



Sección de Biología
Universidad de La Laguna



Estudio de los efectos de mutaciones puntuales en el gen *Tardbp* de ratón y su relación con la degeneración de neuronas motoras

Studying the effects of point mutations in the mouse *Tardbp* gene and their relationship with motor neuron degeneration



ERICK MARCOS CASTILLO VARGAS

TUTORES: DRA. MARÍA TERESA ACOSTA ALMEIDA Y
DR. ABRAHAM ACEVEDO AROZENA

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
SECCIÓN DE BIOLOGÍA

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	4
ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD	5
GENES ASOCIADOS A LA ELA.....	6
<i>TARDBP</i> Y SU IMPORTANCIA EN EL ESTUDIO DE LA ELA.....	6
CARACTERIZACIÓN DE TDP-43.....	7
MUTACIONES EN TDP-43 Y NUEVOS EVENTOS DE <i>SPLICING</i>	7
OBJETIVOS	9
OBJETIVO PRIMARIO	10
OBJETIVOS SECUNDARIOS	10
MATERIAL Y MÉTODOS	11
LÍNEAS DE RATONES Y CRUZAMIENTOS	12
GENOTIPADO	12
SUPERVIVENCIA DE LAS MOTONEURONAS	14
<i>Recogida de secciones congeladas</i>	14
<i>Tinción con galocianina</i>	15
<i>Conteo de motoneuronas</i>	15
GANANCIA DE FUNCIÓN DE <i>SPLICING</i> DE TDP-43.....	17
<i>Extracción de tejido</i>	17
<i>Extracción de ARN</i>	18
<i>RT-PCR, PCR y electroforesis</i>	18
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
RESULTADOS	22
SUPERVIVENCIA DE LAS MOTONEURONAS	23
VARIACIÓN EN LA GOF DE <i>SPLICING</i> CON LA EDAD	23
COMPARACIÓN DE LA GOF DE <i>SPLICING</i> DE <i>TARDBP</i> ^{M323K} Y <i>TARDBP</i> ^{Q331K}	27
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	34
BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

TDP-43 (codificado por el gen *TARDBP*) es una proteína de unión a ARN, crítica en el proceso de *splicing* de muchos genes, que resulta un pilar central en la patogénesis de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La ganancia de función de TDP-43, que produce importantes desequilibrios en el *splicing* de muchos genes, se ha propuesto como uno de los posibles mecanismos desencadenantes de la ELA. En este sentido, para profundizar en este aspecto y analizar si existe relación entre ganancia de función de *splicing* y degeneración de neuronas motoras, en el presente estudio se usaron dos modelos únicos de ratón con mutaciones puntuales (tipo *knock-in*) en el gen *Tardbp* endógeno: *Tardbp*^{Q331K} y *Tardbp*^{M323K}. Así, se determinó que los ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} exhibían una degeneración progresiva de las motoneuronas espinales, algo que no ocurre en los ratones *Tardbp*^{Q331K/Q331K}. Además, se observó como los ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} presentaban una ganancia de función de *splicing* de TDP-43 en la médula espinal que se incrementaba con la edad y que ésta era mayor que la ganancia de función de los ratones *Tardbp*^{Q331K/Q331K}. Asimismo, se generaron, por primera vez, ratones *Tardbp*^{Q331K/M323K}, que permitieron culminar la demostración de que la mutación *Tardbp*^{M323K} genera una mayor ganancia de función de *splicing* que *Tardbp*^{Q331K} en la médula espinal. Todos estos hallazgos sugieren una correlación en la médula espinal entre degeneración de las motoneuronas y ganancia de función de *splicing* de TDP-43.

