciones de estimulación "control" no mostradas. ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , NS = no significativo, respecto a la condición no estimulada. Se realizó un análisis de varianzas mediante el test de ANOVA unidireccional seguido por una prueba post-hoc de Tukey de los datos. **B.** Determinación mediante ELISA de varias citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\beta$  e IL-1 $\alpha$ ) de sobrenadantes de células SIM-A9 WT y MOK-KO estimuladas o no con 1  $\mu$ g/mL de LPS durante 5 ó 16 horas para IL-1 $\alpha$  ( $N \geq 3$ ). Se realizó un análisis de varianzas mediante el test de ANOVA unidireccional seguido por una prueba post-hoc de Tukey para destacar diferencias significativas. **C.** Determinación por RT-qPCR del transcrito de TNF $\alpha$  (*izquierda*) y por ELISA de citoquinas TNF $\alpha$  e IFN $\beta$  (*derecha*) de cultivos celulares de SIM-A9 WT y KO-A7 estimulados o no con 1  $\mu$ g/mL de LPS durante 5 horas ( $N = 4$ ). Se realizó un análisis de varianzas mediante el test de ANOVA unidireccional seguido por una prueba post-hoc de Tukey para desvelar diferencias significativas entre condiciones. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  y NS = no significativo.

Los resultados para dichas citoquinas, que fueron similares a los descritos anteriormente usando el inhibidor C13 en microglía primaria y la línea SIM-A9 (**Fig. 11A y B**), fueron a su vez replicados mediante citometría de citoquinas intracelulares (**Fig. 14A**). Para rescatar el fenotipo inflamatorio ante estímulos

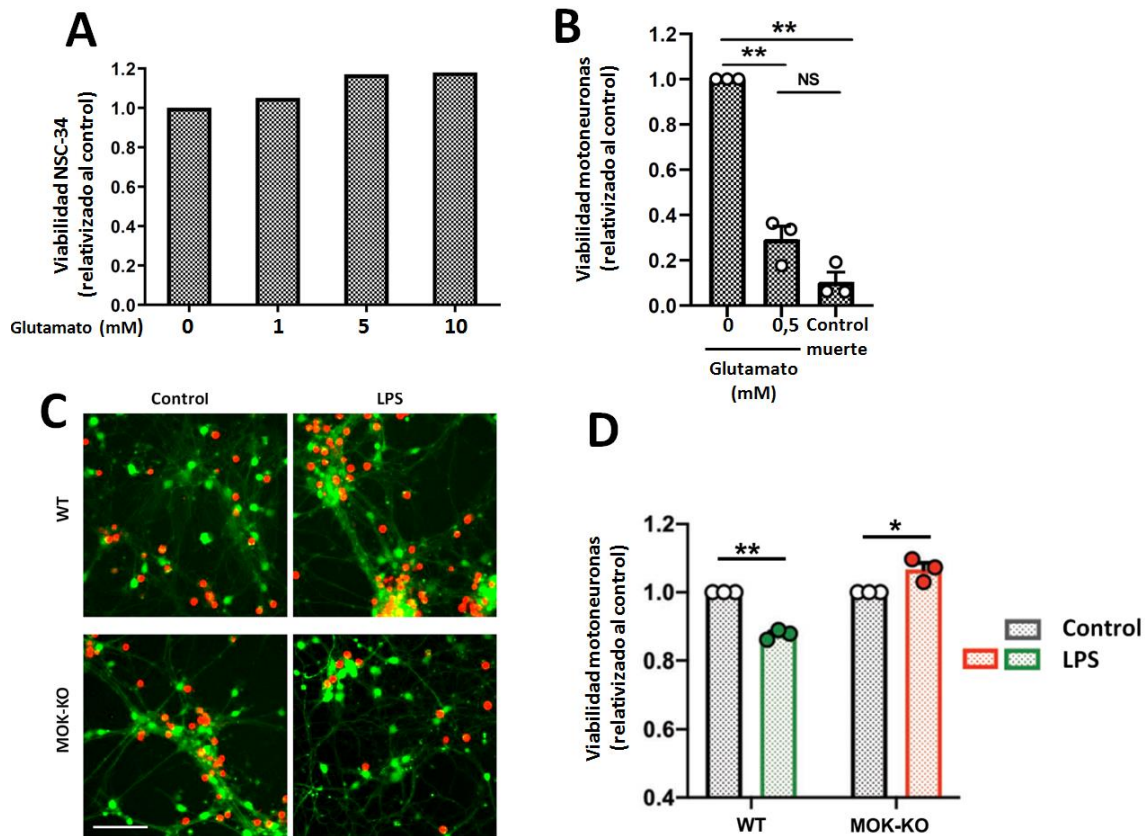
por LPS de los clones MOK-KO mediante la sobreexpresión de la proteína FLAG-MOK recombinante, se procedió a la transfección de las células MOK-KO con dos versiones diferentes de MOK (Miyata et al., 2001) y al posterior análisis de IL-6 por citometría de flujo. Por un lado, se transfectó con una versión silvestre de la quinasa MOK (MOK-WT), y por otro, con una versión mutada (*kinase-dead*, MOK-KD) de la proteína MOK carente de actividad quinasa. Ambas versiones portaban un marcaje FLAG que permitió la detección mediante citometría de flujo de células transfectadas. De esta forma, se logró la recuperación funcional del fenotipo inflamatorio bajo el efecto de LPS en los casos transfectados con la versión silvestre MOK, pero no replicándose en las transfectadas con la versión mutada (**Fig. 14B y C**). Teniendo en cuenta este resultado, todo parece indicar que la modulación realizada por MOK en las respuestas inflamatorias es llevada a cabo a través de su actividad quinasa, la cual es necesaria para el desencadenamiento de los mecanismos moleculares inflamatorios observados.



**Fig. 14. Recuperación del fenotipo inflamatorio de los clones MOK-KO mediante la sobreexpresión de MOK recombinante.** **A.** Cuantificación por citometría de flujo del porcentaje de células SIM-A9 positivas para IL-6, tanto en células WT como MOK-KO, estimuladas con 1  $\mu$ g/mL de LPS durante 5 horas (N = 3). **B.** Recuperación del fenotipo funcional inflamatorio de respuesta ante el estímulo por LPS en células transfectadas con la versión silvestre de MOK (MOK-WT), no así observable en la transfección con la versión *kinase-dead* de MOK (MOK-KD) (N = 3). El test estadístico aplicado fue t-Student, pareado y de una cola (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , NS = no significativo). **C.** Representación gráfica de puntos de las células transfectadas o no gracias al marcaje por FLAG (**C, izquierda**) y regiones consideradas positivas para la transfección de células MOK-KO con los constructos de FLAG-MOK. Los histogramas (**C, centro y derecha**) muestran las células contabilizadas como positivas para FLAG incluidas en la región marcada, bajo las condiciones de estimulación del apartado **B**. Las gráficas del apartado **C** corresponden a un experimento representativo.

Adicionalmente, para valorar el posible impacto que podría tener en la viabilidad de motoneuronas las respuestas inflamatorias alteradas por la ausencia de MOK, se buscó un modelo de excitotoxicidad y con capacidad a responder a estímulos de glutamato, fenómeno reportado extensamente en

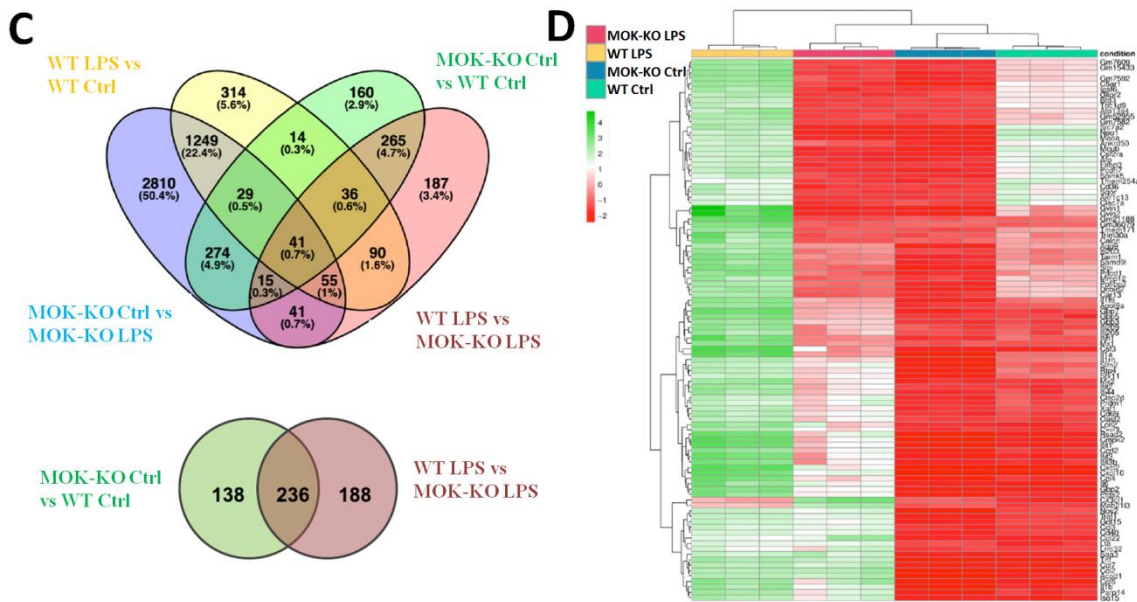
ELA (Provenzano et al., 2023). La línea celular NSC-34, línea híbrida de ratón de neuronas embrionarias de médula espinal y neuroblastomas, ha sido extensamente empleada en el contexto de la ELA, convirtiéndose en una de las herramientas celulares más comunes para estudiar enfermedades neurodegenerativas (Bernath et al., 2023; Gyawali et al., 2021; N.-Y. Lee & Kang, 2017). No obstante, de acuerdo con nuestros experimentos, dicho fenómeno de toxicidad por glutamato sobre cultivos de NSC-34 no se replicó, pues no se produjo una clara alteración de la viabilidad medida por MTT (**Fig. 15A**), convirtiéndose así en un modelo no válido como control de excitotoxicidad dada la ausencia de respuesta a un contexto típico de ELA. Debido a que la falta de reacción por parte de la línea neuronal ha sido reportada anteriormente, sumada a la heterogeneidad de protocolos de cultivo y diferenciación publicados existentes (Hounoum et al., 2016), se procedió a valorar este efecto en cultivos primarios de motoneuronas provenientes de embriones de ratón, los cuales sí respondían correctamente a estímulos con glutamato, viéndose reducida su viabilidad al medirla por MTT (**Fig. 15B**). Una vez validado el modelo, a cultivos primarios de motoneuronas se les sometió durante 16 horas a un 50% de medio condicionado por microglía, tanto WT como MOK-KO, expuestas a LPS durante 24 horas junto a un 50% de medio de motoneuronas fresco. Coherentemente, las motoneuronas expuestas a medios condicionados por microglía WT bajo el estímulo de LPS sufrieron una reducción significativa en la viabilidad respecto a los medios condicionados por microglía WT control, medida por microscopía de cribado de alta eficiencia (HTS) y el kit de viabilidad LIVE/DEAD. Por otro lado, este efecto fue revertido bajo la condición inflamatoria inducida por LPS en medios condicionados por células microgliales MOK-KO, indicando que, en un contexto inflamatorio, las respuestas mediadas por MOK pueden tener un efecto neurotóxico (**Fig. 15C y D**).



**Fig. 15. Determinación del efecto de medios condicionados por el clon MOK-KO sobre la viabilidad de motoneuronas.** **A.** Ensayo de viabilidad mediante MTT para valorar el efecto de excitotoxicidad de diferentes concentraciones de glutamato durante 24 horas sobre cultivos de NSC-34. **B.** Cuantificación de los ensayos de viabilidad mediante MTT sobre cultivos de motoneuronas primarias sometidos a estímulos por glutamato, control de muerte por MG132 (inhibidor del proteasoma que promueve la apoptosis) o control durante 16 horas. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes (N = 3). Para el análisis de los datos se utilizó t-Student, pareada y de dos colas (\*\* $p < 0,01$  y NS = no significativo). **C y D.** Imágenes representativas (**C**) de cultivos de motoneuronas primarias mediante HTS sometidas a medios condicionados por SIM-A9 WT o MOK-KO y su correspondiente cuantificación (**D**). Para la tinción se utilizó el kit de valoración de viabilidad LIVE/DEAD. Los datos están normalizados respecto a cada condición control, y corresponden a 3 experimentos independientes (N = 3). Para revelar diferencias significativas se utilizó T-Student, pareada y de dos colas (\*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$ ). La escala de tamaño corresponde a 200  $\mu\text{m}$ .

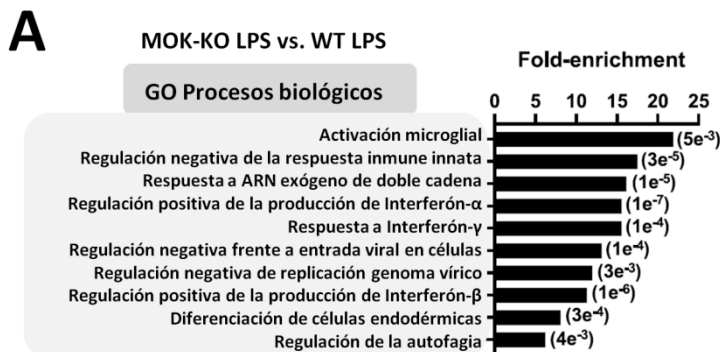
Con el modelo de SIM-A9 generado por CRISPR/Cas9, se realizó RNA-Seq con las células microgliales WT y MOK-KO, estimuladas o no durante 5 horas con 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS para conocer los cambios transcripcionales desencadenados por dicho estímulo en ausencia de la quinasa MOK. Numerosos genes, tanto codificantes como no codificantes, fueron identificados como DEGs, mostrando un relativo solapamiento entre ambas líneas celulares y condiciones experimentales (**Fig. 16**). Coherentemente, el análisis de

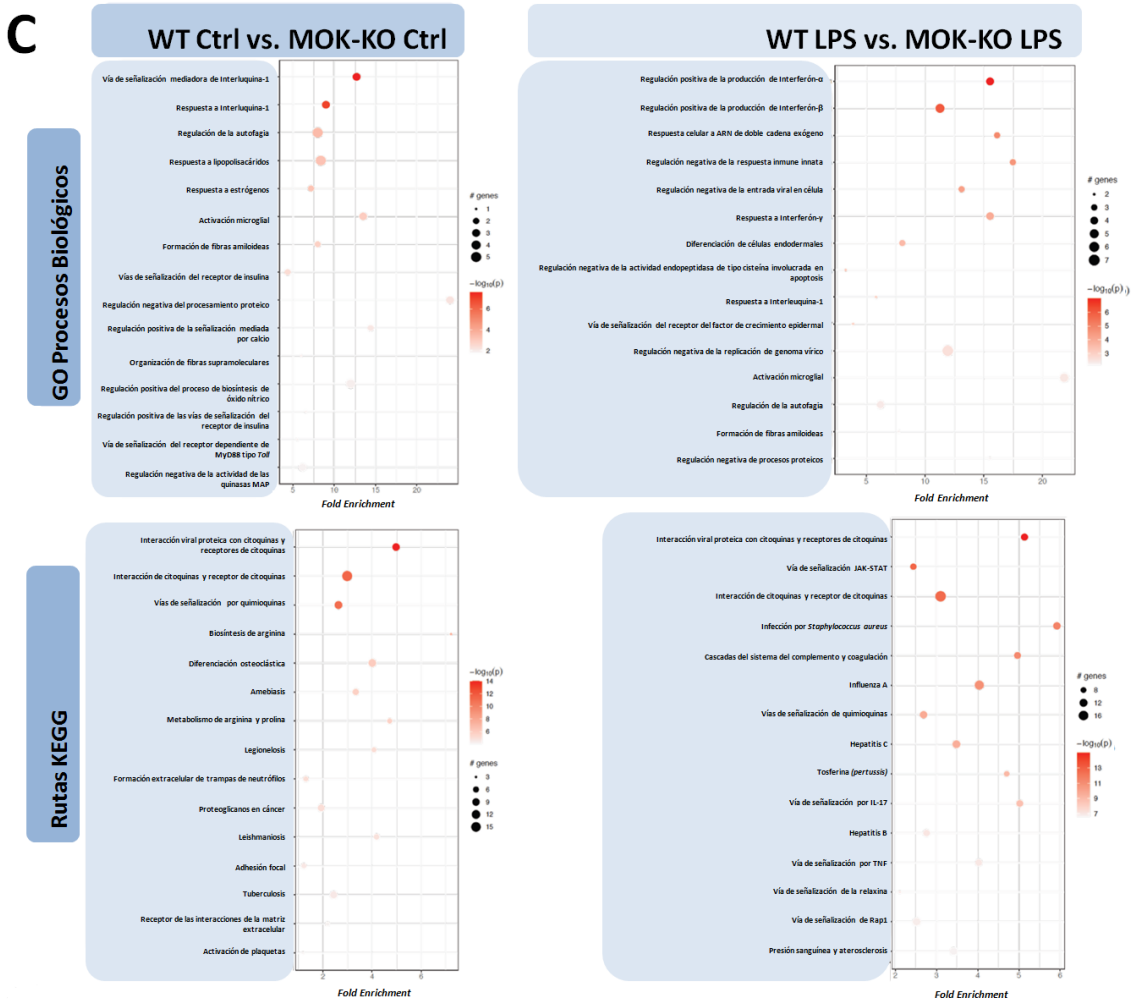
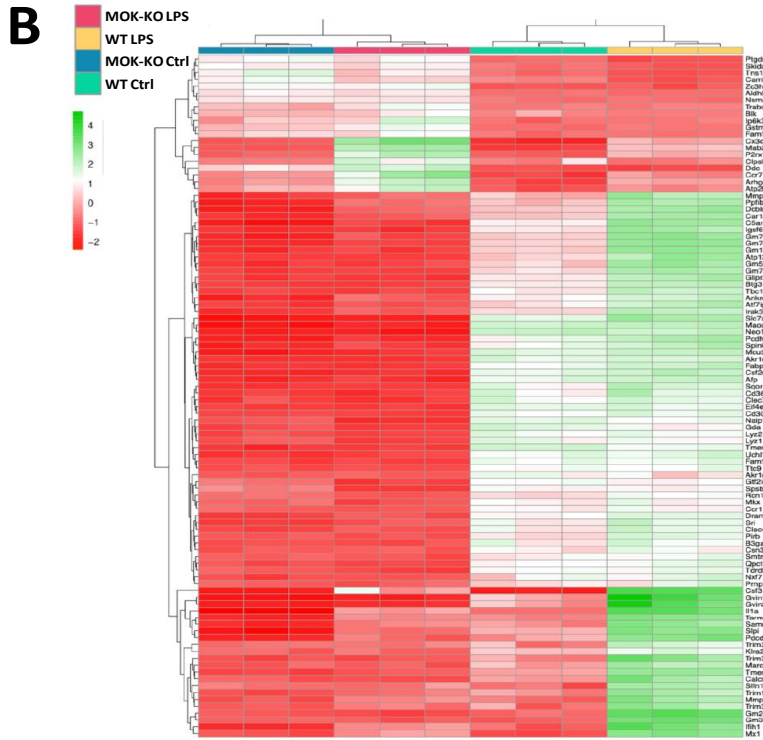




**Fig. 16. El clon MOK-KO muestra un perfil transcriptómico alterado frente a estímulos inflamatorios (parte I).** **A.** Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados del RNA-Seq (N = 3). **B.** *Volcano plot* representando los 45661 transcritos identificados mediante RNA-Seq de las células SIM-A9 WT y MOK-KO, tanto en condiciones control (**B, izquierda**) como de estimulación con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS durante 5 horas (**B, derecha**). Los genes con  $p\text{Adj.} < 0,05$  fueron considerados significativos. Los DEGs con los valores de  $p$  más bajos y  $\text{fold-change}$  más altos están etiquetados. **C.** Diagrama de Venn del análisis transcriptómico mediante RNA-Seq del modelo WT y MOK-KO en la línea SIM-A9. El diagrama superior muestra el total de DEGs revelados mientras que el inferior muestra los DEGs codificantes entre las comparativas de ambas líneas, con o sin la estimulación con LPS a 5 horas (N = 3).  $p\text{Adj.} < 0,05$ ;  $\log_2 \text{fold-change} > 2$  y  $< -2$ . **D.** *Heatmap* mostrando el análisis por agrupamiento no supervisado de los 100 principales DEGs codificantes de proteínas basado en la expresión relativa en las cuatro condiciones (N = 3).

Por otro lado, realizando un análisis por agrupamiento de la ontología génica (GO) de los resultados del RNA-Seq, se reveló un enriquecimiento significativo de vías y procesos biológicos relacionados con la activación microglial, la inmunidad innata, la regulación de IFN $\alpha$ /IFN $\beta$  (IFN tipo-I) y las respuestas antivirales (**Fig. 17**).

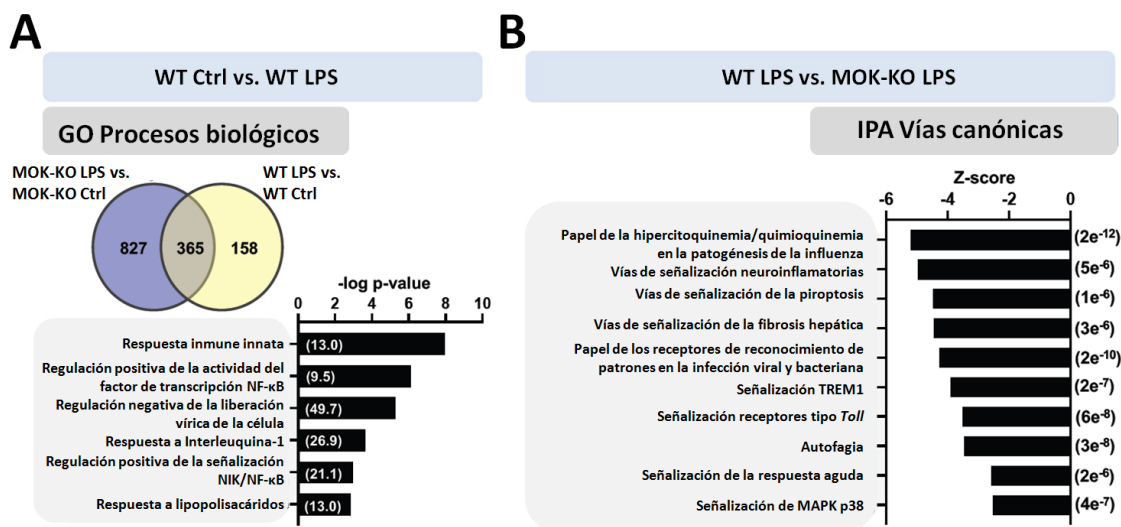






**Fig. 17. El clon MOK-KO muestra un perfil transcriptómico alterado frente a estímulos inflamatorios (parte II).** **A.** Análisis por GO del total de DEGs implicados en procesos biológicos por su enriquecimiento, obtenidos mediante RNA-Seq bajo las condiciones experimentales descritas en la figura anterior (**Fig. 16**). Los términos mostrados surgen de la comparación de las condiciones experimentales “WT LPS vs. MOK-KO LPS”. Entre paréntesis se indica el *p*-valor de los resultados principales con al menos 3 genes regulados positiva o negativamente. **B.** *Heatmap* mostrando el agrupamiento de 100 DEGs codificantes identificados en la comparación “WT LPS vs. MOK-KO LPS” (consistente en el 80% de los principales genes regulados negativamente y el 20% de los principales genes regulados positivamente, con el fin de mantener la proporcionalidad de los DEGs significativos revelados). **C.** Representación del *fold-change* (valores de cambio) de los 15 términos principales obtenidos por GO de procesos biológicos y vías *KEGG* (del inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) mediante el paquete PathfindR de R Studio. Para dicha representación se tomaron todos los DEGs restantes tras aplicar una criba de los *fold-change* de Log2 de  $\pm 2$  junto a un *p*Adj  $< 0,05$  en las comparaciones “WT Ctrl vs. MOK-KO Ctrl” o “WT LPS vs. MOK-KO LPS”.

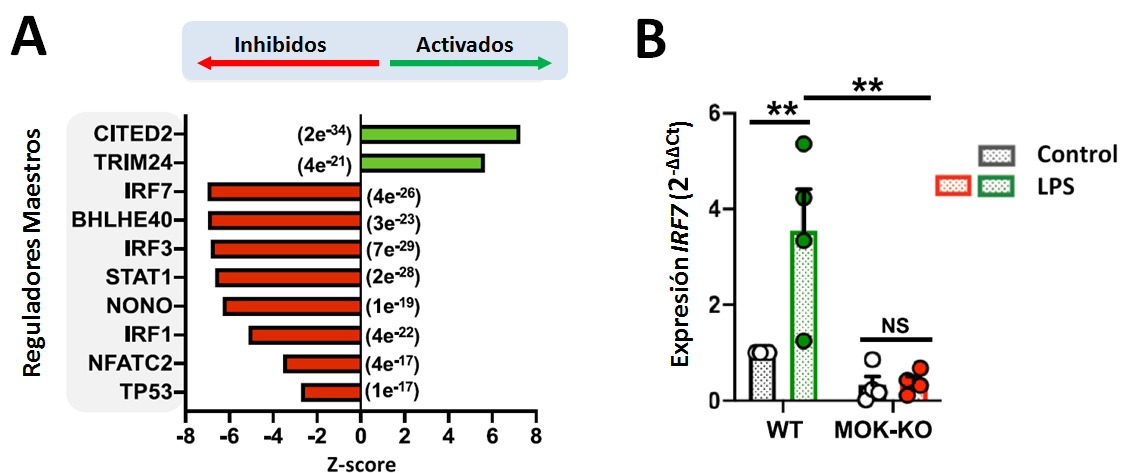
Así, teniendo en cuenta los DEGs en la comparación de las condiciones de células WT o MOK-KO en presencia de LPS, se evidenció un enriquecimiento en términos relacionados con “respuesta antiviral”, “inmunidad innata” y “regulación positiva de la NF- $\kappa$ B” respecto a los controles (**Fig. 18**). Dicho análisis también resaltó rutas canónicas diferencialmente reguladas con implicación en “neuroinflamación”, “piroptosis” y “TREM1”.



**Fig. 18. El clon MOK-KO muestra un perfil transcriptómico alterado frente a estímulos inflamatorios (parte III).** **A.** Principales términos enriquecidos de procesos biológicos por ontología génica en la comparación “WT Ctrl vs. WT LPS” de los 985 DEGs codificantes no compartidos entre ambos grupos (827 + 158). Entre paréntesis se muestra el *fold-enrichment* de cada término, basado en el *p*-valor y con al menos 3 genes regulados positiva o negativamente. **B.** 10 principales vías canónicas obtenidas mediante análisis IPA en base al *p*-valor, mostrado entre paréntesis, y que se encuentran diferencialmente reguladas en la comparación “WT-LPS vs. MOK-KO LPS” (*p*Adj  $< e^{-5}$ ).

En último lugar, gracias al análisis basado en IPA entre WT y MOK-KO en las condiciones con LPS, salen a la luz varios genes activados de interés en respuesta inmune como *CITED2* y *TRIM24*, o inhibidos como *IRF1*, 3 y 7, *STAT1* o *BHLHE40*, siendo algunos reguladores transcripcionales maestros comunes a los encontrados en los experimentos de microglía primaria descritos anteriormente con C13 (**Fig. 11D y Fig. 19A**).

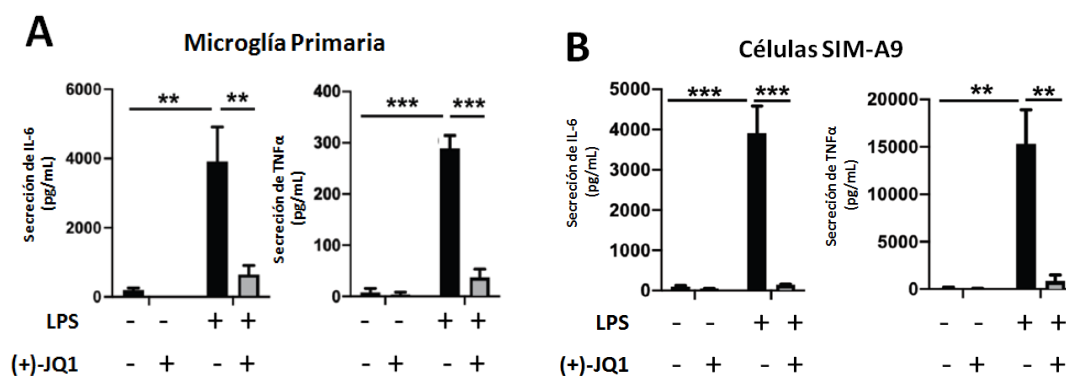
Consecuentemente, los niveles de expresión de *IRF7*, conocido y establecido regulador transcripcional de la vía de señalización IFN tipo-I, fueron determinados mediante RT-qPCR mostrando un coherente incremento de su expresión en células WT bajo el estímulo con LPS, a diferencia de lo observado en MOK-KO (**Fig. 19B**). Resumidamente, estos resultados en conjunto demuestran una implicación de MOK en la activación microglial y la respuesta inflamatoria modulada por las vías STAT1 y NF- $\kappa$ B, siendo un factor crítico en la inducción de IRF7/3 e IFN tipo-I y respuesta antiviral.



**Fig. 19. El clon MOK-KO muestra un perfil transcriptómico alterado frente a estímulos inflamatorios (parte IV).** **A.** Diez principales reguladores de expresión maestros inferidos mediante análisis IPA a partir de los DEGs codificantes de la comparativa “WT vs. MOK-KO” tras la estimulación con LPS. Puntuaciones Z (*Z-score*) positivas indican activación y puntuaciones negativas reflejan inhibición. Los resultados provienen de todos los genes que se encontraron regulados diferencialmente en el análisis RNA-Seq DESeq2 en cualquier comparación con  $pAdj < e^{-5}$ . El *p*-valor de superposición se encuentra indicado entre paréntesis. **B.** Determinación por RT-qPCR de la expresión del transcrito de *IRF7* en células SIM-A9 WT y MOK-KO estimuladas o no con 1  $\mu$ g/mL de LPS durante 5 horas. Los datos representan el *fold-change* respecto a la normalización con la condición WT Control (N = 4). Se realizó un análisis de varianzas mediante el test de ANOVA unidireccional seguido por una prueba post-hoc de Tukey. Los datos mostrados consisten en medias  $\pm$  S.E.M. (\*\* $p < 0,01$ , NS = no significativo).

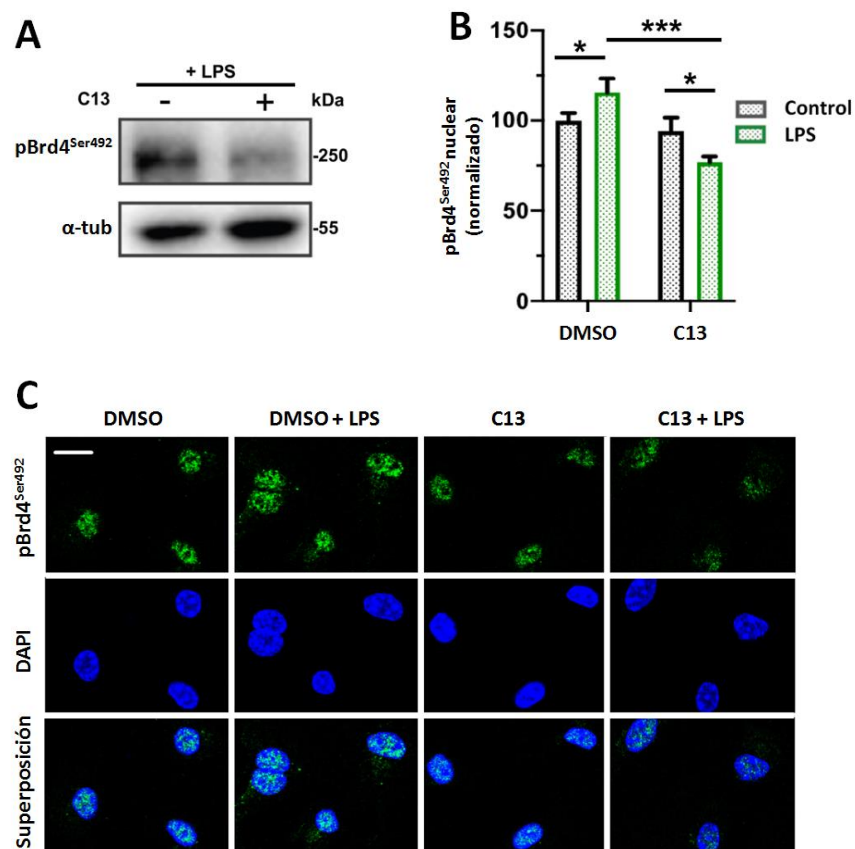
### 5.3. Modulación por MOK de la respuesta inmune mediante la regulación de los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> y su unión a cromatina en microglía

En base a los resultados obtenidos en la inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en residuos de Ser/Thr seguido de LC-MS/MS (**Fig. 9A**), MOK emerge como posible regulador, bien de forma directa o indirectamente, del estado de fosforilación de varias proteínas. Entre ellas, destaca un miembro de la familia de proteínas BET revisado anteriormente, Brd4, al cual se le ha atribuido recientemente gran importancia en mecanismos inflamatorios y en enfermedades neurodegenerativas (Bao et al., 2017; J. Wang et al., 2019; N. Wang et al., 2021). Para verificar si este lector epigenético está involucrado en nuestro modelo de microglía primaria y línea celular microglial como modulador de la respuesta inflamatoria inducida por LPS, se tomaron cultivos primarios de microglía o células SIM-A9 y se estimularon por 5 horas con LPS tras el previo tratamiento con 10  $\mu$ M del inhibidor (+)-JQ1 o su vehículo (DMSO) durante 1 hora. Tras los tiempos pertinentes, se valoraron mediante ELISA los distintos niveles de citoquinas proinflamatorias de los sobrenadantes, en concreto IL-6 y TNF $\alpha$ , que mostraron una reducción drástica de los mediadores de la inflamación analizados bajo la presencia del inhibidor (+)-JQ1, confirmando la implicación de Brd4 en la respuesta inflamatoria en nuestro modelo, además de la eficacia de su inhibidor (**Fig. 20**).



**Fig. 20. Confirmación de la modulación de Brd4 en la respuesta inflamatoria observada en microglía.** Cuantificación mediante ELISA de sobrenadantes provenientes de microglía primaria (**A**) o células microgliales SIM-A9 (**B**) estimulados o no con 1  $\mu$ g/mL de LPS durante 5 horas previo tratamiento durante una hora con 10  $\mu$ M del inhibidor de Brd4, (+)-JQ1, o su vehículo, DMSO (N = 3). Para destacar diferencias significativas se realizó un test de ANOVA unidireccional seguido por una prueba post-hoc de Tukey (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

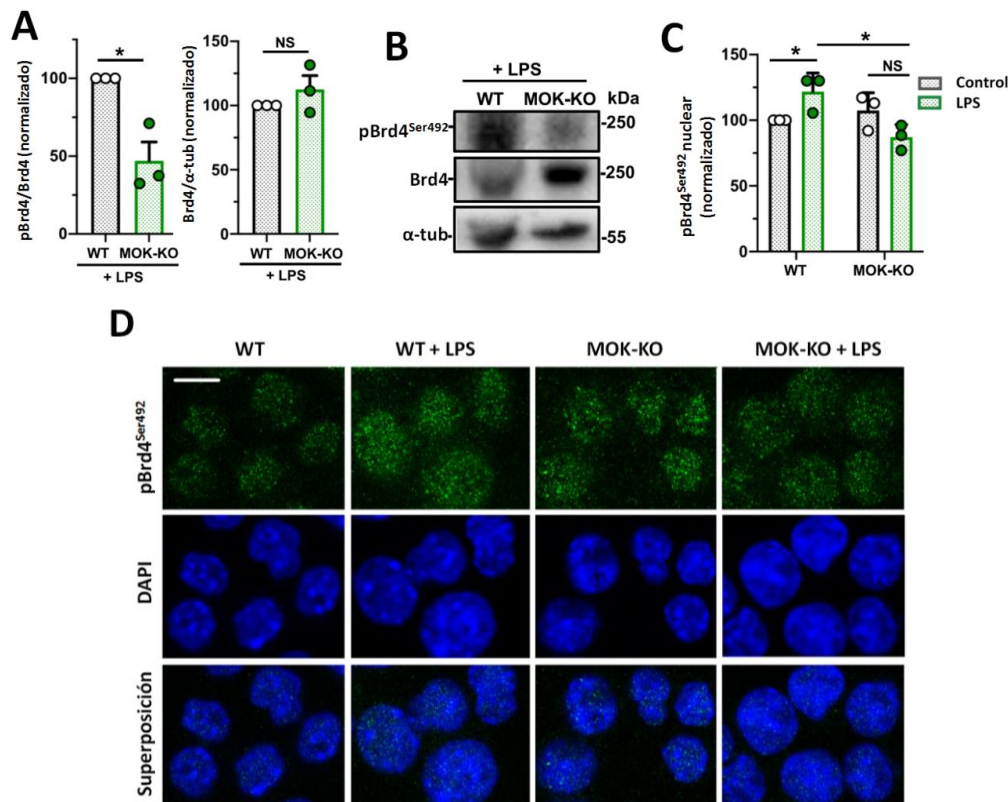
Seguidamente, para corroborar y validar los datos por co-inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en residuos de Ser/Thr y del análisis por LC-MS/MS bajo el efecto o no de C13, se tomaron células de la línea SIM-A9 sometidas a LPS durante 5 horas previo tratamiento con el inhibidor C13, como se ha descrito anteriormente. Mediante Western blot, se observó una reducción de la forma fosforilada del lector epigenético, pBrd4<sup>Ser492</sup>, en condiciones de tratamiento con C13 (**Fig. 21A**). Con la misma idea, se realizaron inmunofluorescencias contra pBrd4<sup>Ser492</sup> en cultivos de microglía primaria bajo la influencia o no de LPS durante 4 horas, e igual que anteriormente, la influencia del pretratamiento con C13 por 1 hora (**Fig. 21B y C**). Tras realizar la cuantificación de las imágenes, se observó un aumento en los niveles nucleares de Brd4 fosforilado en las células WT estimuladas con LPS, consecuente con una regulación positiva de la inflamación. Por el contrario, la administración de C13 provocaba una reducción de dichos niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup>, mostrando una alteración de la actividad de este lector epigenético.



**Fig. 21. Los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> se ven alterados por la influencia de C13 en un contexto inflamatorio. A.** Western blot de lisados celulares de cultivos de SIM-A9 estimulados con 1 µg/mL de LPS por 5 horas previo tratamiento con 10 µM de C13 o su vehículo (DMSO),

como se ha descrito anteriormente. Para el inmunomarcaje se utilizaron los anticuerpos anti- $\alpha$ -tubulina y anti-fosfo-Brd4 (Ser492) (**Tabla 3**). La imagen es representativa de 2 experimentos independientes. **B y C**. Imágenes obtenidas por inmunofluorescencia confocal (**C**) a partir de cultivos primarios de microglía estimulados durante 4 horas con 1  $\mu$ g/mL de LPS previo tratamiento durante 1 hora con 10  $\mu$ M de C13 o su vehículo (DMSO), y la correspondiente cuantificación de la intensidad de la señal obtenida de las imágenes (**B**). Para el marcaje fluorescente se utilizó el anticuerpo primario anti-fosfo-Brd4 (Ser492) (verde) y DAPI (azul) para la contra tinción de los núcleos. Los datos e imágenes mostrados corresponden a un experimento, donde se analizaron 20 imágenes por condición, y es representativo de dos experimentos independientes. Para destacar diferencias significativas se realizó una t-Student, no pareada y de una cola ( $*p < 0,05$  y  $***p < 0,001$ ). La escala de tamaño mostrada corresponde a 100  $\mu$ m.

Coherentemente, estos resultados van en la misma línea que los observados en los modelos de SIM-A9 MOK-KO y WT, donde mediante Western blot e inmunofluorescencia y bajo el estímulo de LPS se refleja la reducción de pBrd4<sup>Ser492</sup> respecto a Brd4 total (**Fig. 22A y B**). Similarmente, los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> aumentan de nuevo en los núcleos de las células WT estimuladas con LPS, observándose una reducción en los niveles en MOK-KO bajo la misma estimulación (**Fig. 22C y D**). Todos estos resultados en conjunto destacan con consistente firmeza el papel regulador que la quinasa MOK tiene sobre Brd4 a nivel nuclear y su activación bajo un contexto inflamatorio.



**Fig. 22.** Los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> se ven alterados por la carencia de MOK en un contexto inflamatorio. **A y B.** Cuantificaciones (**A**) e imagen representativa del Western blot

(B) de lisados provenientes de cultivos celulares de la línea SIM-A9 WT y MOK-KO, estimulados o no con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS durante 1 hora. Inmunomarcaje realizado con anti-fosfo-Brd4 (Ser492) y anti-Brd4, normalizados respecto a la señal de Brd4 o  $\alpha$ -tubulina, respectivamente. Los datos mostrados corresponden a 3 experimentos independientes, cuyas diferencias fueron resaltadas mediante t-Student, no pareada y de una cola ( $*p < 0,05$  y NS = no significativo). C y D. Cuantificación (C) e imágenes representativas obtenidas mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal (D) a partir de cultivos de SIM-A9 WT y MOK-KO, estimulados o no con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS durante 1 hora. En verde, se muestra la señal de pBrd4<sup>Ser492</sup> (anti-fosfo-Brd4 (Ser492) (Tabla 3) y en azul DAPI para la contra tinción de los núcleos. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes (N = 3). Para el análisis de los datos se utilizó t-Student, no pareada y de dos colas ( $*p < 0,05$  y NS = no significativo). La escala de tamaño mostrada corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . La intensidad de color de la primera fila de imágenes ha sido incrementada un 50% para mejorar su visualización.

En consecuencia y en vista de los resultados obtenidos, para detectar la posible modulación de MOK sobre Brd4 en su función regulatoria mediante la unión a promotores de genes de citoquinas de interés, que en anteriores resultados han mostrado estar reguladas por MOK en la respuesta de microglía a LPS (IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\beta$ ) (Fig. 13), se realizó inmunoprecipitación de cromatina seguida de PCR cuantitativa (ChIP-qPCR). Para ello, cultivos SIM-A9 WT y MOK-KO fueron estimulados o no con LPS durante 1 hora, tiempo suficiente para que se produzca la unión del lector epigenético a las regiones promotoras de las citoquinas (Fig. 23). Como se esperaba, Brd4 reflejó un enriquecimiento en las células SIM-A9 WT en las regiones promotoras de los genes *il6*, *tnfa* e *ifnb* tras el estímulo con LPS. Sin embargo, este efecto se vio reducido cuando se estudió en el clon MOK-KO, siendo el incremento provocado por LPS no significativo, e incluso igualando el enriquecimiento de la región promotora a las condiciones control, como en los casos de *il6* e *ifnb*.