Palabras clave: ELA, TDP-43, *splicing*, neurodegeneración

ABSTRACT

TDP-43 (encoded by the *TARDBP* gene) is an RNA-binding protein, critical in the splicing process of many genes, which is a central pillar in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). TDP-43 gain-of-function, which produces important imbalances in the splicing of many genes, has been proposed as one of the possible triggering mechanisms of ALS. In this sense, to delve into this aspect and analyze whether there is a relation between splicing gain-of-function and motor neuron degeneration, we used two unique mouse models with point mutations (knock-in type) in the endogenous *Tardbp* gene: *Tardbp*^{Q331K} and *Tardbp*^{M323K}. In this way, we determined that *Tardbp*^{M323K/M323K} mice exhibited a progressive degeneration of spinal motor neurons, something that does not occur in *Tardbp*^{Q331K/Q331K} mice. In addition, we

observed that *Tardbp*^{M323K/M323K} mice had a TDP-43 splicing gain-of-function in the spinal cord that increased with age, and that it was greater than the gain-of-function of the *Tardbp*^{Q331K/Q331K} mice. Likewise, we generate, for the first time, *Tardbp*^{Q331K/M323K} mice, which allowed us to culminate the demonstration that the *Tardbp*^{M323K} mutation generates a greater gain of splicing function than *Tardbp*^{Q331K} in the spinal cord. All these findings suggest a correlation in the spinal cord between motor neuron degeneration and TDP-43 splicing gain-of-function.

Key words: ALS, TDP-43, splicing, neurodegeneration

INTRODUCCIÓN

TDP-43 (TAR DNA *binding protein* 43), codificada por el gen *TARDBP*, es una proteína de unión al ADN/ARN predominantemente nuclear, expresada de manera ubicua, que participa en múltiples pasos del procesamiento y la maduración del ARN, incluida la transcripción y el *splicing* (Fratta *et al.*, 2018). En 2006 fue identificada como el componente fundamental de las inclusiones citoplasmáticas neuronales de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Neumann *et al.*, 2006) y desde entonces ha sido un pilar fundamental en el estudio de esta enfermedad (Suk & Rousseaux, 2020).

Aspectos generales de la enfermedad

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva descrita por primera vez en 1869 por Jean-Martin Charcot (De Giorgio *et al.*, 2019). Su nombre refleja tanto la degeneración de las neuronas motoras corticoespinales como la desaparición de las neuronas motoras espinales, con denervación secundaria y atrofia muscular (Taylor, Brown & Cleveland, 2016). La incidencia global estandarizada de ELA, obtenida por metaanálisis, es de 1,68 por cada 100.000 habitantes, aunque esta varía entre regiones (Feldman *et al.*, 2022). En Europa se ha registrado una incidencia de 2-3 afectados por cada 100.000 habitantes y una prevalencia de 6-7 afectados por cada 100.000 habitantes. La mayoría de los pacientes mueren en un periodo de 2 a 5 años posteriores a la aparición de los primeros síntomas, debido a complicaciones relacionadas con el deterioro de la función respiratoria (Costa & De Carvalho, 2017). La enfermedad se manifiesta comúnmente a mediados de la edad adulta (en torno a los 55 años de media), aunque se han registrados casos tanto a edades mucho más tempranas (por ejemplo, en la adolescencia) como más tardías. Al igual que la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, comienza de manera focal y se propaga, hasta terminar en la parálisis de casi toda la musculatura esquelética (Devoy *et al.*, 2021; Taylor, Brown & Cleveland, 2016).

No existen tratamientos efectivos para la ELA aparte de la atención y el apoyo nutricional y respiratorio para contrarrestar los síntomas lo mejor posible. Hoy en día, solo existen dos medicamentos neuroprotectores aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) y/o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA): Riluzol, que bloquea la neurotransmisión glutamatérgica excesiva, Edaravone, que previene el daño por estrés oxidativo, y Fenilbutirato de sodio y Taurursodiol, que reduce el estrés del retículo endoplásmico y la disfunción mitocondrial. Sin embargo, estos fármacos solo incrementan, de media, unos pocos meses la vida de algunos pacientes (De Giorgio *et al.*, 2019; Devoy *et al.*, 2021; Johnson *et al.*, 2022; Van Damme, Robberecht & Van Den Bosch, 2017).

Aproximadamente, el 85-90% de los casos de ELA son esporádicos, es decir, no existen antecedentes familiares de la enfermedad. Un 15% de estos casos se deben a mutaciones patogénicas en ciertos genes conocidos, mientras que el otro 85% tiene una causa desconocida. El 10-15% de los casos restantes de ELA son familiares, generalmente con un patrón de herencia monogénica autosómica dominante (De Giorgio *et al.*, 2019; Devoy *et al.*, 2021; Feldman *et al.*, 2022; Taylor, Brown & Cleveland, 2016).