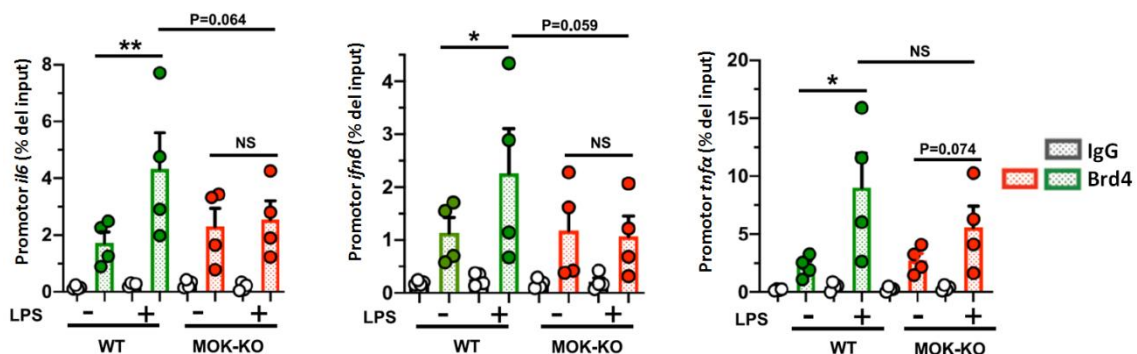
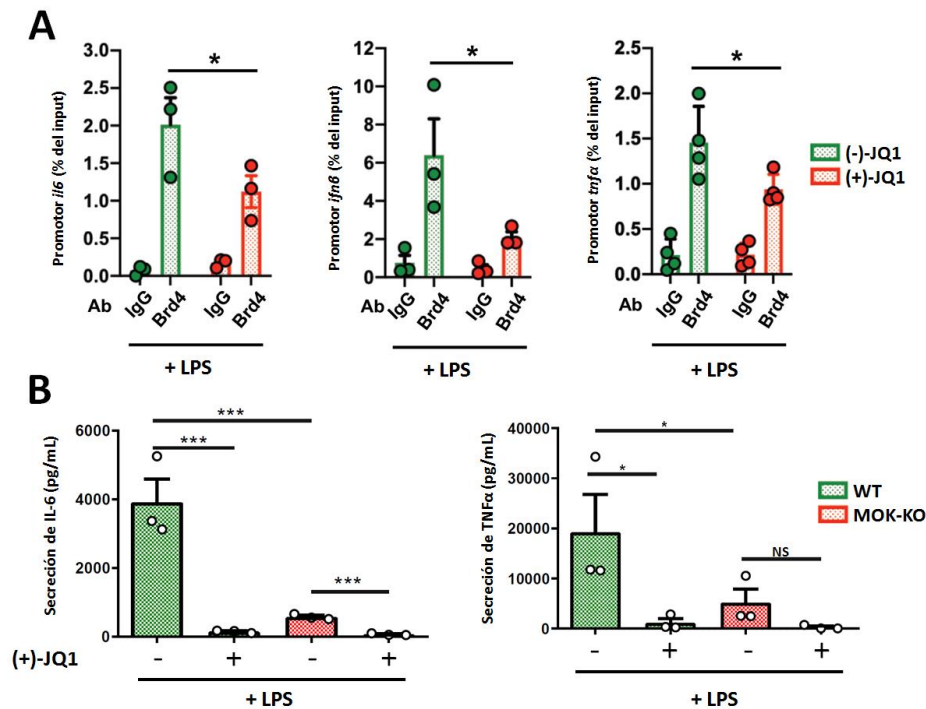


Fig. 23. Valoración de la unión de Brd4 a las regiones promotoras de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IFN $\beta$  y TNF $\alpha$  mediante ChIP-qPCR. Los datos mostrados corresponden al porcentaje de enriquecimiento con los anticuerpos anti-Brd4 y anti-IgG (Tabla 3).

3) a las correspondientes regiones promotoras respecto a la condición no inmunoprecipitada (*input*). Las muestras provienen de cromatina aislada de células SIM-A9 WT o MOK-KO tratadas o no con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS durante 1 hora. Los datos mostrados corresponden a medias  $\pm$  S.E.M. de 4 experimentos independientes ( $N = 4$ ) ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ , NS = no significativo). Para obtener diferencias significativas entre los grupos se utilizó t-Student, no pareada y de una cola.

Adicionalmente, la aplicación del inhibidor de Brd4 y su control (-)-JQ1 –un enantiómero del inhibidor que es usado como control inactivo ya que no exhibe interacciones significativas con los miembros de la familia BET–, provocó una esperada reducción significativa de la unión de Brd4 a las regiones promotoras de las citoquinas estudiadas en células WT, efecto similar al observado para las células MOK-KO (**Fig. 24A**). Esto demuestra la especificidad de la unión de Brd4 medida en los ensayos. En consonancia, la valoración de los sobrenadantes mediante ELISA refleja una reducción en la liberación de estas citoquinas proinflamatorias (**Fig. 24B**). Estos resultados muestran de manera consistente un papel de la quinasa MOK en la regulación positiva de genes proinflamatorios y de IFN tipo-I inducida por LPS mediante la modulación de Brd4. Además, en conjunto, los resultados parecen indicar la existencia de terceros mecanismos moduladores independientes de la unión de Brd4 a las regiones promotoras, pero que sí estarían mediados por la quinasa MOK y contribuyen en la regulación positiva de ciertas citoquinas en las respuestas inflamatorias protagonizadas por microglía.



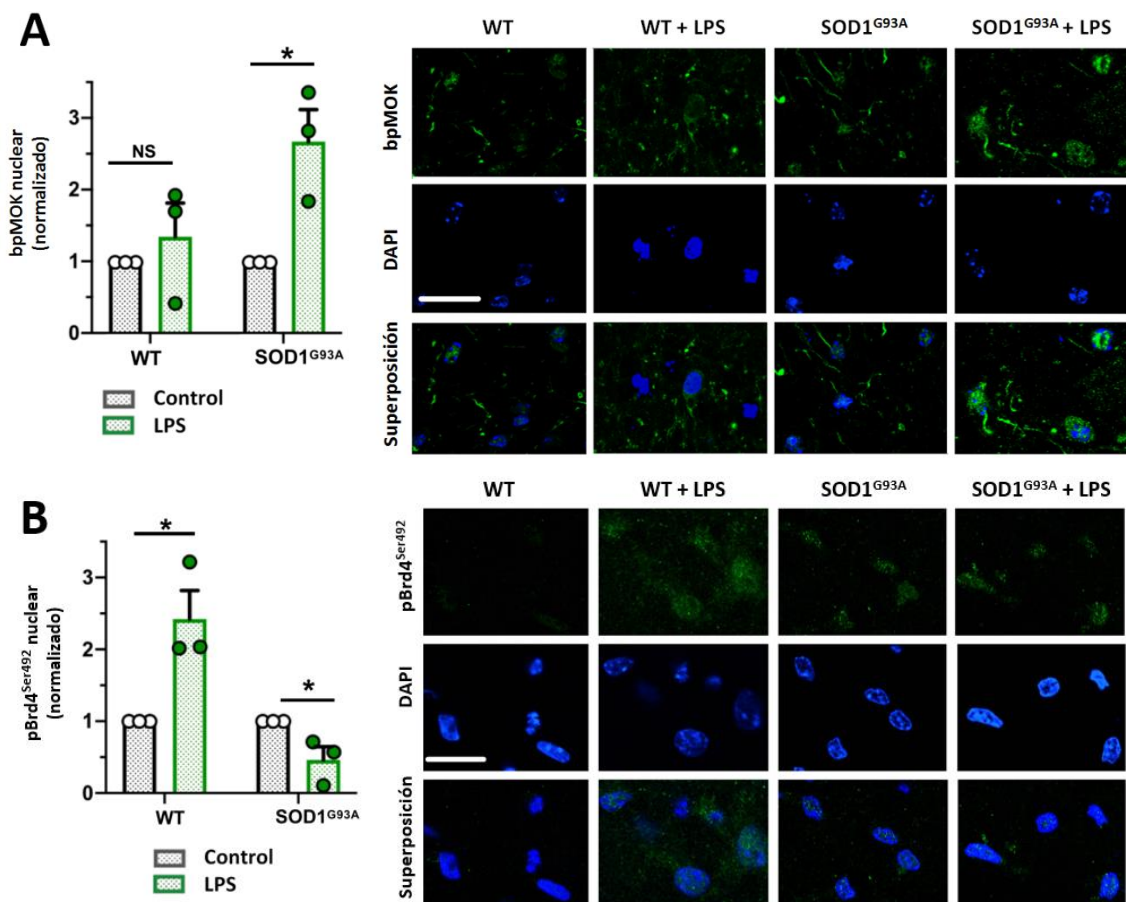
**Fig. 24. Efecto de (+)-JQ1 en la unión de Brd4 a las regiones promotoras de citoquinas proinflamatorias. A.** Resultados de ChIP-qPCR de cultivos celulares SIM-A9 WT tratados con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS durante 1 hora previo tratamiento por 1 hora con 10  $\mu\text{M}$  del inhibidor o su control ((+)-JQ1 y (-)-JQ1). Los datos representan valores relativos en porcentaje respecto a la condición no inmunoprecipitada (*input*) de la unión de Brd4 a las regiones promotoras de las citoquinas citadas. Los datos mostrados corresponden al porcentaje de enriquecimiento con los anticuerpos anti-Brd4 y anti-IgG (Tabla 3). **B.** Determinación mediante ELISA de citoquinas de sobrenadantes de cultivos celulares de SIM-A9 WT o MOK-KO tratadas con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS durante 4 horas previo tratamiento durante 1 hora con el inhibidor de Brd4. En ambos casos, los resultados corresponden a medias  $\pm$  S.E.M. de 3 experimentos independientes (N = 3) (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , NS = no significativo). Para extraer diferencias significativas entre las condiciones se utilizó t-Student, no pareada y de una cola (A) o ANOVA unidireccional seguido por una prueba post-hoc de Tukey (B).

## 5.4. El eje regulatorio bpMOK-pBrd4<sup>Ser492</sup> está alterado en animales SOD1<sup>G93A</sup>

Dados los resultados obtenidos que muestran una alteración de Brd4 modulada por MOK, se procedió a estudiar el estado del eje bpMOK-pBrd4<sup>Ser492</sup> en respuesta a LPS en el contexto de la ELA, para lo que se utilizó el modelo preclínico de SOD1<sup>G93A</sup>, extensamente estudiado y reconocido (Deora et al., 2020; Gerbino et al., 2020; Gois et al., 2020; Krasemann et al., 2017), caracterizado además por presentar alteraciones a nivel de TDP-43 (Cai et al., 2015; Jeon et al., 2019; Pasetto et al., 2017; Shan et al., 2009). Con este modelo se generaron cultivos organotípicos de médulas espinales de ratones



pre-sintomáticos, de unas 5 semanas de edad, tanto en animales  $SOD1^{G93A}$  como silvestres, en los cuales se estudiaron posibles cambios en los niveles de la forma activa de la quinasa, MOK bifosforilada (bpMOK) en los residuos Treonina<sup>159</sup> y Tirosina<sup>161</sup>, frente a estímulos inflamatorios por LPS durante 16 horas. Mediante inmunofluorescencia y captura de imágenes por microscopía confocal, se observó que los niveles de bpMOK nucleares en animales WT no sufrían cambios significativos ante estímulos por LPS. Sin embargo, los animales transgénicos  $SOD1^{G93A}$  mostraban un significativo incremento de los niveles de bpMOK cuando los cultivos organotípicos se sometían al mismo estímulo inflamatorio (**Fig. 25A**).



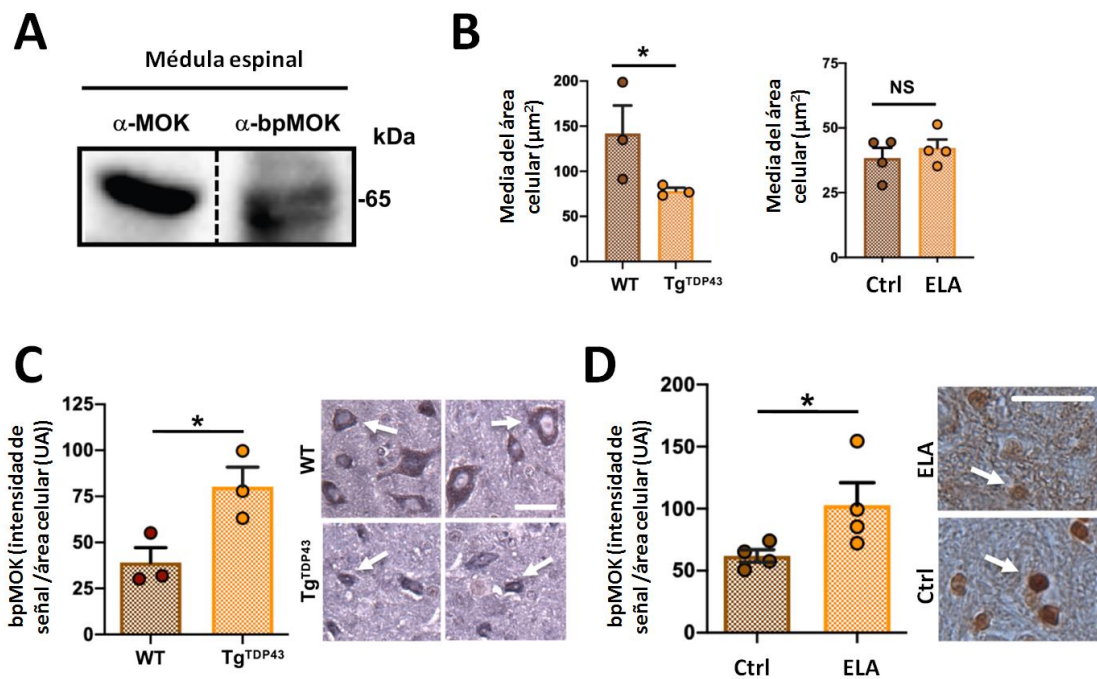
**Fig. 25. El eje bpMOK-pBrd4<sup>Ser492</sup> está alterado en ratones  $SOD1^{G93A}$ . A y B.** Conjunto de imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal (**derecha**) del cultivo organotípico de ratones silvestres o transgénicos de 5 semanas de edad, estimulados o no con 1  $\mu$ g/mL LPS durante 16 horas. Para el inmunomarcaje se utilizó anti-bpMOK (**A**) o anti-fosfo-Brd4 (Ser492) (**B**) (**Tabla 3**), y DAPI para la contra tinción de los núcleos. La cuantificación de la señal nuclear (**izquierda**) de cada proteína fue normalizada respecto al control sin estimular de cada experimento (N = 3). El test estadístico usado fue, para ambos experimentos, t-Student, no pareada y de dos colas (\* $p < 0,05$ , NS = no significativo). La escala marcada corresponde a un tamaño de 25  $\mu$ m.

En paralelo y bajo esta misma metodología experimental, se realizaron ensayos similares en los que se marcó la forma fosforilada de Brd4, pBrd4<sup>Ser492</sup>, donde se observó un sustancial y significativo aumento de los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> en el núcleo de las células de la médula espinal de ratones sanos frente al estímulo con LPS (**Fig. 25B**). Por el contrario, en el modelo de ELA de SOD1<sup>G93A</sup> se observa una significativa reducción en los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> nuclear frente al mismo estímulo. Estos experimentos indican conjuntamente que el eje regulatorio de bpMOK-pBrd4<sup>Ser492</sup> se encuentra activado y alterado en contexto inflamatorio en el modelo murino de ELA SOD1<sup>G93A</sup>.

## 5.5. Los niveles celulares de MOK están alterados en ELA

En vista de los resultados expuestos que muestran una implicación consistente de MOK en células de microglía en el contexto de la respuesta inflamatoria de la microglía a LPS y modelo celular de ELA, se procedió a estudiar el estado de MOK en pacientes con ELA esporádica y modelos de ratón SOD1<sup>G93A</sup>. Primeramente, se detectó tanto la forma nativa de la proteína como de bpMOK en homogenizados de médula espinal de ratón silvestre, mostrando en ambos marcajes una banda de un tamaño aparente esperado de 65 kDa (**Fig. 26A**). Tras ello, se realizó inmunohistoquímica (IHC) para determinar los niveles de bpMOK tanto en cortes de médulas espinales humanas de pacientes de ELA-E (y sus correspondientes controles sanos), como a ratones transgénicos del modelo de ELA de TDP-43<sup>A315T</sup> (Tg<sup>TDP43</sup>) en etapas avanzadas (y sus correspondientes controles sanos emparejados en edad). El estudio de *visu* de las muestras reveló que, a diferencia de lo observado en pacientes, las células analizadas en el modelo preclínico de ratón mostraban grandes diferencias de tamaño entre las condiciones silvestre y transgénico (**Fig. 26B izquierda y C derecha**). Esto llevó a la normalización de las intensidades obtenidas por IHC respecto al tamaño celular en ambos modelos. Llamativamente, tanto en el modelo de ratón transgénico como en pacientes con ELA-E, se observó un

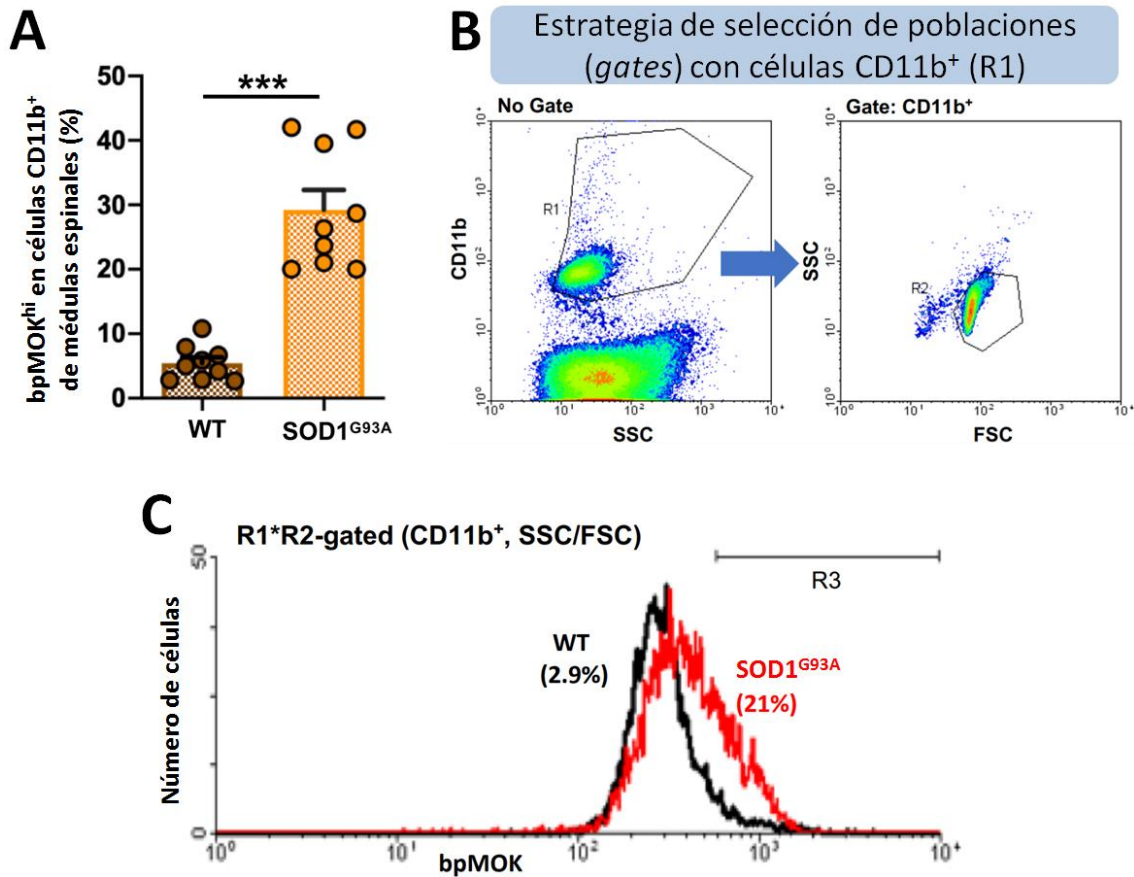
incremento significativo de la intensidad de bpMOK en comparación a sus respectivos controles (**Fig. 26C y D**).



**Fig. 26. Los niveles celulares de bpMOK están alterados en animales transgénicos TDP-43<sup>A315T</sup> y pacientes de ELA.** **A.** Imagen obtenida mediante Western blot a partir del homogenizado de médula espinal de ratón silvestre después del inmunomarcado con los anticuerpos anti-MOK y anti-bpMOK (**Tabla 3**). **B.** Cuantificación del área celular de las muestras usadas para inmunohistoquímica de ratones (**izquierda**) o humanas (**derecha**) medidas en  $\mu\text{m}^2$ , provenientes de 3 animales para cada situación experimental o 4 pacientes para cada condición (N = 3 y N = 4, respectivamente). Se realizó t-Student, no pareada y de una cola para destacar diferencias significativas. **C y D.** Ensayo de inmunohistoquímica de médulas espinales de ratones transgénicos para TDP-43 (Tg<sup>TDP43</sup>) o silvestres y la correspondiente cuantificación (**C**) y medulas espinales de pacientes humanos diagnosticados con ELA-E o respectivos controles y su cuantificación (**D**). El inmunomarcado se realizó en ambos modelos con anticuerpo anti-bpMOK (**Tabla 3**). Las flechas señalan ejemplos de células valoradas en la cuantificación de área e intensidad. El test estadístico usado fue, para ambos experimentos, t-Student, no pareada y dos colas (\* $p < 0,05$ , NS = no significativo). La escala de tamaño de ambos experimentos corresponde a 25  $\mu\text{m}$ .

Para determinar si los niveles de bpMOK están específicamente alterados en células microgliales en el contexto de ELA, se tomaron médulas espinales de ratones SOD1<sup>G93A</sup> y silvestres (WT), tras la aparición de los primeros síntomas en los ratones transgénicos (unas 14 semanas de edad). Luego de aislar por centrifugación en gradiente una población celular enriquecida en microglía, se cuantificaron las células que mostraban altos niveles de bpMOK (bpMOK<sup>hi</sup>) en conjunto al marcaje de membrana celular de microglía, CD11b (K. Cho et al.,

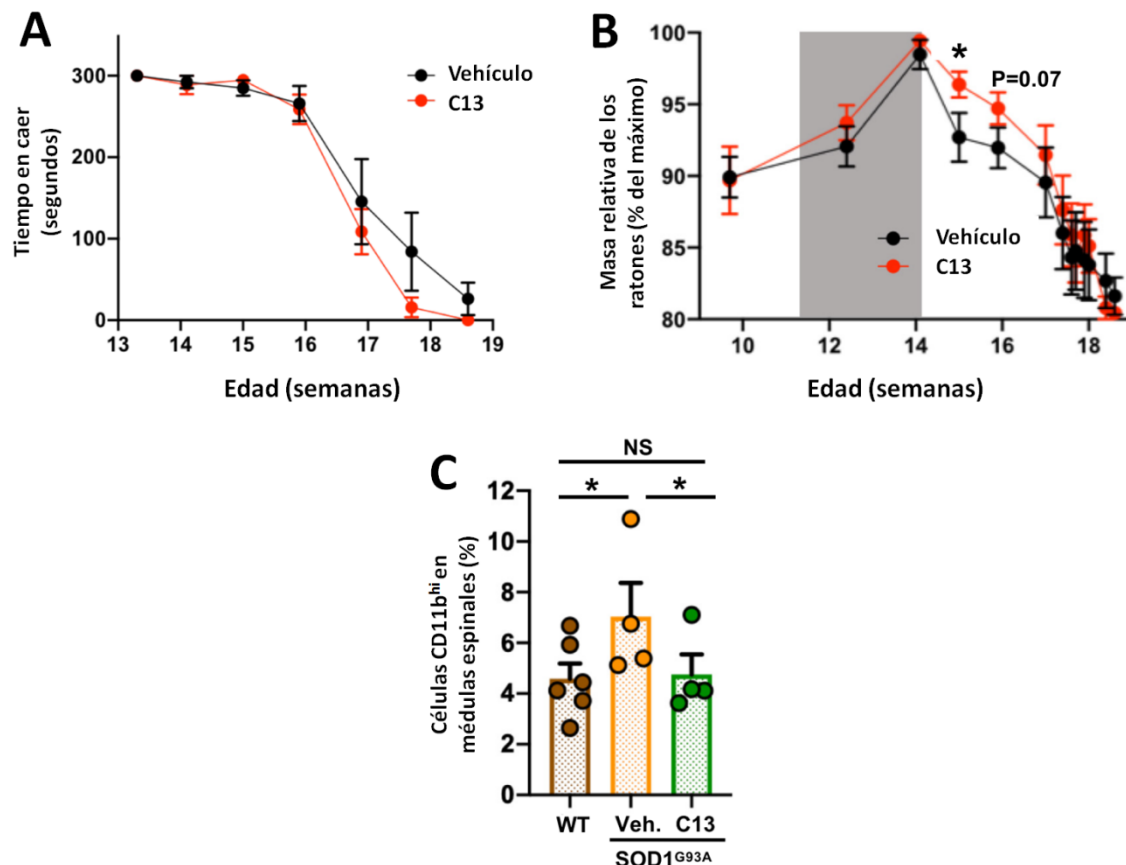
2020; Paolicelli et al., 2022), mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron un incremento del porcentaje de células microgliales marcadas con altos niveles de bpMOK de más de cinco veces en los animales transgénicos para SOD1<sup>G93A</sup> (Fig. 27).



**Fig. 27.** El modelo SOD1<sup>G93A</sup> presenta un enriquecimiento en células CD11b positivas con altos niveles de bpMOK respecto animales WT. **A.** Análisis por citometría de flujo de células aisladas de médulas espinales mediante gradiente de separación provenientes de animales WT o SOD1<sup>G93A</sup> de 14 semanas de edad, al inicio de los síntomas (N = 9). Las poblaciones fueron primeramente seleccionadas por el marcaje positivo de CD11b seguido del análisis de niveles altos para bpMOK (bpMOK<sup>hi</sup>). Se realizó la prueba t-Student, no pareada y de dos colas. **B.** Ejemplo de la estrategia de selección seguida en el aislamiento de células marcadas con los anticuerpos anti-CD11b y anti-bpMOK (Tabla 3) para la selección de la población R1\*R2. **C.** Histograma mostrando la señal para bpMOK de la población celular seleccionada mediante los criterios (R1\*R2) de CD11b<sup>+</sup> y SSC/FSC (del inglés *Side Scatter/Forward Scatter*). Representativamente, en negro se muestran los resultados correspondientes a un ratón WT, y en rojo a un ratón SOD1<sup>G93A</sup>.

## 5.6. MOK como posible diana terapéutica en ELA

Finalmente, para descifrar un posible papel de MOK en la fisiopatología *in vivo* de la ELA, además de su potencial uso terapéutico en tratamientos clínicos, se tomaron nuevamente ratones SOD1<sup>G93A</sup> a los que se les administró intraperitonealmente 20 µg de C13 o DMSO como vehículo (2%) en un volumen final de 100 µL, en días alternos y durante 3 semanas, comenzando en periodo pre-sintomático a las 11 semanas de edad. A pesar de que la prueba de movilidad mediante Rotarod no mostró diferencias entre ambos grupos, la administración de C13 sí que tuvo un efecto frenando la pérdida de masa relativa en el comienzo de la sintomatología (**Fig. 28A y B**). Concretamente, esta ventana fue máxima y significativamente diferente tras una semana de la finalización del tratamiento.

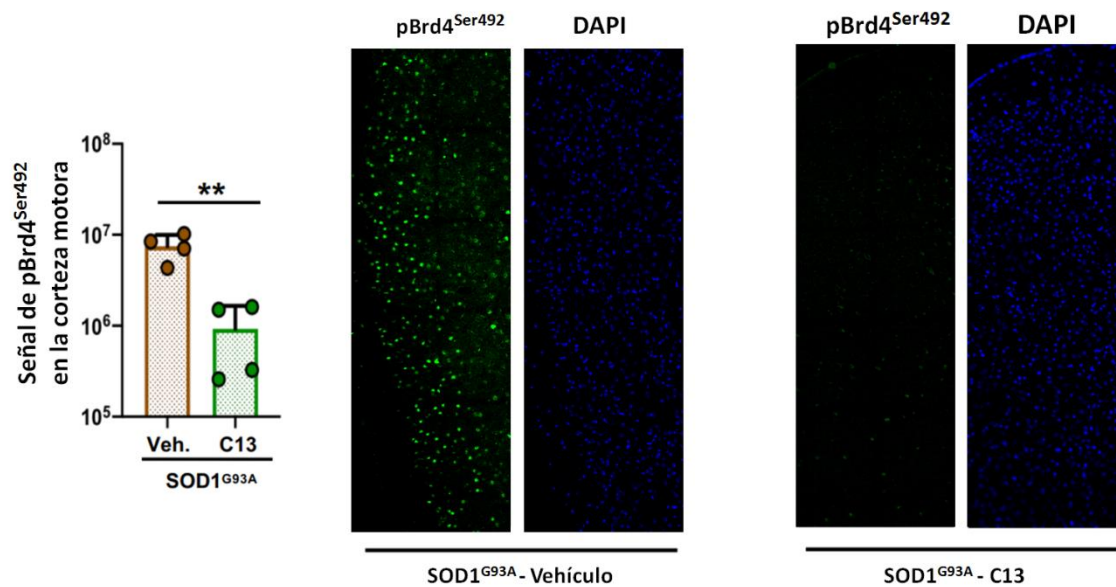


**Fig. 28. Efecto de la administración de C13 en el transcurso de la sintomatología del modelo murino SOD1<sup>G93A</sup>.** **A.** Ensayo de motilidad de los ratones SOD1<sup>G93A</sup> mediante la prueba de Rotarod realizado desde la semana 13 y repetido con regularidad cada semana hasta el sacrificio de los animales (N = 6). **B.** Evolución en el tiempo de las masas de los ratones SOD1<sup>G93A</sup>. Las masas fueron normalizadas respecto al valor máximo alcanzado por cada animal (porcentaje respecto al máximo valor). Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con 20 µg de C13 o su vehículo por dosis, calculado en base a las masas

de los ratones, y comenzando en la semana 11 (previa a los síntomas) y durante una ventana de 3 semanas (franja gris). Los datos mostrados ( $N = 6$ ) consisten en medias  $\pm$  S.E.M. y el test estadístico realizado fue ANOVA unidireccional seguido por una prueba post-hoc de Tukey ( $*p < 0,05$ ). **C.** Análisis mediante citometría de flujo de células aisladas a partir de médulas espinales de ratón de 14 semanas de edad, tanto silvestre como SOD1<sup>G93A</sup> tratados con C13 o su vehículo ( $N = 6$  para WT,  $N = 4$  para cada tratamiento en SOD1<sup>G93A</sup>). Los datos mostrados consisten en medias  $\pm$  S.E.M. a los que se les realizó el test t-Student, pareada y de una cola ( $*p < 0,05$ , NS = no significativo).

A la luz de los resultados obtenidos, para discernir si la protección de los animales del modelo de ELA resultante de la administración de C13 está mediada por una reducción de la activación microglial en este contexto, se analizaron los niveles de marcaje alto de CD11b (CD11b<sup>hi</sup>) en las células aisladas a partir de médula espinal de ratones SOD1<sup>G93A</sup> tras 14 semanas (además de un tercer grupo de ratones WT), justo en el momento del final del tratamiento con C13. Coherentemente, mediante citometría de flujo se observó que la proporción de células CD11b<sup>hi</sup> era significativamente menor en los ratones WT que en los ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con el vehículo (**Fig. 28C**). Llamativamente, la proporción de células CD11b<sup>hi</sup> era similar en las condiciones de ratones WT respecto a los SOD1<sup>G93A</sup> tratados con C13. Este resultado indicó un efecto inhibitorio y apaciguador de la activación microglial por C13 en las médulas espinales de dichos ratones transgénicos, reflejando que MOK está involucrada en la neuroinflamación en el contexto de ELA.

Adicionalmente, el análisis de la corteza motora de los mismos ratones mostró mayores niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> en animales tratados con el vehículo frente a los tratados con C13, observándose una reducción significativa por la administración del compuesto (**Fig. 29**). En conjunto, todos estos resultados indican una desregulación de la proteína quinasa MOK y de las vías moduladas por ella con implicación directa en la fisiopatología de la ELA, principalmente en SNC y microglía, dotándole de un papel relevante en su desarrollo.



**Fig. 29. La administración de C13 reduce los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> en la corteza motora de animales SOD1<sup>G93A</sup>.** Cuantificación de niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> de imágenes pertenecientes a la corteza motora del cerebro de ratones SOD1<sup>G93A</sup>, tratados con C13 o su vehículo (N = 4). Los ratones fueron tratados como se ha descrito anteriormente, sacrificados al alcanzar las 15 semanas de edad. Para el inmunomarcaje se utilizó el anticuerpo anti-fosfo-Brd4 (Ser492) (verde) y DAPI (azul) para la contra tinción de los núcleos. Los datos mostrados consisten en medias  $\pm$  S.E.M. a los que se les realizó el test t-Student, no pareada y de dos colas (\*\* $p < 0,01$ ).





# DISCUSIÓN

---



## 6. Discusión

Aunque desde su descubrimiento se ha asociado a diferentes trastornos o enfermedades (T. Chen et al., 2013; Huang et al., 2019), no ha sido hasta años recientes que la proteína quinasa MOK se ha relacionado e identificado en un contexto neuropatológico de ELA y de activación microglial (Leal-Lasarte et al., 2017), atribuyéndole una función en la inmunidad o en el SNC. En este sentido, cada vez más estudios destacan el papel que la superfamilia de las MAPKs (a la cual pertenece MOK) y las vías en las que participan integrando señales de diferente naturaleza como diana interesante en el estudio en ELA (Gomes, 2024; Sahana & Zhang, 2021). Con todo ello, la presente investigación amplía el conocimiento acerca del alcance e implicación que tiene esta Ser/Thr quinasa; descubriendo a MOK tanto como mediador en la respuesta inflamatoria en microglía, como su papel modulador de Brd4, además de la alteración del eje de esta quinasa en el contexto de la ELA o su uso como prometedora diana terapéutica.

Hasta la fecha, no se han descrito dianas de MOK o reguladores aguas arriba, ni tampoco vías de señalización con implicación directa de la quinasa, más allá de su posible papel como modulador negativo del crecimiento ciliar mediante la vía mTOR en células renales epiteliales y de la apoptosis mediante la vía de señalización de caspasas en mejillones (An et al., 2022; Broekhuis et al., 2014). En sintonía con lo vislumbrado previamente por nuestro grupo (Leal-Lasarte et al., 2017), los análisis por SLAM-Seq del perfil transcripcional temprano de células microgliales frente a la exposición a agregados de TDP-43 y la inhibición o no de MOK, revelan el significativo papel de esta quinasa en este modelo. Los numerosos genes movilizados y diferencialmente expresados, tanto positiva como negativamente, en dicho contexto de ELA bajo la inhibición de MOK, invita a especular con un papel relevante de esta proteína (**Fig. 7 y Fig. 8**). Entre estos DEGs identificados, podemos encontrar genes interesantes con papel en la regulación inmune, cuyo perfil transcriptómico en células de microglía está alterado. Por ejemplo: *Naip2*, gen que ha sido descrito formando parte del complejo del inflamasoma, por tener un rol en la respuesta inflamatoria frente a bacterias o la piroptosis (Kofoed et al., 2012); otro miembro de la familia de las MAP quinases, como MAPK14, que se ha descrito como

activador de numerosas citoquinas proinflamatorias (Lo et al., 2014); además de una Ser/Thr fosfatasa como es PPP5c, con funciones en diversas vías de señalización de respuesta a estrés además de encontrarse alterada en Alzheimer (Amable et al., 2011; F. Liu et al., 2005).

En nuestro modelo de agregación de TDP-43 en microglía, observamos que la inhibición de MOK por C13 (Garske et al., 2011) provoca la reducción de la producción de diversas citoquinas proinflamatorias en células microgliales primarias que han sido identificadas en pacientes de ELA (K. Kaur et al., 2022; Wei et al., 2023; Yamamuro-Tanabe et al., 2023) (**Fig. 10**). Similarmente, la respuesta inflamatoria inducida por LPS, incluida la activación de la vía NF- $\kappa$ B (Buss et al., 2012), también se ve coartada bajo la inhibición de la citada quinasa, indicando un claro papel mediador de MOK en la respuesta de este tipo celular (**Fig. 11**).

En vista del aparente papel e implicación de MOK en la respuesta inflamatoria de microglía y de las diferentes vías de señalización observado en los resultados, se generaron clones *knockout* de MOK (MOK-KO) sobre la línea microglial SIM-A9 (**Fig. 12**). Coherentemente, se obtuvieron resultados similares en las líneas MOK-KO en comparación a lo observado usando el inhibidor de la quinasa, tanto en los niveles de citoquinas proinflamatorias liberadas como en sus transcritos (**Fig. 13**). Asimismo, este efecto en la reducción de citoquinas proinflamatorias se observó además a nivel intracelular mediante citometría de flujo; fenotipo que se vio revertido al sobreexpresar la versión silvestre de la quinasa en células MOK-KO. Sin embargo, este efecto no se observó en las condiciones donde la sobreexpresión de MOK recombinante se llevó a cabo con una versión sin actividad quinasa de MOK (MOK-KD), indicando que la modulación que realiza MOK sobre el sistema inmune es, en gran medida, debido a su actividad fosforiladora (**Fig. 14**).

De igual manera, los análisis transcriptómicos por RNA-Seq predijeron interesantes reguladores maestros aguas arriba de MOK. Consecuentemente, la ausencia de la quinasa, tanto en los clones *knockout* para MOK como en el modelo con C13, ven reducidos los niveles de conocidos componentes reguladores de la respuesta inmune innata y adaptativa como son *STAT1*,

*IRF3*, *IRF7* o *IRF1* (**Fig. 11D** y **Fig. 19**). La regulación negativa de estos elementos precede a una consecuente disminución de la respuesta inflamatoria y de IFN de tipo-I/antiviral, coherente con la menor liberación de mediadores proinflamatorios observada en nuestros experimentos (Hu et al., 2022; Ji et al., 2023; Mogensen, 2019; X. Yang et al., 2022).

En la misma línea de ideas, el tratamiento con C13 en microglía primaria revela la activación de ciertos factores con descrita actividad antiinflamatoria como STAT3, NFE2L2 o CEBPB. Aunque no coincidentes en el RNA-Seq de los *knockout*, se ha reportado a STAT3 ejerciendo un papel antiinflamatorio (Ji et al., 2023), además de observarse en mecanismos con el mismo fin en conjunto a C/EBP $\beta$  (Muromoto et al., 2022). La primera, tras estimular la transcripción de la segunda mediante la unión a su región promotora, promueve la transición de los macrófagos al fenotipo antiinflamatorio clásicamente llamado M2 (Chang et al., 2023), además de estimular la actuación del inhibidor NFKBIZ (I $\kappa$ B- $\zeta$ ), regulando negativamente la vía NF- $\kappa$ B (Muromoto et al., 2022). Adicionalmente, NFE2L2 (también conocido como NRF2) es un actor ampliamente conocido y descrito en señales antiinflamatorias con implicación en trastornos neurodegenerativos, como por ejemplo ocurre en el eje regulatorio KEAP1-NRF2 (Urano & Yamamoto, 2023), siendo este factor de transcripción un regulador negativo de citoquinas proinflamatorias como IL-6 o TNF $\alpha$  (Cuadrado, 2022).

Por otro lado, observando los resultados por RNA-Seq de los clones *knockout* para MOK (**Fig. 19**), la ausencia de la quinasa predice la activación de factores como CITED2, una interesante molécula con capacidad de suprimir el fenotipo polarizado proinflamatorio de macrófagos, además de reprimir un gran conjunto de genes que promueven la inflamación, como *HF1 $\alpha$*  o *STAT5* (Kim et al., 2020; Zafar et al., 2023). En la misma línea, *TRIM24* es un gen entre cuyas funciones se encuentra también la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 mediante STAT6 y mediadores como IL-10 o IFN $\beta$ 1 (Hui et al., 2023; Yu et al., 2019). Por el contrario, el factor de transcripción BHLHE40 aparece inhibido en el modelo MOK-KO, el cual ha sido reportado consistentemente como un agente activador de la respuesta inmune en linfocitos y por actuar directamente sobre genes proinflamatorios (Cook et al., 2020; Zafar et al., 2021), además de

tener un emergente papel como actor en enfermedades autoinmunes y con implicación en el SNC (M. J. Cho et al., 2023; C. C. Lin et al., 2016). Cabe destacar que BHLHE40 ha sido además recientemente descrito tomando un papel regulador en los fenotipos de microglía DAM o MGnD (Krasemann et al., 2017). En la misma línea, NONO actúa como cofactor junto a PRDM1 en la regulación de IL-6 en células dendríticas derivadas de monocitos (K. Lee et al., 2020).

Además, poniendo atención en el total de DEGs revelados en la comparativa entre la línea MOK-KO y silvestre mediante RNA-Seq, y analizando mediante agrupación los procesos biológicos por ontología génica (GO), destaca el enriquecimiento en mecanismos inflamatorios, como la activación de la microglía, la regulación negativa de la respuesta inmune innata, la regulación de la producción de IFN tanto  $\alpha$  como  $\beta$ , la vía NF- $\kappa$ B y otros mediadores de la inflamación o la respuesta antiviral. Asimismo, mediante predicción por IPA destacan vías canónicas entre MOK-KO y WT con un papel en la piroptosis o en la señalización de la neuroinflamación. También es digno de mención la aparición de la vía de señalización mediada por TREM1, cuya inhibición reduce la polarización hacia el fenotipo M1 y el reclutamiento de neutrófilos, además de regularse negativamente la activación de vías inflamatorias mediante NLRP3 y NF- $\kappa$ B (Li et al., 2019; Natale et al., 2019; Xu et al., 2021). Curiosamente, la eliminación de TREM1 reduce la capacidad de responder a estímulos mediante TLR4 en macrófagos, a la vez que aumenta la producción de SOD1 (Natale et al., 2019). Consecuentemente, se han reportado niveles altos de TREM1 en médulas espinales dañadas de ratón (Li et al., 2019). Con ello, de interés es la cada vez mayor implicación de los miembros de la familia TREM, principalmente TREM1/2, en enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias, ya que su papel en la inmunidad innata y la regulación de la transición hacia el fenotipo DAM de la microglía ofrecen nuevos mecanismos con alto interés terapéutico (Pelham & Agrawal, 2014; Xie et al., 2022) (**Fig. 17 y Fig. 18**).

Resumidamente, estos resultados ponen de manifiesto que MOK participa significativamente en la neuroinflamación, estando involucrada en la regulación de la inmunidad innata mediante distintas vías, siendo la respuesta inflamatoria

y la de IFN tipo-I/antiviral sus dos mecanismos principales. Esta respuesta de la microglía mediada por MOK es además potencialmente neurotóxica, ya que cuando dicho fenómeno es promovido por la exposición de medios condicionados por microglía estimulada con LPS en motoneuronas primarias se ve mitigado en ausencia de la quinasa (**Fig. 15**).

Mediante este trabajo, una vez identificado y definido la influencia que posee la quinasa MOK en la modulación del sistema inmune y la represión que conlleva su ausencia o la inhibición de la actividad fosforiladora, se estudiaron posibles dianas moleculares aguas abajo de MOK. De esta forma, se logró identificar en nuestro modelo celular de microglía frente a agregados de TDP-43, mediante co-inmunoprecipitación seguida de LC-MS/MS, varias proteínas candidatas a poseer un estado de fosforilación modulado por MOK en un contexto de ELA (**Fig. 9**). Así, por ejemplo, se identificaron proteínas como Apol7a, perteneciente a la familia de apolipoproteínas L cuya expresión parece estar modulada por citoquinas inflamatorias como IFN $\beta$  (Uzureau et al., 2016); desmoplaquina, proteína perteneciente al citoesqueleto con relevancia en numerosas cardiopatías y enfermedades pulmonares (He et al., 2023) y HSPA1L, cuyos polimorfismos han sido relacionados con numerosas enfermedades (Huusko et al., 2018; Takahashi et al., 2017).

Sin embargo, es el lector epigenético Brd4 el que despertó mayor interés pues, como se ha desarrollado con anterioridad, ha sido involucrado en numerosos mecanismos celulares entre los que destacan especialmente el cáncer, la regulación del ciclo celular, la apoptosis o la modulación del sistema inmune (Bao et al., 2017; Sun et al., 2023). A pesar de su relevancia y de los numerosos estudios publicados acerca de los genes dependientes de Brd4 y que ésta misma proteína modula, los agentes corrientes arriba que regulan su propia actividad han sido poco estudiados hasta el momento. Como se referenció anteriormente, se ha demostrado que la caseína quinasa II (CK2) regula la actividad del lector epigenético mediante la fosforilación del residuo Ser<sup>492</sup>, pero existe escasa información acerca de otros posibles moduladores (Wu, 2013). Este hecho enaltece el interés en encontrar nuevos moduladores de Brd4 que permitan obtener más eslabones en la cadena regulatoria de la

respuesta inflamatoria y que tengan interés desde un punto de vista clínico en enfermedades neuroinflamatorias.