Genes asociados a la ELA

Gen	ELA familiar (%)	ELA esporádica (%)
<i>C9ORF72</i>	40%	7%
<i>SOD1</i>	12%	1-2%
<i>FUS</i>	4%	1%
<i>TARDBP</i>	4%	1%

En 1993 se halló el primer gen, *SOD1*, cuyas mutaciones fueron identificadas como causantes de ELA (Rosen *et al.*, 1993). Desde entonces, se han identificado más de 40 genes asociados con la enfermedad, los cuales varían tanto en frecuencia como en penetrancia. De entre todos ellos, 4 destacan por encima del resto al ser los responsables de, aproximadamente, el

Tabla 1. Porcentaje de ELA familiar o esporádica causada por la mutación de genes específicos.

60% de los casos familiares y de alrededor del 11% de los casos esporádicos. Estos genes son *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP* y *FUS* (tabla 1) (Goutman *et al.*, 2022).

***TARDBP* y su importancia en el estudio de la ELA**

Las mutaciones en *TARDBP* representan un pequeño porcentaje (~4%) de los casos de ELA. Sin embargo, las inclusiones citoplasmáticas de TDP-43, acompañadas por el agotamiento nuclear de la proteína, son el indicador patológico principal de la enfermedad. Esto es así porque se encuentran presentes en un 97-98% de los casos, independientemente de los mecanismos de aparición de la enfermedad (con las excepciones de la ELA familiar causada por mutaciones en *SOD1* y *FUS*). Por lo tanto, la disfunción de TDP-43 proporciona un terreno común para el estudio de una enfermedad enormemente compleja (Fratta *et al.*, 2018; Prasad *et al.*, 2019; Suk & Rousseaux, 2020).

Caracterización de TDP-43

TDP-43 pertenece a la familia de las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs). Está formada por 414 aminoácidos y se compone de una región N-terminal con una señal de localización nuclear (NLS), dos dominios de reconocimiento de ARN (RRM1 y RRM2), una señal de exportación nuclear (NES) y un dominio C-terminal con regiones ricas en glutamina/asparagina y ricas en glicina (De Boer *et al.*, 2021). La región C-terminal media, principalmente, las interacciones proteína-proteína entre TDP-43 y otras hnRNPs. La región N-terminal es crítica para la dimerización de TDP-43, la cual es esencial para su correcta función en la regulación del *splicing*. Finalmente, los dominios RRM1 y 2 son requeridos para unirse al ARN diana (Jiang *et al.*, 2017; Ratti & Buratti, 2016).

Se han citado más de 50 mutaciones con cambio de sentido patógenas en *TARDBP*, tanto en casos de ELA esporádicos como familiares. Asimismo, casi todas las mutaciones se localizan en el dominio C-terminal, concretamente, en la región rica en glicina (De Boer *et al.*, 2021; Ratti & Buratti, 2016). De esta manera, como la región C-terminal es la que interactúa con otras hnRNP para regular el proceso de *splicing*, esto proporciona una vía adicional para la patogénesis de la enfermedad (De Boer *et al.*, 2021).

Mutaciones en TDP-43 y nuevos eventos de *splicing*

Fratta *et al.* (2018) describió cómo la mutación puntual M323K (cambio de metionina por lisina en la posición 323) en la región rica en glicina del dominio C-terminal de TDP-43 induce una ganancia de función (GOF, por sus siglas en inglés) de *splicing*. Concretamente, conduce a la exclusión de exones que, en condiciones normales, están incluidos de manera constitutiva (Figura 1). Esta clase de exones serán conocidos como *skiptic* de ahora en adelante. De igual manera, también desencadena una fuerte preferencia hacia los eventos de exclusión en los exones *cassette* (Figura 1). *In vivo*, M323K desencadena trastornos neuromusculares progresivos de inicio tardío, como los que se pueden observar en la ELA, lo que sugiere que la ganancia de función de *splicing* de TDP-43 contribuye a la patogénesis de la enfermedad (Fratta *et al.*, 2018; Rouaux, De Aguilar & Dupuis, 2018).

No obstante, si la ganancia de función de *splicing* de TDP-43 varía con la edad o si está relacionada con la neurodegeneración son aspectos que todavía se deben estudiar en mayor profundidad, y que se abordaron en este trabajo.