De esta forma, los puntos en común que relacionan a Brd4 con la modulación del sistema inmune, nuestros resultados que muestran el papel de MOK en dicha regulación, y sumado a los resultados obtenidos por co-IP y LC-MS/MS, todo invita a elucubrar que uno de los mecanismos por los que la quinasa MOK regula la respuesta inmune sea a través del estado de fosforilación y activación de la bromo-proteína, bien directamente o mediante la modulación de terceros actores como CK2. Inequívocamente, nuestros resultados indican una relación directa en un contexto inflamatorio inducido por LPS como se observa a nivel nuclear, en la que la ausencia de la actividad de MOK en nuestros modelos, bien dado por el efecto de C13 o en los clones *knockout*, conlleva una reducción de la presencia de la forma fosforilada de Brd4. Esta relación explica la reducción observada en la liberación de citoquinas proinflamatorias determinada en nuestro modelo microglial frente a la estimulación con LPS (**Fig. 11A y B, y Fig. 13**), hecho que se corrobora con el decremento de la unión de Brd4 a las regiones promotoras de dichos mediadores de la inflamación (**Fig. 23 y Fig. 24**). Este enclave modulador podría ser una interesante diana terapéutica para la reducción de la toxicidad provocada por la neuroinflamación mediada por Brd4, como ya proponen algunos autores para distintas enfermedades con afección del SNC y componentes inflamatorios (Rudman et al., 2018; Y. F. Tan et al., 2020; J. Wang et al., 2019; Y. Zhou et al., 2019; Zhu et al., 2023).

Curiosamente, en presencia de LPS el sustancial decremento de la unión de Brd4 a las regiones promotoras de genes proinflamatorios conducido por la ausencia de MOK, como es el caso para *il6* e *ifn $\beta$* , no es trasladable con la misma magnitud al caso de *tnf $\alpha$* , donde es posible explicar esta menor respuesta mediante otros mecanismos que no impliquen la unión directa de Brd4 a dichas regiones. A pesar de ello, las vías activadas serían también dependientes de Brd4 y MOK, dado los resultados obtenidos por la determinación de citoquinas en presencia de los respectivos inhibidores. Entre los mecanismos descritos que pudiesen estar modulando la expresión de esta citoquina proinflamatoria de manera dependiente de Brd4, se encuentra la vía



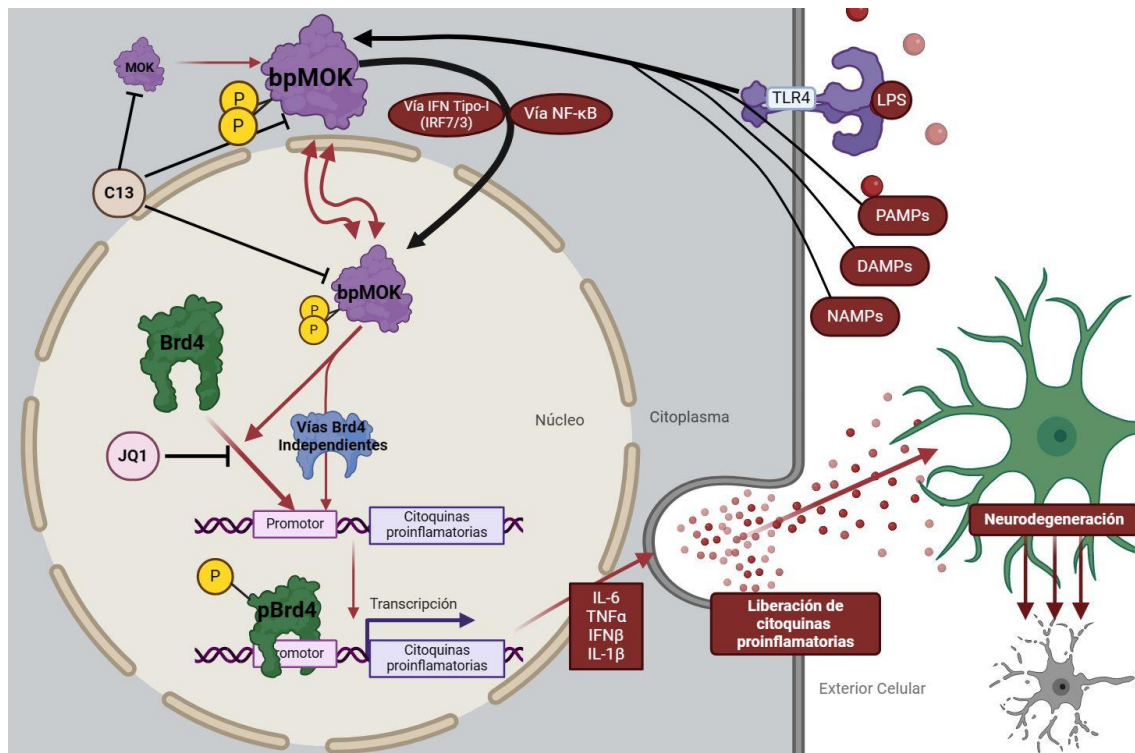
NF- $\kappa$ B y su inhibición mediante la modulación del ARN mensajero de I $\kappa$ B $\alpha$  (Bao et al., 2017; Zhu et al., 2023). Adicionalmente, IRF1 también ha sido relacionado como un importante co-activador de las señales inflamatorias y de migración microglial junto a Brd4, coherentemente con lo mostrado en los resultados por RNA-Seq del presente estudio (Baek et al., 2021).

Dado el papel mostrado por MOK en nuestro modelo celular de ELA bajo la agregación de TDP-43, y al papel descrito para Brd4 en la modulación del sistema inmune cuya regulación está alterada en nuestro modelo microglial y afectada por la quinasa MOK, los indicios mostraban que el eje regulatorio bpMOK-pBrd4<sup>Ser492</sup> en la respuesta inflamatoria podría estar afectado en un contexto neurodegenerativo como la ELA. Para investigar esa relación, se prepararon cultivos organotípicos provenientes de médulas espinales de ratones silvestres y transgénicos SOD1<sup>G93A</sup> antes de evidenciar los primeros síntomas de la enfermedad (5 semanas de edad) (**Fig. 25**). En contraposición a lo observado para los animales silvestres, el importante aumento en los niveles de bpMOK para los animales SOD1 tras la estimulación con LPS se vio correlacionar con una reducción en los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup>, indicando una desregulación en el eje bpMOK-pBrd4<sup>Ser492</sup>, tal vez debido a una saturación de la vía. Asimismo, células de microglía aisladas a partir de médula espinal de animales SOD1<sup>G93A</sup> mostraron un enriquecimiento de niveles altos de la forma activa de MOK, bpMOK, respecto a los controles silvestres (**Fig. 27**). Destacablemente, los resultados histológicos de médulas espinales, tanto en pacientes de ELA-E como en animales del modelo TDP-43, manifestaban un aumento significativo de bpMOK en las etapas avanzadas de la enfermedad.

Estos resultados permiten proponer a MOK como una atractiva diana terapéutica, pudiendo actuar como un punto de regulación crítico de la neuroinflamación. Es de resaltar que, a pesar de que a animales SOD1<sup>G93A</sup> a los que se les administró el compuesto C13 durante un tiempo limitado no redujeron su pérdida motora, sí que vieron ralentizada la pérdida de peso inducida por el avance de la enfermedad durante una ventana de tiempo posterior a la finalización del tratamiento (**Fig. 28**), lo cual es un fenómeno que puede ofrecer posibles beneficios clínicos (Patin et al., 2016; Shao et al., 2023). Teniendo en cuenta que el modelo SOD1 presenta un desarrollo de la

enfermedad muy agresivo y que el tratamiento fue interrumpido en el estadio post-inicio sintomatológico, esta ventana de protección podría mostrarse más amplia con la administración continuada del compuesto y utilizando otros modelos de ELA. Coherentemente, los niveles altos de activación microglial reportados por CD11b (CD11b<sup>hi</sup>) observado para animales SOD1<sup>G93A</sup> al finalizar el tratamiento se vieron revertidos por el tratamiento con C13, reflejando una reducción en la microgliosis y por tanto en la neuroinflamación. De la misma forma, el tratamiento con el inhibidor de MOK refleja una reducción en los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> en la corteza motora de ratones SOD1<sup>G93A</sup> frente a los tratados con el vehículo (**Fig. 29**), en línea con una actividad reguladora de los niveles de Brd4 fosforilado por parte de MOK *in vivo*.

En conjunto, todos estos resultados permiten establecer una visión interesante sobre la fisiopatología de la ELA, mostrando un poco estudiado y novedoso actor gracias al papel que se ha descrito en este trabajo acerca de la quinasa MOK sobre el eje neuroinflamatorio en microglía (**Fig. 30**) y los efectos de su consecuente desregulación en el SNC. Asimismo, los experimentos muestran un efecto de MOK dependiente de su actividad quinasa, con capacidad de regular, directa o indirectamente, a la primera diana descrita de la quinasa, el lector epigenético Brd4. Esta proteína, ampliamente conocida por contener funciones proinflamatorias, ve su eje de activación alterado bajo la ausencia de MOK, afectando directamente a la unión a las regiones promotoras de activadores de la inflamación y su producción. Esta activación de la inflamación modulada por MOK mediante la regulación de Brd4 gana interés dada la cada vez mayor importancia que reciben las alteraciones epigenéticas en ELA y otras enfermedades neurodegenerativas (Delgado-Morales 2017; Berson et al., 2018; Martella et al., 2023; Sun et al., 2023). Además, en base a los resultados obtenidos en tejido animal –tanto *in vivo* como *in vitro*– y de pacientes, la candidatura de MOK como diana terapéutica gana peso por los fenómenos observados con su delección, como son la mitigación de la neuroinflamación, de la activación microglial y por los efectos fisiopatológicos que se desregulan y se desencadenan en enfermedades neurodegenerativas.



**Fig. 30. Modelo propuesto del mecanismo de actuación de MOK mediante Brd4 en células de microglía ante estímulos inflamatorios.** Según esta propuesta, las células de microglía responderían a estímulos inflamatorios –como sería LPS o los diferentes DAMPs, PAMPs o NAMPs– movilizandolos numerosos mecanismos con acción proinflamatoria. A modo de ejemplo, el reconocimiento de LPS por receptores TLR4 estimula a la forma activa de MOK, bpMOK (fosforilado en Thr<sup>159</sup> y Tyr<sup>161</sup>), promoviendo la unión de Brd4 a regiones promotoras de citoquinas inflamatorias –como IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\beta$  y posiblemente IL-1 $\beta$ – además de promover terceros efectores proinflamatorios independientes de Brd4, desarrollándose estos mecanismos con la implicación de vías de IFN Tipo-I (IRF7/3) y NF- $\kappa$ B. Como resultado final, la liberación de estos mediadores inflamatorios promovería la degeneración de las neuronas. Los inhibidores respectivos de MOK y Brd4, C13 y JQ1, reducirían el fenómeno proinflamatorio de estas proteínas. Figura generada mediante Biorender.com

Esta investigación sienta bases que permitirían identificar vías de señalización y moléculas implicadas en la neuroinflamación en ELA, ofreciendo nuevos puntos regulatorios con interés terapéutico. Futuras investigaciones en esta línea que pongan el foco en estas moléculas podrían ayudar a comprender los efectos y funciones de MOK en etapas iniciales del desarrollo de la enfermedad, de la arquitectura neural, la inflamación y sus inicios y el mantenimiento de la homeostasis, aportando con ello nuevas formas de modular y controlar el avance de la enfermedad.

En resumen, este estudio desvela nuevas propiedades de MOK con implicación en la respuesta inmune además de su relación con el SNC, controlando la respuesta inflamatoria de una manera dependiente o independiente de Brd4, donde los mecanismos de la quinasa juegan un papel fehaciente en ELA, con una importante implicación en la fisiopatología de la enfermedad. Adicionalmente, esta investigación revela una vía de señalización en neuroinflamación, dotando a MOK de gran interés terapéutico y clínico tanto para la ELA como para otras enfermedades con patente componente neurodegenerativo e inflamatorio.

# CONCLUSIONES

---



## 7. Conclusiones

- ❖ El pretratamiento con C13 provoca grandes cambios en la transcripción temprana de células de microglía primaria expuesta a agregados de TDP-43, indicando que MOK moviliza numerosos mecanismos moleculares en este contexto.
- ❖ La exposición de células de microglía primaria a agregados de TDP-43 dispara la respuesta inflamatoria en estas células, viéndose ésta reducida ante el pretratamiento por C13 o el inhibidor de Brd4, JQ1.
- ❖ En células de microglía *knockout* para la quinasa MOK se ven reducidos los niveles de transcritos de citoquinas proinflamatorias y de IFN de tipo I y la producción de éstas ante estímulos inflamatorios.
- ❖ La ausencia de MOK en células de microglía MOK-KO en condiciones de LPS predice mediante análisis de RNA-Seq la regulación negativa de numerosos actores moleculares proinflamatorios y la activación de moduladores antiinflamatorios.
- ❖ La respuesta inflamatoria modulada por MOK se debe en gran medida a su actividad quinasa, viéndose este fenotipo revertido en células de microglía MOK-KO cuando se sobreexpresa la versión silvestre de MOK.
- ❖ Medios condicionados por células de microglía WT estimulada con LPS tienen un impacto negativo en la viabilidad de cultivos de motoneuronas primarias, no reproducible si estos medios son condicionados por células de microglía MOK-KO.
- ❖ MOK regula el estado de fosforilación del residuo crítico Ser492 de Brd4 y modula la unión de Brd4 a promotores de citoquinas proinflamatorias.
- ❖ El eje bpMOK-pBrd4<sup>Ser492</sup> de respuesta a LPS se encuentra alterado en tejido de médula espinal de ratones SOD1<sup>G93A</sup> en etapas pre-sintomáticas.
- ❖ Los niveles de la forma activa de MOK, bpMOK, se encuentran alterados positivamente en células de médula espinal, tanto en animales transgénicos TDP-43<sup>A315T</sup> como en pacientes de ELA.

- ❖ La microglía aislada de médulas espinales de ratones SOD1 en etapas sintomáticas tempranas presenta altos niveles de bpMOK.
- ❖ La administración recurrente de C13 durante un periodo de tiempo limitado en animales SOD1<sup>G93A</sup> a partir del estadio pre-sintomático reduce la activación de la microglía, los niveles de pBrd4<sup>Ser492</sup> en la corteza motora y modifica el transcurso de la enfermedad.



# BIBLIOGRAFÍA

---



## 8. Bibliografía

- Ahmed, R. M., Devenney, E. M., Strikwerda-Brown, C., Hodges, J. R., Piguet, O. & Kiernan, M. C. (2020). Phenotypic variability in ALS-FTD and effect on survival. *Neurology*, *94*(19), E2005–E2013. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000009398>
- Ali, H. A., Li, Y., Bilal, A. H. M., Qin, T., Yuan, Z. & Zhao, W. (2022). A Comprehensive Review of BET Protein Biochemistry, Physiology, and Pathological Roles. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.818891>
- Amable, L., Grankvist, N., Largen, J. W., Ortsäter, H., Sjöholm, Å. & Honkanen, R. E. (2011). Disruption of serine/threonine protein phosphatase 5 (PP5: PPP5c) in mice reveals a novel role for PP5 in the regulation of ultraviolet light-induced phosphorylation of serine/threonine protein kinase Chk1 (CHEK1). *Journal of Biological Chemistry*, *286*(47), 40413–40422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244053>
- Amado, D. A. & Davidson, B. L. (2021). Gene therapy for ALS: A review. *Molecular Therapy*, *29*(12), 3345–3358. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.008>
- Amor, S., Nutma, E., Marzin, M. & Puentes, F. (2021). Imaging immunological processes from blood to brain in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology*, *206*(3), 301–313. <https://doi.org/10.1111/cei.13660>
- An, J., Cao, X., Feng, M., Hu, B., Wu, J., Gang, Y., Jian, S. & Wen, C. (2022). MAPK/MAK/MRK overlapping kinase mediated apoptosis through caspase signaling pathway from *Cristaria plicata*. *Developmental and Comparative Immunology*, *133*, 104427. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104427>
- Angelim, M. K. S. C., Maia, L. M. S. de S., Mouffle, C., Ginhoux, F., Low, D., Amancio-Dos-Santos, A., Makhoul, J., Le Corronc, H., Mangin, J. M. & Legendre, P. (2018). Embryonic macrophages and microglia ablation alter the development of dorsal root ganglion sensory neurons in mouse embryos. *Glia*, *66*(11), 2470–2486. <https://doi.org/10.1002/glia.23499>
- 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>
- Armada-Moreira, A., Gomes, J. I., Pina, C. C., Savchak, O. K., Gonçalves-Ribeiro, J., Rei, N., Pinto, S., Morais, T. P., Martins, R. S., Ribeiro, F. F., Sebastião, A. M., Crunelli, V. & Vaz, S. H. (2020). Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 1–27. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00090>
- Baek, M., Yoo, E., Choi, H. I., An, G. Y., Chai, J. C., Lee, Y. S., Jung, K. H. & Chai, Y. G. (2021). The BET inhibitor attenuates the inflammatory response and cell migration in human microglial HMC3 cell line. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87828-1>
- Bagyinszky, E., Hulme, J. & An, S. S. A. (2023). Studies of Genetic and Proteomic Risk Factors of Amyotrophic Lateral Sclerosis Inspire Biomarker Development and Gene Therapy. *Cells*, *12*(15). <https://doi.org/10.3390/cells12151948>

- Bandukwala, H. S., Gagnon, J., Togher, S., Greenbaum, J. A., Lamperti, E. D., Parr, N. J., Molesworth, A. M. H., Smithers, N., Lee, K., Witherington, J., Tough, D. F., Prinjha, R. K., Peters, B. & Rao, A. (2012). Selective inhibition of CD4+ T-cell cytokine production and autoimmunity by BET protein and c-Myc inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36), 14532–14537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212264109>
- Bao, Y., Wu, X., Chen, J., Hu, X., Zeng, F., Cheng, J., Jin, H., Lin, X. & Chen, L. F. (2017). Brd4 modulates the innate immune response through Mnk2-eIF4E pathway-dependent translational control of IκBα. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(20), E3993–E4001. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700109114>
- Barrett, E., Brothers, S., Wahlestedt, C. & Beurel, E. (2014). I-BET151 selectively regulates IL-6 production. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(9), 1549–1555. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.013>
- Becker, L. A., Huang, B., Bieri, G., Ma, R., Knowles, D. A., Jafar-nejad, P., Messing, J., Kim, H. J., Soriano, A., Pulst, S. M., Taylor, J. P., Rigo, F. & Gitler, A. D. (2017). Therapeutic reduction of ataxin 2 extends lifespan and reduces pathology in TDP-43 mice. *Nature*, 544(7650), 367–371. <https://doi.org/10.1038/nature22038>
- Beers, D. R. & Appel, S. H. (2019). Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. *The Lancet Neurology*, 18(2), 211–220. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30394-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30394-6)
- Beers, D. R., Henkel, J. S., Zhao, W., Wang, J., Huang, A., Wen, S., Liao, B. & Appel, S. H. (2011). Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 134(5), 1293–1314. <https://doi.org/10.1093/brain/awr074>
- Beghi, E., Chiò, A., Couratier, P., Esteban, J., Hardiman, O., Logroscino, G., Millul, A., Mitchell, D., Preux, P.-M., Pupillo, E., Stevic, Z., Swigler, R., Traynor, B. J., Van den Berg, L. H., Veldink, J. H. & Zoccollella, S. (2011). The epidemiology and treatment of ALS: Focus on the heterogeneity of the disease and critical appraisal of therapeutic trials. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.3109/17482968.2010.502940>
- Bennett, S. A., Tanaz, R., Cobos, S. N. & Torrente, M. P. (2019). Epigenetics in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Role for Histone Post Translational Modifications in Neurodegenerative Disease. *Translational Research*, 204, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.10.002>
- Bernath, A. K., Murray, T. E., (Shirley) Yang, S., Gibon, J. & Klegeris, A. (2023). Microglia secrete distinct sets of neurotoxins in a stimulus-dependent manner. *Brain Research*, 1807, 148315. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148315>
- Berson, A., Nativio, R., Berger, S. L. & Bonini, N. M. (2018). Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. *Trends in Neurosciences*, 41(9), 587–598. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.05.005>
- Bhagwat, A. S., Roe, J. S., Mok, B. Y. L., Hohmann, A. F., Shi, J. & Vakoc, C. R. (2016). BET Bromodomain Inhibition Releases the Mediator Complex from Select cis-Regulatory Elements. *Cell Reports*, 15(3), 519–530. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.054>

- Blair, H. A. (2023). Tofersen: First Approval. *Drugs*, 83(11), 1039–1043. <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01904-6>
- Block, M. L., Zecca, L. & Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), 57–69. <https://doi.org/10.1038/nrn2038>
- Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kassiotis, G., Kollias, G. & Cleveland, D. W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, 312(5778), 1389–1392. <https://doi.org/10.1126/science.1123511>
- Bossuyt, J., Van Den Herrewegen, Y., Nestor, L., Buckinx, A., De Bundel, D. & Smolders, I. (2023). Chemogenetic modulation of astrocytes and microglia: State-of-the-art and implications in neuroscience. *GLIA*, 71(9), 2071–2095. <https://doi.org/10.1002/glia.24390>
- Bravo, A., de Lucio, H., Sánchez-Murcia, P. A., Jiménez-Ruiz, A., Petrone, P. M., Gago, F. & Cortés Cabrera, A. (2019). Identification of NEK3 and MOK as novel targets for lithium. *Chemical Biology and Drug Design*, 93(5), 965–969. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13487>
- Brites, D. & Vaz, A. R. (2014). Microglia centered pathogenesis in ALS: Insights in cell interconnectivity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00117>
- Broekhuis, J. R., Verhey, K. J. & Jansen, G. (2014). Regulation of cilium length and intraflagellar transport by the RCK-kinases ICK and MOK in renal epithelial cells. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108470>
- Broom, H. R., Rumpf, J. A. O., Vassall, K. A. & Meiring, E. M. (2015). Destabilization of the dimer interface is a common consequence of diverse ALS-associated mutations in metal free SOD1. *Protein Science*, 24(12), 2081–2089. <https://doi.org/10.1002/pro.2803>
- Brown, A. L., Wilkins, O. G., Keuss, M. J., Hill, S. E., Zanovello, M., Lee, W. C., Bampton, A., Lee, F. C. Y., Masino, L., Qi, Y. A., Bryce-Smith, S., Gatt, A., Hallegger, M., Fagegaltier, D., Phatnani, H., NYGC ALS Consortium, Newcombe, J., Gustavsson, E. K., Seddighi, S., Reyes, J. F., ... Fratta, P. (2022). TDP-43 loss and ALS-risk SNPs drive mis-splicing and depletion of UNC13A. *Nature*, 603(7899), 131–137. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04436-3>
- Brown, R. H., Phil, D. & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 377, 162–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-03432-6.50074-X>
- Buss, H., Handschick, K., Jurrmann, N., Pekkonen, P., Beuerlein, K., Müller, H., Wait, R., Saklatvala, J., Ojala, P. M., Schmitz, M. L., Naumann, M. & Kracht, M. (2012). Cyclin-Dependent Kinase 6 Phosphorylates NF- $\kappa$ B P65 at Serine 536 and Contributes to the Regulation of Inflammatory Gene Expression. *PLoS ONE*, 7(12), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051847>
- Caballero-Hernandez, D., Toscano, M. G., Cejudo-Guillen, M., Garcia-Martin, M. L., Lopez, S., Franco, J. M., Quintana, F. J., Roodveldt, C. & Pozo, D. (2016). The “Omics” of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Trends in Molecular Medicine*, 22(1), 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.11.001>
- Cai, M. D., Lee, K. W., Choi, S. M. & Yang, E. J. (2015). TDP-43 modification in the hSOD1G93A amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neurological Research*, 37(3), 253–262. <https://doi.org/10.1179/1743132814Y.0000000443>

- Cereda, C., Baiocchi, C., Bongioanni, P., Cova, E., Guareschi, S., Metelli, M. R., Rossi, B., Sbalsi, I., Cuccia, M. C. & Ceroni, M. (2008). TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients. *Journal of Neuroimmunology*, *194*(1–2), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.10.028>
- Cha, H. J., Kim, J., Hong, S. M., Hong, S. J., Park, J. H., Kim, E. S., Wang, H. J., Choi, Y. J., Do, I. G., Joh, J. W., Kim, D. S. & Choi, K. Y. (2012). Overexpression of renal tumor antigen is associated with tumor invasion and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, *19*(3), 404–411. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1856-3>
- Chang, R., Dai, J., Wang, L., Liu, H., Jiang, H., Liu, X., Jiang, L., He, F. & Hu, L. (2023). PIGF/FLT-1 deficiency leads to reduced STAT3-C/EBP $\beta$  signaling and aberrant polarization in decidual macrophages during early spontaneous abortion. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1061949>
- Chapman, L., Cooper-Knock, J. & Shaw, P. J. (2023). Physical activity as an exogenous risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Brain*, *146*(5), 1745–1757. <https://doi.org/10.1093/brain/awac470>
- Chen, G. Y. & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, *10*(12), 826–837. <https://doi.org/10.1038/nri2873>
- Chen, L., Wang, N., Zhang, Y., Li, D., He, C., Li, Z., Zhang, J. & Guo, Y. (2023). Proteomics analysis indicates the involvement of immunity and inflammation in the onset stage of SOD1-G93A mouse model of ALS. *Journal of Proteomics*, *272*(45), 104776. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104776>
- Chen, M., Guo, X., Guo, J., Shi, C., Wu, Y., Chen, L., Mao, R. & Fan, Y. (2024). Cytoplasmic Accumulation of Histones Induced by BET Inhibition Protects Cells from C9orf72 Poly(PR)-Induced Cell Death. *Advanced Biology*, *2300334*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/adbi.202300334>
- Chen, T., Wu, D., Moskaluk, C. A. & Fu, Z. (2013). Distinct expression patterns of ICK/MAK/MOK protein kinases in the intestine implicate functional diversity. *PLoS ONE*, *8*(11), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079359>
- Chen, X., Wu, T., Du, Z., Kang, W., Xu, R., Meng, F., Liu, C., Chen, Y., Bao, Q., Shen, J., You, Q., Cao, D., Jiang, Z. & Guo, X. (2024). Discovery of a brain-permeable bromodomain and extra terminal domain (BET) inhibitor with selectivity for BD1 for the treatment of multiple sclerosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *265*, 116080. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.116080>
- Chennampally, P., Sayed-Zahid, A., Soundararajan, P., Sharp, J., Cox, G. A., Collins, S. D. & Smith, R. L. (2021). A microfluidic approach to rescue ALS motor neuron degeneration using rapamycin. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97405-1>
- Chiang, C.-M. (2016). Phospho-BRD4: Transcription Plasticity and Drug Targeting Cheng-Ming. *Drug Discov Today Technol*, *19*, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2016.05.003>
- Chiu, I. M., Morimoto, E. T. A., Goodarzi, H., Liao, J. T., Keeffe, S. O., Phatnani, H. P., Muratet, M., Carroll, M. C., Levy, S., Tavazoie, S., Myers, R. M. & Maniatis, T. (2013). A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep*, *4*(2), 385–401. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.018.A>

- Cho, K., Yoon, D., Yu, M., Peachey, N. S., Ferreira, P. A., Foundation, C. C., Stokes, L., Veterans, C. & Medical, A. (2020). Microglial activation in an amyotrophic lateral sclerosis-like model caused by Ranbp2 loss and nucleocytoplasmic transport impairment in retinal ganglion neurons. *Cell Mol Life Sci*, 76(17), 3407–3432. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03078-5>.
- Cho, M. J., Lee, H. G., Yoon, J. W., Kim, G. R., Koo, J. H., Taneja, R., Edelson, B. T., Lee, Y. J. & Choi, J. M. (2023). Steady-state memory-phenotype conventional CD4+ T cells exacerbate autoimmune neuroinflammation in a bystander manner via the Bhlhe40/GM-CSF axis. *Experimental and Molecular Medicine*, 55(5), 1033–1045. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00995-1>
- Choi, H. J., Cha, S. J., Lee, J. W., Kim, H. J. & Kim, K. (2020). Recent advances on the role of gsk3 $\beta$  in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Sciences*, 10(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/brainsci10100675>
- Chou, C. C., Zhang, Y., Umoh, M. E., Vaughan, S. W., Lorenzini, I., Liu, F., Sayegh, M., Donlin-Asp, P. G., Chen, Y. H., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Powers, M. A., Kukar, T., Hales, C. M., Gearing, M., Cairns, N. J., Boylan, K. B., Dickson, D. W., Rademakers, R., ... Rossoll, W. (2018). TDP-43 pathology disrupts nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic transport in ALS/FTD. *Nature Neuroscience*, 21(2), 228–239. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0047-3>
- Cirulli, E. T., Lasseigne, B. N., Petrovski, S., Sapp, P. C., Dion, P. A., Leblond, C. S., Couthouis, J., Lu, Y. F., Wang, Q., Krueger, B. J., Ren, Z., Keebler, J., Han, Y., Levy, S. E., Boone, B. E., Wimbish, J. R., Waite, L. L., Jones, A. L., Carulli, J. P., Day-Williams, A. G., ... Goldstein, D. B. (2015). Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science*, 347(6229), 1436–1441. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3650>
- Colonna, M. & Butovsky, O. (2017). Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35, 441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- Conti, A., Riva, N., Pesca, M., Iannaccone, S., Cannistraci, C. V., Corbo, M., Previtali, S. C., Quattrini, A. & Alessio, M. (2014). Increased expression of Myosin binding protein H in the skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.013>
- Cook, M. E., Jarjour, N. N., Lin, C.-C. & Edelson, B. T. (2020). The transcription factor Bhlhe40 in immunity and autoimmunity. *Trends Immunol*, 41(11), 1023–1036. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.09.002>
- Coulthard, M. G., Morgan, M., Woodruff, T. M., Arumugam, T. V., Taylor, S. M., Carpenter, T. C., Lackmann, M. & Boyd, A. W. (2012). Eph/ephrin signaling in injury and inflammation. *American Journal of Pathology*, 181(5), 1493–1503. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.043>
- Cuadrado, A. (2022). Brain-Protective Mechanisms of Transcription Factor NRF2: Toward a Common Strategy for Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 62, 255–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-052220-103416>
- da Costa, A. A. B. A., Chowdhury, D., Shapiro, G. I., D'Andrea, A. D. & Konstantinopoulos, P. A. (2023). Targeting replication stress in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(1), 38–58. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00558-5>

- Dang, C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell*, 149(1), 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003>
- Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M. & Amit, I. (2018). Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*, 173(5), 1073–1081. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.003>
- 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., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., Wszolek, Z. K., ... 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>
- Delgado-Morales, R. (Ed.). (2017). *Neuroepigenomics in aging and disease: proteomics, metabolomics, interactomics and systems biology*. Advances in Experimental Medicine and Biology (978). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53889-1>
- DeMars, K. M., Yang, C. & Candelario-Jalil, E. (2019). Neuroprotective effects of targeting BET proteins for degradation with dBET1 in aged mice subjected to ischemic stroke. *Neurochemistry International*, 127, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.03.004>
- DeMars, K. M., Yang, C., Castro-Rivera, C. I. & Candelario-Jalil, E. (2018). Selective degradation of BET proteins with dBET1, a proteolysis-targeting chimera, potently reduces pro-inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497(1), 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.096>
- Demuro, S., Di Martino, R. M. C., Ortega, J. A. & Cavalli, A. (2021). Gsk-3 $\beta$ , fyn, and dyrk1a: Master regulators in neurodegenerative pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22169098>
- Dennys, C., Baggio, C., Rodrigo, R., Roussel, F., Kulnich, A., Heintzman, S., Fox, A., Kolb, S. J., Shaw, P. J., Ethell, I. M., Pellecchia, M. & Meyer, K. C. (2022). EphA4 targeting agents protect motor neurons from cell death induced by amyotrophic lateral sclerosis -astrocytes. *iScience*, 25(9), 104877. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104877>
- Deora, V., Lee, J. D., Albornoz, E. A., McAlary, L., Jagaraj, C. J., Robertson, A. A. B., Atkin, J. D., Cooper, M. A., Schroder, K., Yerbury, J. J., Gordon, R. & Woodruff, T. M. (2020). The microglial NLRP3 inflammasome is activated by amyotrophic lateral sclerosis proteins. *Glia*, 68(2), 407–421. <https://doi.org/10.1002/glia.23728>
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K. & Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399(6735), 491–496. <https://doi.org/10.1038/20974>
- Dominguez, S. L., Earr, T., Dourado, M., Ngu, H., Meilandt, W. J. & Hanson, J. E. (2020). Inducible EphA4 knockout causes motor deficits in young mice and is not protective in the SOD1G93A mouse model of ALS. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72723-y>
- El Mendili, M. M., Querin, G., Bede, P. & Pradat, P. F. (2019). Spinal cord imaging in amyotrophic lateral sclerosis: Historical concepts—novel techniques. *Frontiers in Neurology*, 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00350>



- European Medicines Agency. (2024, 23, 2). New treatment for rare motor neurone disease recommended for approval. [Comunicado de prensa]  
<https://www.ema.europa.eu/en/news/new-treatment-rare-motor-neurone-disease-recommended-approval>
- Faivre, E. J., McDaniel, K. F., Albert, D. H., Mantena, S. R., Plotnik, J. P., Wilcox, D., Zhang, L., Bui, M. H., Sheppard, G. S., Wang, L., Sehgal, V., Lin, X., Huang, X., Lu, X., Uziel, T., Hessler, P., Lam, L. T., Bellin, R. J., Mehta, G., ... Shen, Y. (2020). Selective inhibition of the BD2 bromodomain of BET proteins in prostate cancer. *Nature*, *578*(7794), 306–310.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-1930-8>
- Falcão de Campos, C., Gromicho, M., Uysal, H., Grosskreutz, J., Kuzma-Kozakiewicz, M., Oliveira Santos, M., Pinto, S., Petri, S., Swash, M. & de Carvalho, M. (2021). Delayed Diagnosis and Diagnostic Pathway of ALS Patients in Portugal: Where Can We Improve? *Frontiers in Neurology*, *12*, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.761355>
- Fang, T., Je, G., Pacut, P., Keyhanian, K., Gao, J. & Ghasemi, M. (2022). Gene Therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*, *11*(13). <https://doi.org/10.3390/cells11132066>
- Feldman, E. L., Goutman, S. A., Petri, S., Mazzini, L., Savelieff, M. G., Shaw, P. J. & Sobue, G. (2022). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, *400*(10360), 1363–1380.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01272-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01272-7)
- Festa, L. K., Grinspan, J. B. & Jordan-Sciutto, K. L. (2023). White matter injury across neurodegenerative disease. *Trends in Neurosciences*, *47*(1), 47–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.11.003>
- Freischmidt, A., Wieland, T., Richter, B., Ruf, W., Schaeffer, V., Müller, K., Marroquin, N., Nordin, F., Hübers, A., Weydt, P., Pinto, S., Press, R., Millecamps, S., Molko, N., Bernard, E., Desnuelle, C., Soriani, M. H., Dorst, J., Graf, E., ... Weishaupt, J. H. (2015). Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nature Neuroscience*, *18*(5), 631–636. <https://doi.org/10.1038/nn.4000>
- García-García, R., Martín-Herrero, L., Blanca-Pariente, L., Pérez-Cabello, J. & Roodveldt, C. (2021). Immune signaling kinases in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 1–15.  
<https://doi.org/10.3390/ijms222413280>
- Garske, A. L., Peters, U., Cortesi, A. T., Perez, J. L. & Shokat, K. M. (2011). Chemical genetic strategy for targeting protein kinases based on covalent complementarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(37), 15046–15052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111239108>
- Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J. P., Van Der Spek, C. W., Patard, J. J., Boon, T., Schrier, P. & Van Den Eynde, B. J. (1996). A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics*, *44*(5), 323–330. <https://doi.org/10.1007/BF02602776>
- Geloso, M. C., Corvino, V., Marchese, E., Serrano, A., Michetti, F. & D'Ambrosi, N. (2017). The dual role of microglia in ALS: Mechanisms and therapeutic approaches. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00242>
- Genge, A. & Chio, A. (2023). The future of ALS diagnosis and staging: where do we go from here? *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, *24*(3–4), 165–174.  
<https://doi.org/10.1080/21678421.2022.2150555>

- Gerbino, V., Kaunga, E., Ye, J., Canzio, D., O’Keeffe, S., Rudnick, N. D., Guarnieri, P., Lutz, C. M. & Maniatis, T. (2020). The Loss of TBK1 Kinase Activity in Motor Neurons or in All Cell Types Differentially Impacts ALS Disease Progression in SOD1 Mice. *Neuron*, 106(5), 789-805.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.005>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M. & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- 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, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.03.012>
- Gomes, L. C. (2024). Multiomic ALS signatures highlight sex differences and molecular subclusters and 2 identify the MAPK pathway as therapeutic target. *Preprint*. <https://doi.org/10.1101/2023.08.14.553180>
- González, H. & Pacheco, R. (2014). T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0201-8>
- Goutman, S. A., Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chió, A., Savelieff, M. G., Kiernan, M. C. & Feldman, E. L. (2022). Emerging insights into the complex genetics and pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology*, 21(5), 465–479. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00414-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00414-2)
- Gunosewoyo, H., Yu, L., Munoz, L. & Kassiou, M. (2017). Kinase targets in CNS drug discovery. *Future medicinal chemistry*, 9(3), 303–314. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-021>
- Günther, R., Balck, A., Koch, J. C., Nientiedt, T., Sereda, M., Bähr, M., Lingor, P. & Tönges, L. (2017). Rho kinase inhibition with fasudil in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis-symptomatic treatment potential after disease onset. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00017>
- Guo, S., Wang, H. & Yin, Y. (2022). Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 815347. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.815347>
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R. L. & Siddique, T. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264(5166), 1772–1775. <https://doi.org/10.1126/science.8209258>
- Gyawali, A., Hyeon, S. J., Ryu, H. & Kang, Y. S. (2021). The alteration of l-carnitine transport and pretreatment effect under glutamate cytotoxicity on motor neuron-like NSC-34 lines. *Pharmaceutics*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040551>
- Hang, J., Ouyang, H., Wei, F., Zhong, Q., Yuan, W., Jiang, L. & Liu, Z. (2022). Proteomics and phosphoproteomics of chordoma biopsies reveal alterations in multiple pathways and aberrant kinases activities. *Frontiers in Oncology*, 12, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.941046>

- He, Q., Zuo, Z., Song, K., Wang, W., Yu, L., Tang, Z., Hu, S., Li, L., Luo, H., Chen, Z., Liu, J., Lin, B., Luo, J., Jiang, Y., Huang, Q. & Guo, X. (2023). Keratin7 and Desmoplakin are involved in acute lung injury induced by sepsis through RAGE. *International Immunopharmacology*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110867>
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L. C., Means, T. K. & El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1896–1905. <https://doi.org/10.1038/nn.3554>
- Hounoum, B. M., Vourc'h, P., Felix, R., Corcia, P., Patin, F., Guéguinou, M., Potier-Cartereau, M., Vandier, C., Raoul, C., Andres, C. R., Mavel, S. & Blasco, H. (2016). NSC-34 motor neuron-like cells are unsuitable as experimental model for glutamate-mediated excitotoxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00118>
- Hu, X., Zhang, H., Zhang, Q., Yao, X., Ni, W. & Zhou, K. (2022). Emerging role of STING signalling in CNS injury: inflammation, autophagy, necroptosis, ferroptosis and pyroptosis. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02602-y>
- Huang, Y., Ollikainen, M., Sipilä, P., Mustelin, L., Wang, X., Su, S., Huan, T., Levy, D., Wilson, J., Snieder, H., Kaprio, J. & Wang, X. (2018). Genetic and Environmental Effects on Gene Expression Signatures of Blood Pressure: A Transcriptome-Wide Twin Study. *Hypertension*, 71(3), 457–464. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10527>
- Hui, Z., Fu, Y., Chen, Y., Yin, J., Fang, H., Tu, Y., Gu, Y. & Zhang, J. (2023). Loss of TRIM24 promotes IL-10 expression via CBP/p300-dependent IFN $\beta$ 1 transcription during macrophage activation. *Inflammation Research*, 72(7), 1441–1452. <https://doi.org/10.1007/s00011-023-01751-x>
- Huusko, J. M., Karjalainen, M. K., Graham, B. E., Zhang, G., Farrow, E. G., Miller, N. A., Jacobsson, B., Eidem, H. R., Murray, J. C., Bedell, B., Breheny, P., Brown, N. W., Bødker, F. L., Litterman, N. K., Jiang, P. P., Russell, L., Hinds, D. A., Hu, Y., Rokas, A., ... Muglia, L. J. (2018). Erratum: Correction: Whole exome sequencing reveals HSPA1L as a genetic risk factor for spontaneous preterm birth. *PLoS Genetics*, 14(9), e1007673. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007673>
- Ingre, C., Roos, P. M., Piehl, F., Kamel, F. & Fang, F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Epidemiology*, 7, 181–193. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S37505>
- Irwin, K. E., Jasin, P., Braunstein, K. E., Sinha, I., Bowden, K. D., Moghekar, A., Oh, E. S., Raitcheva, D., Bartlett, D., Berry, J. D., Traynor, B., Ling, J. P. & Wong, P. C. (2023). A fluid biomarker reveals loss of TDP-43 splicing repression in pre-symptomatic ALS. *Nature Medicine*, 43. <https://doi.org/10.1101/2023.01.23.525202>
- Jaiswal, M. K. (2019). Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Medicinal Research Reviews*, 39(2), 733–748. <https://doi.org/10.1002/med.21528>
- Jara, J. H., Genç, B., Stanford, M. J., Pytel, P., Roos, R. P., Weintraub, S., Mesulam, M. M., Bigio, E. H., Miller, R. J. & Özdinler, P. H. (2017). Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0896-4>
- Jarusch, J., Neuenroth, L., Andag, R., Leha, A., Fischer, A., Asif, A. R., Lenz, C. & Eidizadeh, A. (2022). Influence of Shear Stress, Inflammation and BRD4 Inhibition on Human

- Endothelial Cells: A Holistic Proteomic Approach. *Cells*, 11(19).  
<https://doi.org/10.3390/cells11193086>
- Jauregui, C., Blanco-Luquin, I., Macías, M., Roldan, M., Caballero, C., Pagola, I., Mendioroz, M. & Jericó, I. (2023). Exploring the Disease-Associated Microglia State in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomedicines*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112994>
- Jeon, G. S., Shim, Y. M., Lee, D. Y., Kim, J. S., Kang, M. J., Ahn, S. H., Shin, J. Y., Geum, D., Hong, Y. H. & Sung, J. J. (2019). Pathological Modification of TDP-43 in Amyotrophic Lateral Sclerosis with SOD1 Mutations. *Molecular Neurobiology*, 56(3), 2007–2021.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1218-2>
- Ji, L., Li, T., Chen, H., Yang, Y., Lu, E., Liu, J., Qiao, W. & Chen, H. (2023). The crucial regulatory role of type I interferon in inflammatory diseases. *Cell and Bioscience*, 13(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13578-023-01188-z>
- John, Z. (2012). Regulations and Functions of ICK/MAK/MOK - A Novel MAPK-Related Kinase Family Linked to Human Diseases. *InTech*, 1. <https://doi.org/10.5772/37964>
- Kaur, K., Chen, P. C., Ko, M. W., Mei, A., Chovatiya, N., Huerta-Yepez, S., Ni, W., Mackay, S., Zhou, J., Maharaj, D., Malarkannan, S. & Jewett, A. (2022). The Potential Role of Cytotoxic Immune Effectors in Induction, Progression and Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Cells*, 11(21). <https://doi.org/10.3390/cells11213431>
- Kaur, S. J., McKeown, S. R. & Rashid, S. (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*, 577(2), 109–118.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.049>
- Keating, S. S., San Gil, R., Swanson, M. E. V., Scotter, E. L. & Walker, A. K. (2022). TDP-43 pathology: From noxious assembly to therapeutic removal. *Progress in Neurobiology*, 211, 102229. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2022.102229>
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M. & Amit, I. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, 169(7), 1276-1290.e17.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>
- Kihira, T., Suzuki, A., Kondo, T., Wakayama, I., Yoshida, S., Hasegawa, K. & Garruto, R. M. (2009). Immunohistochemical expression of IGF-I and GSK in the spinal cord of Kii and Guamanian ALS patients: Original Article. *Neuropathology*, 29(5), 548–558.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2009.01010.x>
- Kim, G., Gautier, O., Tassoni-Tsuchida, E., Ma, X. R. & Gitler, A. D. (2020). ALS Genetics: Gains, Losses, and Implications for Future Therapies. *Neuron*, 108(5), 822–842.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.022>
- Kimura, T., Horikoshi, Y., Kuriyagawa, C. & Niiyama, Y. (2021). Rho/rock pathway and noncoding rnas: Implications in ischemic stroke and spinal cord injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111573>
- King, M. K., Pardo, M., Cheng, Y., Downey, K., Jope, R. S. & Beurel, E. (2014). Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: Rescuers of cognitive impairments. *Pharmacology & therapeutics*, 141(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.010>