De igual manera, otra mutación de interés que se utiliza para dilucidar el papel de TDP-43 en la patogénesis de la ELA es Q331K (cambio de glutamina por lisina en la posición 331), también en el dominio C-terminal. La existencia de GOF de *splicing* en ratones *knock-in* con esta mutación ya se ha demostrado (Fratta *et al.*, 2018; White *et al.*, 2018). Sin embargo, algo que no se había tratado con demasiada profundidad, y que se hizo por primera vez en este estudio, fue una comparativa entre la GOF de *splicing* de las mutaciones *Tardbp*^{Q331K} y *Tardbp*^{M323K}, en ratones con el mismo fondo genético (C57BL/6JxDBA/2J).

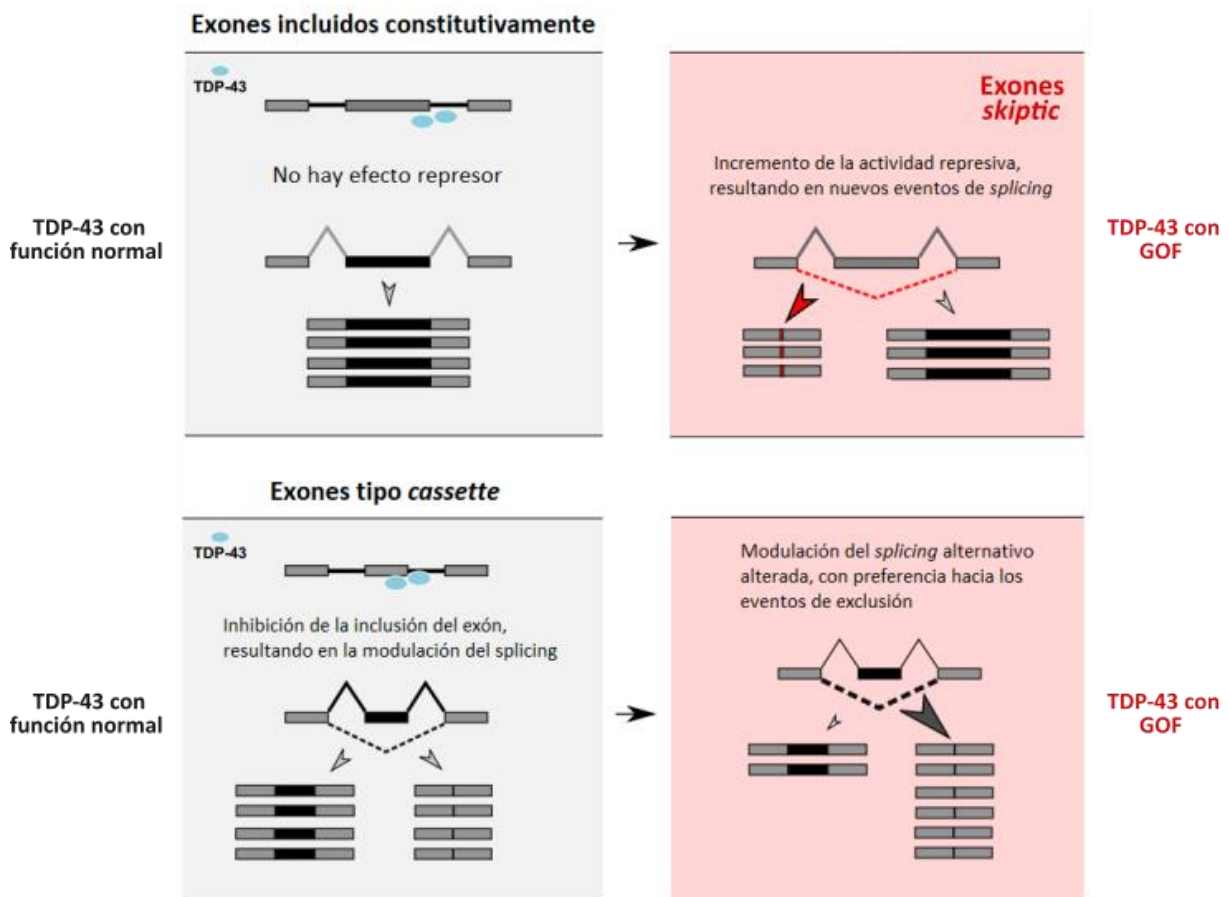


Figura 1. Diagrama que ilustra el efecto de la ganancia de función de TDP-43 en eventos de *splicing* alternativo en los que actúa para inhibir la inclusión de exones. Se ha demostrado que TDP-43, en general, reprime la inclusión de exones al unirse a la secuencia de pre-ARNm de estos exones o a los intrones corriente abajo. En condiciones normales, la unión de TDP-43 contribuye a la represión de la inclusión de exones en transcritos maduros; contribuye a regular la inclusión de exones en el *splicing* alternativo (abajo a la izquierda); y también se une a los exones y sus intrones corriente abajo sin afectar la exclusión de exones (arriba a la izquierda). La GOF afecta al *splicing* alternativo regulado por TDP-43, ocasionando, normalmente, una fuerte preferencia hacia la exclusión de los exones *cassette* (abajo a la derecha). Asimismo, también induce la exclusión de exones que, de manera normal, se incluyen constitutivamente (exones *skiptic*, arriba a la derecha) (Modificado de Fratta *et al.*, 2018).

OBJETIVOS