- Kiper, V., Gary, A. & Geist, R. (2023). Navigating ALS: An overlooked disease. *Nursing*, *53*(2), 24–30. <https://doi.org/10.1097/01.NURSE.0000905700.44849.f4>
- Kiriyama, Y. & Nochi, H. (2015). The function of autophagy in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(11), 26797–26812. <https://doi.org/10.3390/ijms161125990>
- Koch, J. C., Kuttler, J., Maass, F., Lengenfeld, T., Zielke, E., Bähr, M. & Lingor, P. (2020). Compassionate Use of the ROCK Inhibitor Fasudil in Three Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Neurology*, *11*, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00173>
- Kofoed, E. M. & Vance, R. E. (2011). Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature*, *477*(7366), 592–595. <https://doi.org/10.1038/nature10394>
- Korb, E., Herre, M., Zucker-Scharff, I., Darnell, R. B. & Allis, C. D. (2015). BET protein Brd4 activates transcription in neurons and BET inhibitor Jq1 blocks memory in mice. *Nature Neuroscience*, *18*(10), 1464–1473. <https://doi.org/10.1038/nn.4095>
- Korobeynikov, V. A., Lyashchenko, A. K., Blanco-Redondo, B., Jafar-Nejad, P. & Shneider, N. A. (2022). Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Medicine*, *28*(1), 104–116. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01615-z>
- Kowalski, E. A., Chen, J., Hazy, A., Fritsch, L. E., Gudenschwager-Basso, E. K., Chen, M., Wang, X., Qian, Y., Zhou, M., Byerly, M., Pickrell, A. M., Matson, J. B., Allen, I. C. & Theus, M. H. (2019). Peripheral loss of EphA4 ameliorates TBI-induced neuroinflammation and tissue damage. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1605-2>
- Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., Beckers, L., O'Loughlin, E., Xu, Y., Fanek, Z., Greco, D. J., Smith, S. T., Tweet, G., Humulock, Z., Zrzavy, T., Conde-Sanroman, P., Gacias, M., Weng, Z., Chen, H., Tjon, E., ... Butovsky, O. (2017). The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*, *47*(3), 566–581.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.008>
- Kwon, H. S. & Koh, S. H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
- Leal-Lasarte, M. M., Franco, J. M., Labrador-Garrido, A., Pozo, D. & Roodveldt, C. (2017). Extracellular TDP-43 aggregates target MAPK/MAK/MRK overlapping kinase (MOK) and trigger caspase-3/IL-18 signaling in microglia. *FASEB Journal*, *31*(7), 2797–2816. <https://doi.org/10.1096/fj.201601163R>
- Lee, K., Jang, S. H., Tian, H. & Kim, S. J. (2020). NonO Is a Novel Co-factor of PRDM1 and Regulates Inflammatory Response in Monocyte Derived-Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01436>
- Lee, N. Y., & Kang, Y. S. (2017). Taurine Protects Glutamate Neurotoxicity in Motor Neuron Cells. *Advances in experimental medicine and biology*, *975*(2) 887–895. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1079-2\\_70](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1079-2_70)

- Lee, S. H. & Suk, K. (2017). Emerging roles of protein kinases in microglia-mediated neuroinflammation. *Biochemical Pharmacology*, 146, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.137>
- Leeds, P. R., Yu, F., Wang, Z., Chiu, C. T., Zhang, Y., Leng, Y., Linares, G. R. & Chuang, D. M. (2014). A new avenue for lithium: Intervention in traumatic brain injury. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(6), 422–433. <https://doi.org/10.1021/cn500040g>
- Li, Z., Wu, F., Xu, D., Zhi, Z. & Xu, G. (2019). Inhibition of TREM1 reduces inflammation and oxidative stress after spinal cord injury (SCI) associated with HO-1 expressions. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109, 2014–2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.159>
- Liang, Y., Tian, J. & Wu, T. (2021). BRD4 in physiology and pathology: “BET” on its partners. *BioEssays*, 43(12). <https://doi.org/10.1002/bies.202100180>
- Liao, B., Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S. & Appel, S. H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental Neurology*, 237(1), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.011>
- Liao, Y. Z., Ma, J. & Dou, J. Z. (2022). The Role of TDP-43 in Neurodegenerative Disease. *Molecular Neurobiology*, 59(7), 4223–4241. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02847-x>
- Lin, C. C., Bradstreet, T. R., Schwarzkopf, E. A., Jarjour, N. N., Chou, C., Archambault, A. S., Sim, J., Zinselmeier, B. H., Carrero, J. A., Wu, G. F., Taneja, R., Artyomov, M. N., Russell, J. H. & Edelson, B. T. (2016). IL-1-induced Bhlhe40 identifies pathogenic T helper cells in a model of autoimmune neuroinflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 213(2), 251–271. <https://doi.org/10.1084/jem.20150568>
- Lin, C. Y., Lovén, J., Rahl, P. B., Paranal, R. M., Burge, C. B., Bradner, J. E., Lee, T. I. & Young, R. A. (2012). Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell*, 151(1), 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.026>
- Ling, K. K., Jackson, M., Alkam, D., Liu, D., Allaire, N., Sun, C., Kiaei, M., McCampbell, A. & Rigo, F. (2018). Antisense-mediated reduction of EphA4 in the adult CNS does not improve the function of mice with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 114, 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.03.002>
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Rossie, S. & Gong, C. X. (2005). Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: Impairment in Alzheimer’s disease. *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 1790–1796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410775200>
- Liu, J. & Wang, F. (2017). Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Cellular mechanisms and therapeutic implications. *Frontiers in Immunology*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01005>
- Liu, L., Yang, C. & Candelario-Jalil, E. (2021). Role of BET Proteins in Inflammation and CNS Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.748449>
- Lo, U., Selvaraj, V., Plane, J. M., Chechneva, O. V., Otsu, K. & Deng, W. (2014). P38 $\alpha$  (MAPK14) critically regulates the immunological response and the production of specific cytokines and chemokines in astrocytes. *Scientific Reports*, 4, 1–18. <https://doi.org/10.1038/srep07405>

- Longinetti, E. & Fang, F. (2019). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: An update of recent literature. *Current Opinion in Neurology*, 32(5), 771–776. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000730>
- Lyon, M. S., Wosiski-Kuhn, M., Gillespie, R., Caress, J. & Milligan, C. (2019). Inflammation, Immunity, and amyotrophic lateral sclerosis: I. Etiology and pathology. *Muscle and Nerve*, 59(1), 10–22. <https://doi.org/10.1002/mus.26289>
- Ma, X. R., Prudencio, M., Koike, Y., Vatsavayai, S. C., Kim, G., Harbinski, F., Briner, A., Rodriguez, C. M., Guo, C., Akiyama, T., Schmidt, H. B., Cummings, B. B., Wyatt, D. W., Kurylo, K., Miller, G., Mekhoubad, S., Sallee, N., Mekonnen, G., Ganser, L., ... Gitler, A. D. (2022). TDP-43 represses cryptic exon inclusion in the FTD–ALS gene UNC13A. *Nature*, 603(7899), 124–130. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04424-7>
- Magistri, M., Velmeshev, D., Makhmutova, M., Patel, P., Sartor, G. C., Volmar, C. H., Wahlestedt, C. & Faghihi, M. A. (2016). The BET-Bromodomain Inhibitor JQ1 Reduces Inflammation and Tau Phosphorylation at Ser396 in the Brain of the 3xTg Model of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*, 13(9), 985–995. <https://doi.org/10.2174/1567205013666160427101832>
- Malaspina, A., Puentes, F. & Amor, S. (2015). Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: An immunology perspective. *International Immunology*, 27(3), 117–129. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu099>
- Mann, M. W., Fu, Y., Gearhart, R. L., Xu, X., Roberts, D. S., Li, Y., Zhou, J., Ge, Y. & Brasier, A. R. (2023). Bromodomain-containing Protein 4 regulates innate inflammation via modulation of alternative splicing. *Frontiers in Immunology*, 14, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1212770>
- Martella, N., Pensabene, D., Varone, M., Colardo, M., Petrarola, M., Sergio, W., La Rosa, P., Moreno, S. & Segatto, M. (2023). Bromodomain and Extra-Terminal Proteins in Brain Physiology and Pathology: BET-ing on Epigenetic Regulation. *Biomedicines*, 11(3), 1–30. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030750>
- Martínez-González, L., Gonzalo-Consuegra, C., Gómez-Almería, M., Porras, G., de Lago, E., Martín-Requero, Á. & Martínez, A. (2021). Tideglusib, a non-atp competitive inhibitor of gsk-3as a drug candidate for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168975>
- Martínez-Muriana, A., Mancuso, R., Francos-Quijorna, I., Olmos-Alonso, A., Osta, R., Perry, V. H., Navarro, X., Gomez-Nicola, D. & López-Vales, R. (2016). CSF1R blockade slows the progression of amyotrophic lateral sclerosis by reducing microgliosis and invasion of macrophages into peripheral nerves. *Scientific Reports*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep25663>
- Masi, M., Attanzio, A., Racchi, M., Wolozin, B., Borella, S., Biundo, F. & Buoso, E. (2022). Proteostasis Deregulation in Neurodegeneration and Its Link with Stress Granules: Focus on the Scaffold and Ribosomal Protein RACK1. *Cells*, 11(16), 1–24. <https://doi.org/10.3390/cells11162590>
- Masrori, P., Beckers, J., Gossye, H. & Van Damme, P. (2022). The role of inflammation in neurodegeneration: novel insights into the role of the immune system in C9orf72 HRE-mediated ALS/FTD. *Molecular Neurodegeneration*, 17(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00525-z>

- Masrori, P. & Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *European Journal of Neurology*, 27(10), 1918–1929. <https://doi.org/10.1111/ene.14393>
- Mazaheri, F., Snaidero, N., Kleinberger, G., Madore, C., Daria, A., Werner, G., Krasemann, S., Capell, A., Trümbach, D., Wurst, W., Brunner, B., Bultmann, S., Tahirovic, S., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., Butovsky, O. & Haass, C. (2017). TREM 2 deficiency impairs chemotaxis and microglial responses to neuronal injury. *EMBO Reports*, 18(7), 1186–1198. <https://doi.org/10.15252/embr.201743922>
- McCauley, M. E. & Baloh, R. H. (2019). Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathologica*, 137(5), 715–730. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1933-9>
- McCombe, P. A. & Henderson, R. D. (2010). Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gender Medicine*, 7(6), 557–570. <https://doi.org/10.1016/j.genm.2010.11.010>
- McGeer, P. L. & McGeer, E. G. (2002a). Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, 26(4), 459–470. <https://doi.org/10.1002/mus.10191>
- McGeer, P. L. & McGeer, E. G. (2002b). Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *Journal of NeuroVirology*, 8(6), 529–538. <https://doi.org/10.1080/13550280290100969>
- McGrath, M. S., Zhang, R., Bracci, P. M., Azhir, A. & Forrest, B. D. (2023). Regulation of the Innate Immune System as a Therapeutic Approach to Supporting Respiratory Function in ALS. *Cells*, 12(7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/cells12071031>
- McQuade, A., Kang, Y. J., Hasselmann, J., Jairaman, A., Sotelo, A., Coburn, M., Shabestari, S. K., Chadarevian, J. P., Fote, G., Tu, C. H., Danhash, E., Silva, J., Martinez, E., Cotman, C., Prieto, G. A., Thompson, L. M., Steffan, J. S., Smith, I., Davtayan, H., ... Blurton-Jones, M. (2020). Gene expression and functional deficits underlie TREM2-knockout microglia responses in human models of Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19227-5>
- Meijboom, K. E. & Brown, R. H. (2022). Approaches to Gene Modulation Therapy for ALS. *Neurotherapeutics*, 19(4), 1159–1179. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01285-w>
- Mejzini, R., Flynn, L. L., Pitout, I. L., Fletcher, S., Wilton, S. D. & Akkari, P. A. (2019). ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01310>
- Mifflin, L., Ofengeim, D. & Yuan, J. (2020). Receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) as a therapeutic target. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(8), 553–571. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0071-y>
- Miyata, Y., Akashi, M. & Nishida, E. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel member of the MAP kinase superfamily. *Genes to Cells*, 4(5), 299–309. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1999.00261.x>
- Miyata, Y., Ikawa, Y., Shibuya, M. & Nishida, E. (2001). Specific Association of a Set of Molecular Chaperones Including HSP90 and Cdc37 with MOK, a Member of the Mitogen-activated Protein Kinase Superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21841–21848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010944200>
- 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*, *345*(6201), 1192–1194. <https://doi.org/10.1126/science.1256800>
- Mogensen, T. H. (2019). IRF and STAT transcription factors - From basic biology to roles in infection, protective immunity, and primary immunodeficiencies. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03047>
- Moon, K. J., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H. S., Brady, J. N. & Ozato, K. (2005). The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Molecular Cell*, *19*(4), 523–534. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.027>
- Mora, J. S., Bradley, W. G., Chaverri, D., Hernández-Barral, M., Mascias, J., Gamez, J., Gargiulo-Monachelli, G. M., Moussy, A., Mansfield, C. D., Hermine, O. & Ludolph, A. C. (2021). Long-term survival analysis of masitinib in amyotrophic lateral sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, *14*, 1–16. <https://doi.org/10.1177/17562864211030365>
- Mora, J. S., Genge, A., Chio, A., Estol, C. J., Chaverri, D., Hernández, M., Marín, S., Mascias, J., Rodríguez, G. E., Povedano, M., Paipa, A., Dominguez, R., Gamez, J., Salvado, M., Lunetta, C., Ballario, C., Riva, N., Mandrioli, J., Moussy, A., ... Hermine, O. (2020). Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, *21*(1–2), 5–14. <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1632346>
- Morello, G., Spampinato, A. G. & Cavallaro, S. (2017). Neuroinflammation and ALS: Transcriptomic Insights into Molecular Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Mediators of Inflammation*, *2017*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/7070469>
- Morimoto, N., Nagai, M., Ohta, Y., Miyazaki, K., Kurata, T., Morimoto, M., Murakami, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Kamiya, T. & Abe, K. (2007). Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Research*, *1167*(1), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.045>
- Mou, Y., Li, M., Liu, M., Wang, J., Zhu, G. & Zha, Y. (2022). OPTN variants in ALS cases: a case report of a novel mutation and literature review. *Neurological Sciences*, *43*(9), 5391–5396. <https://doi.org/10.1007/s10072-022-06125-5>
- Moujalled, D., Strasser, A. & Liddell, J. R. (2021). Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death and Differentiation*, *28*(7), 2029–2044. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00814-y>
- Muromoto, R., Sato, A., Komori, Y., Nariya, K., Kitai, Y., Kashiwakura, J. ichi & Matsuda, T. (2022). Regulation of NFKBIZ gene promoter activity by STAT3, C/EBP $\beta$ , and STAT1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *613*, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.04.140>
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. & Narumiya, S. (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Letters*, *392*(2), 189–193. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00811-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00811-3)

- Natale, G., Biagioni, F., Busceti, C. L., Gambardella, S., Limanaqi, F. & Fornai, F. (2019). TREM receptors connecting bowel inflammation to neurodegenerative disorders. *Cells*, 8(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cells8101124>
- 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. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796), 130–133. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>
- Neumann, T., Herzog, V. A., Muhar, M., Von Haeseler, A., Zuber, J., Ameres, S. L. & Rescheneder, P. (2019). Quantification of experimentally induced nucleotide conversions in high-throughput sequencing datasets. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2849-7>
- Nicodeme, E., Jeffrey, K. L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., White, J., Kirilovsky, J., Rice, C. M., Lora, J. M., Prinjha, R. K., Lee, K. & Tarakhovsky, A. (2010). Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature*, 468(7327), 1119–1123. <https://doi.org/10.1038/nature09589>
- Oakes, J. A., Davies, M. C. & Collins, M. O. (2017). TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation. *Molecular Brain*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0287-x>
- Oehlich, N., Devitt, G., Linnebacher, M., Schwitalle, Y., Großkinski, S., Stevanovic, S. & Zöller, M. (2005). Generation of RAGE-1 and MAGE-9 peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte lines for transfer in patients with renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 117(2), 256–264. <https://doi.org/10.1002/ijc.21200>
- O'Rourke, J. G. (2016). C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1064.C9orf72>
- Paganoni, S., Macklin, E. A., Hendrix, S., Berry, J. D. & Elliott, M. A. (2020). Trial of Sodium Phenylbutyrate–Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med.*, 383(10), 919–930. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916945>. Trial
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M. E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G. C., ... Wyss-Coray, T. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110(21), 3458–3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>
- Pasetto, L., Pozzi, S., Castelnovo, M., Basso, M., Estevez, A. G., Fumagalli, S., De Simoni, M. G., Castellaneta, V., Bigini, P., Restelli, E., Chiesa, R., Trojsi, F., Monsurrò, M. R., Callea, L., Malešević, M., Fischer, G., Freschi, M., Tortarolo, M., Bendotti, C. & Bonetto, V. (2017). Targeting extracellular cyclophilin a reduces neuroinflammation and extends survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 37(6), 1413–1427. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2462-16.2016>
- Patin, F., Baranek, T., Vourc'h, P., Nadal-Desbarats, L., Goossens, J. F., Marouillat, S., Desein, A. F., Descat, A., Hounoum, B. M., Bruno, C., Watier, H., Si-Tahar, M., Leman, S., Lecron, J. C., Andres, C. R., Corcia, P. & Blasco, H. (2016). Combined Metabolomics and Transcriptomics Approaches to Assess the IL-6 Blockade as a Therapeutic of ALS:

- Deleterious Alteration of Lipid Metabolism. *Neurotherapeutics*, 13(4), 905–917.  
<https://doi.org/10.1007/s13311-016-0461-3>
- Patkar, O. L., Caruso, M., Teakle, N., Keshvari, S., Bush, S. J., Pridans, C., Belmer, A., Summers, K. M., Irvine, K. M. & Hume, D. A. (2021). Analysis of homozygous and heterozygous Csf1r knockout in the rat as a model for understanding microglial function in brain development and the impacts of human CSF1R mutations. *Neurobiology of Disease*, 151, 105268. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105268>
- Peferoen, L., Kipp, M., van der Valk, P., van Noort, J. M. & Amor, S. (2014). Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology*, 141(3), 302–313.  
<https://doi.org/10.1111/imm.12163>
- Pelham, C. J. & Agrawal, D. K. (2014). Emerging roles for triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family signaling in inflammatory diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(2), 243–256. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.866519>
- Peters, O. M., Ghasemi, M. & Brown Jr., R. H. (2015). Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS Find the latest version : Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 1767–1779.  
<https://doi.org/10.1172/JCI71601>.Protein
- 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, 1–36. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00025>
- Provenzano, F., Torazza, C., Bonifacino, T., Bonanno, G. & Milanese, M. (2023). The Key Role of Astrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Their Commitment to Glutamate Excitotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20).  
<https://doi.org/10.3390/ijms242015430>
- Qian, J., Chen, Q., Yao, D. M., Yang, L., Yang, J., Wen, X. M., Zhang, Y. Y., Chai, H. Y., Ma, J. C., Deng, Z. Q. & Lin, J. (2015). MOK overexpression is associated with promoter hypomethylation in patients with acute myeloid leukemia. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(1), 127–136.
- Quezada, E., Cappelli, C., Diaz, I., Jury, N., Wightman, N., Brown, R. H., Montecino, M. & van Zundert, B. (2021). BET bromodomain inhibitors PFI-1 and JQ1 are identified in an epigenetic compound screen to enhance C9ORF72 gene expression and shown to ameliorate C9ORF72-associated pathological and behavioral abnormalities in a C9ALS/FTD model. *Clinical Epigenetics*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01039-z>
- Roser, A. E., Tönges, L. & Lingor, P. (2017). Modulation of microglial activity by rho-kinase (rock) inhibition as therapeutic strategy in parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 1–8.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00094>
- Roskoski, R. (2023). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2023 update. *Pharmacological Research*, 187, 106552.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106552>
- Rudman, M. D., Choi, J. S., Lee, H. E., Tan, S. K., Ayad, N. G. & Lee, J. K. (2018). Bromodomain and extraterminal domain-containing protein inhibition attenuates acute