Objetivo primario

Analizar si existe una correlación entre la degeneración de motoneuronas espinales y la ganancia de función de *splicing* de TDP-43 en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Objetivos secundarios

- Estudiar cómo evoluciona la ganancia de función de *splicing* de TDP-43 con respecto a la edad en ratones *knock-in* con la mutación *Tardbp*^{M323K}.
- Establecer una comparación, en fondo genético isogénico (C57BL/6JxDBA/2J), de la ganancia de función de *splicing* de ratones *knock-in* con la mutación *Tardbp*^{M323K} frente a ratones *knock-in* con la mutación *Tardbp*^{Q331K}.

MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas de ratones y cruzamientos

Para los experimentos se emplearon 2 tipos de ratones *knock-in* con fondo genético híbrido C57BL/6JxDBA/2J, unos con la mutación M323K y otros con la mutación Q331K. Se utilizó este fondo genético híbrido porque la mutación *Tardbp*^{M323K} es letal en homocigosis en ratones con un fondo genético puro C57BL/6J (Fratta *et al.*, 2018). Asimismo, para desarrollar los estudios se llevaron a cabo diferentes cruzamientos. Por un lado, se cruzaron ratones heterocigotos M323K entre sí, obteniéndose una descendencia que se ajusta a la proporción mendeliana típica 1:2:1 (*Tardbp*^{+/+}:*Tardbp*^{+/M323K}:*Tardbp*^{M323K/M323K}). De igual manera, se cruzaron ratones heterocigotos Q331K entre sí, también con una proporción en la descendencia que se ajustaba al 1:2:1. Por otro lado, se realizaron intercruces de ratones heterocigotos M323K con heterocigotos Q331K (Figura 2), obteniéndose una proporción en la descendencia de 1:1:1:1 (*Tardbp*^{+/+}:*Tardbp*^{+/M323K}:*Tardbp*^{+/Q331K}:*Tardbp*^{Q331K/M323K}).

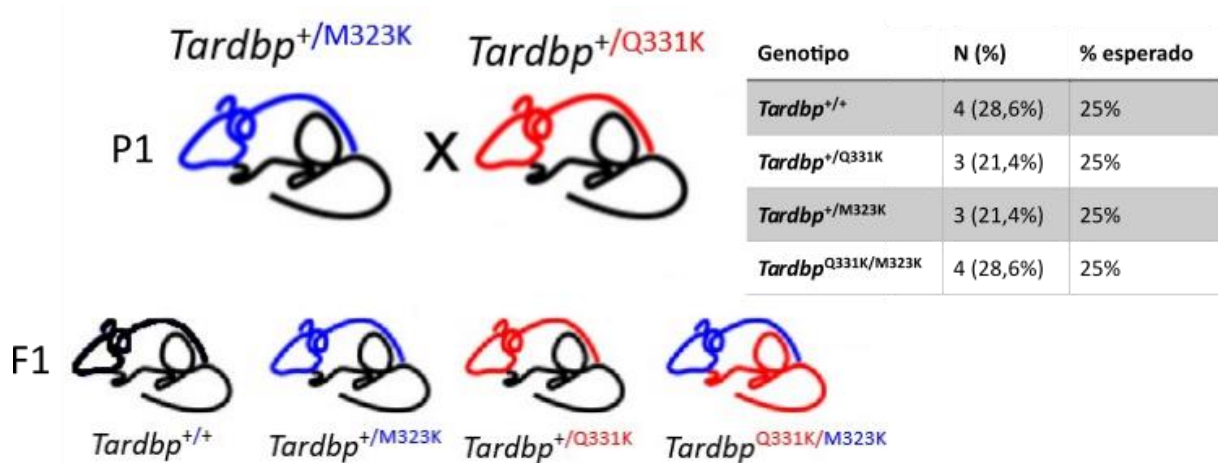


Figura 2. Intercruce ilustrativo, en ratones C57BL/6JxDBA/2J, de un heterocigoto M323K con uno heterocigoto Q331K. En la tabla se muestra como la descendencia observada (N) y la esperada son muy similares, ajustándose así a la proporción 1:1:1:1 (modificado de Fratta *et al.*, 2018).

Genotipado

La determinación del genotipo de cada ratón se hizo utilizando trozos de cola de, aproximadamente, 2 mm. La obtención de ADN a partir de estos tejidos se realizó por el método HotSHOT (Truett *et al.*, 2000). Primeramente, el tejido se depositó en un tubo Eppendorf, se añadieron 75 μ L de reactivo de lisis alcalino (NaOH 25 mM, EDTA 0,2 mM) y se calentó 1 h a 95°C en un termobloque. Posteriormente, se neutralizó con 75 μ L de Tris-HCl 40 mM. Acto seguido, se centrifugó 3 min a 4000 rpm, se tomaron 2 μ L del sobrenadante (donde se

encontraba el ADN) y se pusieron en otro tubo Eppendorf que contenía 48 μL de agua AccuGENE™ de biología molecular (Lonza).

Con el ADN obtenido de cada ratón se llevó a cabo un Análisis de Genotipos por Curva de Fusión, empleando la LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics). En este análisis se agregaron a una PCR (donde se amplificó la región de la mutación) 2 sondas fluorescentes específicas que se hibridan con los amplicones en regiones muy próximas. Estas sondas emplean el principio FRET, que se basa en la transferencia de energía de una molécula fluorescente a otra molécula fluorescente. Esta transferencia solo ocurre cuando ambas sondas se hibridan con el ADN objetivo en estrecha proximidad y se anula tan pronto como las sondas se separan. Posteriormente, se genera una curva de fusión calentando lentamente el heterodúplex amplicón-sonda y midiendo los cambios de fluorescencia que resultan cuando la sonda y el amplicón se separan. Incluso una sola disparidad entre la sonda marcada y el amplicón mostrará una temperatura de separación significativamente reducida. Por lo tanto, los heterodúplex de sonda-amplicón que contienen disparidades se separan a temperaturas más bajas que las sondas unidas a un ADN diana perfectamente coincidente (Roche Diagnostics, 2019). De esta manera, el software de la máquina es capaz de generar los diferentes perfiles de temperatura de fusión que indican si el genotipo es *wild type*, heterocigoto u homocigoto para la mutación en cuestión.

En este análisis se utilizó un volumen de 10 μL por pocillo (en placa de 96 pocillos), que constaba de 1,4 μL de agua AccuGENE™ de biología molecular (Lonza), 2 μL de tampón de reacción Phire 5X (Thermo Scientific), 1,5 μL de mezcla de dNTPs (Thermo Scientific), 1 μL de ADN polimerasa Phire Hot Start II (Thermo Scientific), 1 μL de cada primer (Microsynth) y 1 μL de cada sonda fluorescente (denominadas *anchor* y *sensor*; Microsynth). La secuencia de los cebadores y las sondas fluorescentes se aprecian en la tabla 2.

Secuencia

Cebador <i>Forward</i>	ATCTGGGTTTTACTGCTGTGTTGA
Cebador <i>Reverse</i>	GGCACCAGAATTAGAACCACT
Sonda <i>anchor</i>	GATGAACTTTGGTGCTTTTAGCATTA
Sonda <i>Sensor</i>	AGCGATCAAGGCTGCG

Tabla 2. Secuencias de la pareja de cebadores y de las sondas fluorescentes usadas en el Análisis de Genotipos por Curva de Fusión.

Supervivencia de las motoneuronas



Figura 3. Médula espinal de ratón adulto. Región lumbar indicada por el recuadro rojo (modificado de Austin *et al.*, 2022).

Se utilizaron ratones tanto *wild type* como homocigotos para la mutación M323K. Para determinar la existencia de neurodegeneración, tanto al año como a los dos años, se siguieron los protocolos descritos por Austin *et al.* (2022) y Joyce *et al.* (2016). En primer lugar, se realizó la eutanasia de los animales por sobredosis con hidrato de cloral (1 mL/100 g de peso corporal). Acto seguido, se perfundió, transcárdicamente, con solución salina y luego con paraformaldehído (PFA) al 4%. Entonces, se extrajo la médula espinal, se fijó en PFA al 4%, se deshidrató en sacarosa al 30% (para evitar la formación de cristales al congelar) y se criopreservó a -80°C. Posteriormente, se identificó la región lumbar (Figura 3), fácilmente reconocible por ser la región de mayor ensanchamiento, y se diseccionó. Entonces, se transfirió a un molde cuadrado con OCT (medio de inclusión), con la parte dorsal orientada hacia arriba y la ventral hacia abajo, y se criopreservó a -80°C.

Recogida de secciones congeladas

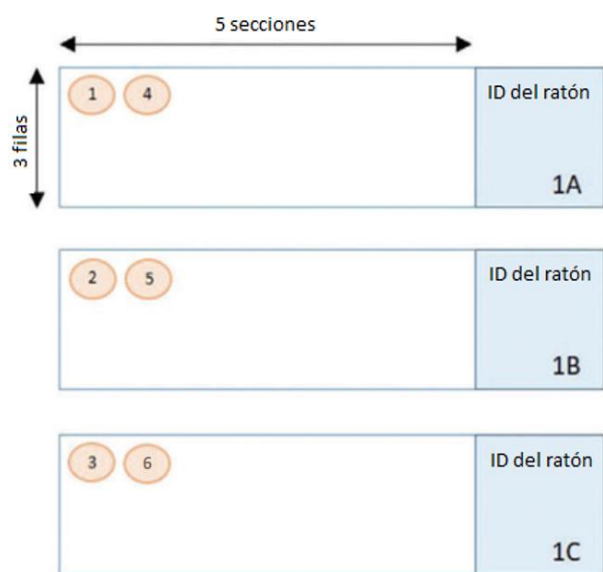


Figura 4. Disposición de las secciones de médula en las series de portaobjetos (modificado de Austin *et al.*, 2022).

Se empleó el criostato Microm HM550 (Thermo Scientific) para realizar cortes transversales de 20 μm de la zona lumbar incrustada en OCT, cortando desde la región distal (L6) hacia la proximal (L1). Dichos cortes se recogieron en portaobjetos Epredia™ Superfrost™ Plus de la siguiente forma. Primeramente, se etiquetaron 3 portaobjetos como 1A, 1B y 1C. El primer corte se depositó en el 1A, el segundo en el 1B y el tercero en el 1C, repitiéndose esta secuencia hasta alcanzar 15 secciones por portaobjetos (Figura 4). El mismo proceso

se llevó a cabo con las series de portaobjetos 2 (2A, 2B y 2C), 3 y 4. Los portaobjetos se almacenaron a -80°C en una caja de plástico debidamente etiquetada. La razón por la que se recogieron los cortes de esta manera radica en que una motoneurona tiene un grosor de, aproximadamente, $20\text{-}25\ \mu\text{m}$. Como la médula se seccionó a $20\ \mu\text{m}$, existía una distancia de $60\ \mu\text{m}$ entre cada sección recogida en el portaobjetos, lo que garantizaba que la misma motoneurona no se iba a contar dos veces (Austin *et al.*, 2022).

Tinción con galocianina

Los portaobjetos se depositaron, en series de 8, en un frasco de tinción tipo Coplin. Primeramente, se realizó un lavado de 5 min con PBS (tampón fosfato salino