- inflammation after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 309, 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.08.005>
- Rué, L., Timmers, M., Lenaerts, A., Smolders, S., Poppe, L., de Boer, A., Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Robberecht, W. & Lemmens, R. (2019). Reducing EphA4 before disease onset does not affect survival in a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50615-0>
- Sahana, T. G. & Zhang, K. (2021). Mitogen-activated protein kinase pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomedicines*, 9(8), 969. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080969>
- Saini, A. & Chawla, P. A. (2023). Breaking barriers with tofersen: Enhancing therapeutic opportunities in amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neurology*, 1(2), 1–11. <https://doi.org/10.1111/ene.16140>
- Saitoh, Y. & Takahashi, Y. (2020). Riluzole for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative Disease Management*, 10(6), 343–355. <https://doi.org/10.2217/nmt-2020-0033>
- Sánchez-Ventura, J., Amo-Aparicio, J., Navarro, X. & Penas, C. (2019). BET protein inhibition regulates cytokine production and promotes neuroprotection after spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1511-7>
- Sasaki, S. (2011). Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70(5), 349–359. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182160690>
- Scekic-Zahirovic, J., Sendscheid, O., El Oussini, H., Jambeau, M., Sun, Y., Mersmann, S., Wagner, M., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., Drenner, K., Birling, M., Qiu, J., Zhou, Y., Li, H., Fu, X., Rouaux, C., Shelkvnikova, T., Witting, A., ... Dupuis, L. (2016). Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *The EMBO Journal*, 35(10), 1077–1097. <https://doi.org/10.15252/emj.201592559>
- Shan, X., Vocadlo, D. & Krieger, C. (2009). Mislocalization of TDP-43 in the G93A mutant SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Neuroscience Letters*, 458(2), 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.04.031>
- Shao, X. xiao, Xu, Y., Xiao, H. ying, Hu, Y. & Jiang, Y. (2023). Higenamine improves DSS-induced ulcerative colitis in mice through the Galectin-3/TLR4/NF-κB pathway. *Tissue and Cell*, 82, 102111. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2023.102111>
- Shefner, J. M., Bedlack, R., Andrews, J. A., Berry, J. D., Bowser, R., Brown, R., Glass, J. D., Maragakis, N. J., Miller, T. M., Rothstein, J. D. & Cudkovicz, M. E. (2022). Amyotrophic Lateral Sclerosis Clinical Trials and Interpretation of Functional End Points and Fluid Biomarkers: A Review. *JAMA Neurology*, 79(12), 1312–1318. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2022.3282>
- 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., Koutsodendris, N., ... 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>

- Siddique N. & Siddique T. (2001). Amyotrophic Lateral Sclerosis Overview [Updated 2023 Sep 28]. *GeneReviews*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK1450/>
- Sironi, F., De Marchi, F., Mazzini, L. & Bendotti, C. (2023). Cell therapy in ALS: An update on preclinical and clinical studies. *Brain Research Bulletin*, 194, 64–81. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.01.008>
- Song, G. J. & Suk, K. (2017). Pharmacological modulation of functional phenotypes of microglia in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00139>
- Sproviero, W., Shatunov, A., Stahl, D., Shoai, M., van Rheenen, W., Jones, A. R., Al-Sarraj, S., Andersen, P. M., Bonini, N. M., Conforti, F. L., Van Damme, P., Daoud, H., Del Mar Amador, M., Fogh, I., Forzan, M., Gaastra, B., Gellera, C., Gitler, A. D., Hardy, J., ... Al-Chalabi, A. (2017). ATXN2 trinucleotide repeat length correlates with risk of ALS. *Neurobiology of Aging*, 51, 178.e1-178.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.11.010>
- Sreedharan, J., Neukomm, L. J., Brown, R. H. & Freeman, M. R. (2015). Age-dependent TDP-43-mediated motor neuron degeneration requires GSK3, hat-trick, and xmas-2. *Current Biology*, 25(16), 2130–2136. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.045>
- Staats, K. A., Borchelt, D. R., Tansey, M. G. & Wymer, J. (2022). Blood-based biomarkers of inflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Neurodegeneration*, 17(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00515-1>
- Stankiewicz, T. R. & Linseman, D. A. (2014). Rho family GTPases: Key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00314>
- Sun, J., Gui, Y., Zhou, S. & Zheng, X. L. (2023). Unlocking the secrets of aging: Epigenetic reader BRD4 as the target to combatting aging-related diseases. *Journal of Advanced Research*. S2090-1232(23)00329-6 <https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.11.006>
- Sutter, P. A. & Crocker, S. J. (2022). Glia as antigen-presenting cells in the central nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 77. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102646>
- Suzuki, N., Nishiyama, A., Warita, H. & Aoki, M. (2023). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: seeking therapeutic targets in the era of gene therapy. *Journal of Human Genetics*, 68(3), 131–152. <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01055-8>
- Swarup, V., Phaneuf, D., Dupré, N., Petri, S., Strong, M., Kriz, J. & Julien, J. P. (2011). Deregulation of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis triggers nuclear factor κB-mediated pathogenic pathways. *Journal of Experimental Medicine*, 208(12), 2429–2447. <https://doi.org/10.1084/jem.20111313>
- Takahashi, S., Andreoletti, G., Chen, R., Munehira, Y., Batra, A., Afzal, N. A., Beattie, R. M., Bernstein, J. A., Ennis, S. & Snyder, M. (2017). De novo and rare mutations in the HSPA1L heat shock gene associated with inflammatory bowel disease. *Genome Medicine*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0394-9>
- Takata, M., Tanaka, H., Kimura, M., Nagahara, Y., Tanaka, K., Kawasaki, K., Seto, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M. & Hara, H. (2013). Fasudil, a rho kinase inhibitor, limits motor neuron loss in experimental models of amyotrophic lateral sclerosis. *British Journal of Pharmacology*, 170(2), 341–351. <https://doi.org/10.1111/bph.12277>

- Talbott, E. O., Malek, A. M. & Lacomis, D. (2016). The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handbook of clinical neurology*, 138, 225–238. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802973-2.00013-6>
- Tam, O. H., Rozhkov, N. V., Shaw, R., Kim, D., Hubbard, I., Fennessey, S., Propp, N., Phatnani, H., Kwan, J., Sareen, D., Broach, J. R., Simmons, Z., Arcila-Londono, X., Lee, E. B., Van Deerlin, V. M., Shneider, N. A., Fraenkel, E., Ostrow, L. W., Baas, F., ... 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, Y. F., Wang, M., Chen, Z. Y., Wang, L. & Liu, X. H. (2020). Inhibition of BRD4 prevents proliferation and epithelial–mesenchymal transition in renal cell carcinoma via NLRP3 inflammasome-induced pyroptosis. *Cell Death and Disease*, 11(4). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2431-2>
- Taylor, J. P., Brown, R. H. & Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*, 539(7628), 197–206. <https://doi.org/10.1038/nature20413>
- Thonhoff, J. R., Simpson, E. P. & Appel, S. H. (2018). Neuroinflammatory mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Current Opinion in Neurology*, 31(5), 635–639. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000599>
- Turner, M. R., Cagnin, A., Turkheimer, F. E., Miller, C. C. J., Shaw, C. E., Brooks, D. J., Leigh, P. N. & Banati, R. B. (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: An [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiology of Disease*, 15(3), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.012>
- Tzeplaeff, L., Wilfling, S., Requardt, M. V. & Herdick, M. (2023). Current State and Future Directions in the Therapy of ALS. *Cells*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/cells12111523>
- Uesaka, T. & Kageyama, N. (2004). Cdx2 homeodomain protein regulates the expression of MOK, a member of the mitogen-activated protein kinase superfamily, in the intestinal epithelial cells. *FEBS Letters*, 573(1–3), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.070>
- Urbanucci, A., Barfeld, S. J., Kytölä, V., Itkonen, H. M., Coleman, I. M., Vodák, D., Sjöblom, L., Sheng, X., Tolonen, T., Minner, S., Burdelski, C., Kivinummi, K. K., Kohvakka, A., Kregel, S., Takhar, M., Alshalalfa, M., Davicioni, E., Erho, N., Lloyd, P., ... Mills, I. G. (2017). Androgen Receptor Deregulation Drives Bromodomain-Mediated Chromatin Alterations in Prostate Cancer. *Cell Reports*, 19(10), 2045–2059. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.049>
- Urano, A. & Yamamoto, M. (2023). The KEAP1-NRF2 System and Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 38(13), 974–988. <https://doi.org/10.1089/ars.2023.0234>
- Uzureau, S., Coquerelle, C., Vermeiren, C., Uzureau, P., Van Acker, A., Pilotte, L., Monteyne, D., Acolty, V., Vanhollebeke, B., Van den Eynde, B., Pérez-Morga, D., Moser, M. & Pays, E. (2016). Apolipoproteins L control cell death triggered by TLR3/TRIF signaling in dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 46(8), 1854–1866. <https://doi.org/10.1002/eji.201546252>
- Van Hoecke, A., Schoonaert, L., Lemmens, R., Timmers, M., Staats, K. A., Laird, A. S., Peeters, E., Philips, T., Goris, A., Dubois, B., Andersen, P. M., Al-Chalabi, A., Thijs, V., Turnley, A.

- M., Van Vught, P. W., Veldink, J. H., Hardiman, O., Van Den Bosch, L., Gonzalez-Perez, P., ... Robberecht, W. (2012). EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans. *Nature Medicine*, *18*(9), 1418–1422. <https://doi.org/10.1038/nm.2901>
- Van Schoor, E., Ospitalieri, S., Moonen, S., Tomé, S. O., Ronisz, A., Ok, O., Weishaupt, J., Ludolph, A. C., Van Damme, P., Van Den Bosch, L. & Thal, D. R. (2022). Increased pyroptosis activation in white matter microglia is associated with neuronal loss in ALS motor cortex. *Acta Neuropathologica*, *144*(3), 393–411. <https://doi.org/10.1007/s00401-022-02466-9>
- Vance, C., Lehmann, R., Broihier, H. T., Moore, L. A., Lehmann, R., Lehmann, R., Davey, J., Nielsen, O., Varshavsky, A., Hamon, Y., Chimini, G., Gros, P., Whiteway, M., Thomas, D. Y., Casey, P. J., Ashby, M. N., Rine, J., Sapperstein, S. K., Clarke, S., ... Ohanessian, A. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, *323*, 1208–1211. <https://doi.org/10.1126/science.1165942>.Mutations
- Vidal-Taboada, J. M., Lopez-Lopez, A., Salvado, M., Lorenzo, L., Garcia, C., Mahy, N., Rodríguez, M. J. & Gamez, J. (2015). UNC13A confers risk for sporadic ALS and influences survival in a Spanish cohort. *Journal of Neurology*, *262*(10), 2285–2292. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7843-z>
- Visser, M. F. J. M., Heuberger, J. A. A. C., Groeneveld, G. J., Oude Nijhuis, J., De Deyn, P. P., Hadi, S., Harris, J., Tsai, R. M., Cruz-Herranz, A., Huang, F., Tong, V., Erickson, R., Zhu, Y., Scearce-Levie, K., Hsiao-Nakamoto, J., Tang, X., Chang, M., Fox, B. M., Estrada, A. A., ... Ho, C. (2022). Safety, pharmacokinetics and target engagement of novel RIPK1 inhibitor SAR443060 (DNL747) for neurodegenerative disorders: Randomized, placebo-controlled, double-blind phase I/II studies in healthy subjects and patients. *Clinical and Translational Science*, *15*(8), 2010–2023. <https://doi.org/10.1111/cts.13317>
- Wang, C. Y. & Filippakopoulos, P. (2015). Beating the odds: BETs in disease. *Trends in Biochemical Sciences*, *40*(8), 468–479. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.06.002>
- Wang, C., Zhang, E., Wu, F., Sun, Y., Wu, Y., Tao, B., Ming, Y., Xu, Y., Mao, R., Fan, Y. & Fu, H. (2019). The C-terminal low-complexity domain involved in liquid-liquid phase separation is required for BRD4 function in vivo. *Journal of Molecular Cell Biology*, *11*(9), 807–809. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz037>
- Wang, H., Huang, W., Liang, M., Shi, Y., Zhang, C., Li, Q., Liu, M., Shou, Y., Yin, H., Zhu, X., Sun, X., Hu, Y. & Shen, Z. (2018). (+)-JQ1 attenuated LPS-induced microglial inflammation via MAPK/NFκB signaling. *Cell and Bioscience*, *8*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0258-7>
- Wang, J., Chen, J., Jin, H., Lin, D., Chen, Y., Chen, X., Wang, B., Hu, S., Wu, Y., Wu, Y., Zhou, Y., Tian, N., Gao, W., Wang, X. & Zhang, X. (2019). BRD4 inhibition attenuates inflammatory response in microglia and facilitates recovery after spinal cord injury in rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *23*(5), 3214–3223. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14196>
- Wang, L. Q., Ma, Y., Yuan, H. Y., Zhao, K., Zhang, M. Y., Wang, Q., Huang, X., Xu, W. C., Dai, B., Chen, J., Li, D., Zhang, D., Wang, Z., Zou, L., Yin, P., Liu, C. & Liang, Y. (2022). Cryo-EM structure of an amyloid fibril formed by full-length human SOD1 reveals its conformational conversion. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31240-4>

- Wang, N., Wu, R., Tang, D. & Kang, R. (2021). The BET family in immunity and disease. In *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00384-4>
- Wei, J., Li, M., Ye, Z., Hu, X., He, X., Wang, J., Chen, G., Zou, C., Xu, D., Zhang, H., Yuan, J. & Zha, Y. (2023). Elevated peripheral levels of receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) and IL-8 as biomarkers of human amyotrophic lateral sclerosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01713-z>
- Wen, X., Tan, W., Westergard, T., Krishnamurthy, K., Markandaiah, S. S., Shi, Y., Lin, S., Shneider, N. A., Monaghan, J., Pandey, U. B., Pasinelli, P., Ichida, J. K. & Trotti, D. (2014). Antisense Proline-Arginine RAN Dipeptides Linked to C9ORF72-ALS/FTD Form Toxic Nuclear Aggregates that Initiate In Vitro and In Vivo Neuronal Death. *Neuron*, 84(6), 1213–1225. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.010>
- Willemse, S. W., Harley, P., Van Eijk, R. P. A., Demaegd, K. C., Zelina, P., Pasterkamp, R. J., Van Damme, P., Ingre, C., Van Rheenen, W., Veldink, J. H., Kiernan, M. C., Al-Chalabi, A., Van Den Berg, L. H., Fratta, P. & Van Es, M. A. (2023). UNC13A in amyotrophic lateral sclerosis: From genetic association to therapeutic target. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 94(8), 649–656. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2022-330504>
- Winter, G. E., Buckley, D. L., Paulk, J., Roberts, J. M., Souza, A., Dhe-Paganon, S. & Bradner, J. E. (2015). DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science*, 348(6241), 1376–1381. <https://doi.org/10.1126/science.aab1433>
- Wood, A., Gurfinkel, Y., Polain, N., Lamont, W. & Lyn Rea, S. (2021). Molecular Mechanisms Underlying TDP-43 Pathology in Cellular and Animal Models of ALS and FTLD. *International journal of molecular sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094705>
- Woollacott, I. O. C., Toomey, C. E., Strand, C., Courtney, R., Benson, B. C., Rohrer, J. D. & Lashley, T. (2020). Microglial burden, activation and dystrophy patterns in frontotemporal lobar degeneration. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01907-0>
- Wu, S. Y., Lee, A. Y., Lai, H. T., Zhang, H. & Chiang, C. M. (2013). Phospho switch triggers Brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting. *Molecular cell*, 49(5), 843–857. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.006>
- Xiao, Q., Zhao, W., Beers, D. R., Yen, A. A., Xie, W., Henkel, J. S. & Appel, S. H. (2007). Mutant SOD1G93A microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *Journal of Neurochemistry*, 102(6), 2008–2019. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04677.x>
- Xie, M., Zhao, S., Bosco, D. B., Nguyen, A. & Wu, L. J. (2022). Microglial TREM2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Developmental Neurobiology*, 82(1), 125–137. <https://doi.org/10.1002/dneu.22864>
- Xu, P., Hong, Y., Xie, Y., Yuan, K., Li, J., Sun, R., Zhang, X., Shi, X., Li, R., Wu, J., Liu, X., Hu, W. & Sun, W. (2021). TREM-1 Exacerbates Neuroinflammatory Injury via NLRP3 Inflammasome-Mediated Pyroptosis in Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Translational Stroke Research*, 12(4), 643–659. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00840-x>
- Yamamuro-Tanabe, A., Mukai, Y., Kojima, W., Zheng, S., Matsumoto, N., Takada, S., Mizuhara, M., Kosuge, Y., Ishimaru, Y. & Yoshioka, Y. (2023). An Increase in Peroxiredoxin 6



- Expression Induces Neurotoxic A1 Astrocytes in the Lumbar Spinal Cord of Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice Model. *Neurochemical Research*, 48(12), 3571–3584. <https://doi.org/10.1007/s11064-023-04003-w>
- Yang, W., Leystra-Lantz, C. & Strong, M. J. (2008). Upregulation of GSK3 $\beta$  expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment (ALSci). *Brain Research*, 1196, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.031>
- Yang, X., Diaz, V. & Huang, H. (2022). The Role of Interferon Regulatory Factor 1 in Regulating Microglial Activation and Retinal Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23). <https://doi.org/10.3390/ijms232314664>
- You, J., Youssef, M. M. M., Santos, J. R., Lee, J. & Park, J. (2023). Microglia and Astrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Disease-Associated States, Pathological Roles, and Therapeutic Potential. *Biology*, 12(10), 1307. <https://doi.org/10.3390/biology12101307>
- Yu, T., Gan, S., Zhu, Q., Dai, D., Li, N., Wang, H., Chen, X., Hou, D., Wang, Y., Pan, Q., Xu, J., Zhang, X., Liu, J., Pei, S., Peng, C., Wu, P., Romano, S., Mao, C., Huang, M., ... Xiao, Y. (2019). Modulation of M2 macrophage polarization by the crosstalk between Stat6 and Trim24. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12384-2>
- Zafar, A., Ng, H. P., Chan, E. R., Dunwoodie, S. L. & Mahabeleshwar, G. H. (2023). Myeloid-CITED2 Deficiency Exacerbates Diet-Induced Obesity and Pro-Inflammatory Macrophage Response. *Cells*, 12(17). <https://doi.org/10.3390/cells12172136>
- Zafar, A., Ng, H. P., Kim, G., Chan, E. R. & Mahabeleshwar, G. H. (2021). BHLHE40 promotes macrophage pro-inflammatory gene expression and functions. *The FASEB Journal*, 35(10). <https://doi.org/10.1096/fj.202100944R>
- Zeier, Z., Esanov, R., Belle, K. C., Volmar, C. H., Johnstone, A. L., Halley, P., DeRosa, B. A., Khoury, N., van Blitterswijk, M., Rademakers, R., Albert, J., Brothers, S. P., Wu, J., Dykxhoorn, D. M., Benatar, M. & Wahlestedt, C. (2015). Bromodomain inhibitors regulate the C9ORF72 locus in ALS. *Experimental Neurology*, 271, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.06.017>
- Zeineddine, R., Farrawell, N. E., Lambert-Smith, I. A. & Yerbury, J. J. (2017). Addition of exogenous SOD1 aggregates causes TDP-43 mislocalisation and aggregation. *Cell Stress and Chaperones*, 22(6), 893–902. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0804-y>
- Zhang, H., Cao, X., Tang, M., Zhong, G., Si, Y., Li, H., Zhu, F., Liao, Q., Li, L., Zhao, J., Feng, J., Li, S., Wang, C., Kaulich, M., Wang, F., Chen, L., Li, L., Xia, Z., Liang, T., ... Zhao, B. (2021). A subcellular map of the human kinome. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.64943>
- Zhang, W., Xiao, D., Mao, Q. & Xia, H. (2023). Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01486-5>
- Zhao, W., Beers, D. R., Bell, S., Wang, J., Wen, S., Baloh, R. H. & Appel, S. H. (2015). TDP-43 activates microglia through NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome. *Experimental Neurology*, 273, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.019>
- Zhou, Q., Li, T. & Price, D. H. (2012). RNA polymerase II elongation control. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 119–143. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052610-095910>

- Zhou, Y., Gu, Y. & Liu, J. (2019). BRD4 suppression alleviates cerebral ischemia-induced brain injury by blocking glial activation via the inhibition of inflammatory response and pyroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 519(3), 481–488. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.097>
- Zhu, Y., Ni, H., Chen, Q., Qian, H., Fang, Y., Gao, R. & Liu, B. (2023). Inhibition of BRD4 expression attenuates the inflammatory response and apoptosis by downregulating the HMGB-1/NF- $\kappa$ B signaling pathway following traumatic brain injury in rats. *Neuroscience Letters*, 812, 137385. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137385>
- 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>

# ABREVIATURAS

---



## 9. Abreviaturas

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ASOs: Oligonucleótidos antisentido

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro

BET: *Bromodomain and Extra-Terminal Domain*

Brd4: *Bromodomain containing 4*

C9orf72: *Chromosome 9 open Reading Frame 72*

CK2: Caseína Quinasa 2

CNTF: Factor neurotrófico ciliar

DAM: Microglía asociada a enfermedad

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

DEGs: Genes diferencialmente expresados

DFT: Demencia frontotemporal

DMSO: Dimetilsulfóxido

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

ELA-E: Esclerosis lateral amiotrófica esporádica

ELA-F: Esclerosis lateral amiotrófica familiar

EMA: *European Medicines Agency*

FDA: *Food and Drugs Administration*

FUS: *Fused in Sarcoma*

GDNF: Factor neurotrófico derivado de células gliales

GO: Ontología génica

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HTS: Microscopía de cribado de alta eficiencia

IFN: Interferón

IGF: Factor de crecimiento insulínico

IL: Interleuquina

IPA: *Ingenuity pathway analysis*

KD: *Kinase-dead*

KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KO: *Knockout*

LC-MS/MS: Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem

LPS: Lipopolisacárido

MGNd: Fenotipo microglial neurodegenerativo

miARN: Micro-ARN

MOK: *MAPK/MAK/MRK overlapping kinase*

MRI: Imagen por resonancia magnética

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeníl tetrazolio

NO: Óxido nítrico

OPTN: Optineurina

PCA: Análisis de componentes principales

PET: Tomografía por Emisión de Positrones

PP2A: Proteína fosfatasa 2A

RIPK1: *Receptor-Interacting Kinase 1*

RNA-Seq: Secuenciación del transcriptoma completo por clonación al azar

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SNC: Sistema nervioso central

SOD1: Superóxido dismutasa

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TARDBP: *Transactive Response DNA Binding Protein*

TBK1: *TANK-Binding Kinase 1*

TFG: Factor de crecimiento transformante

TLR: *Toll-like Receptor*

TNF: Factor de necrosis tumoral

TREM: *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells*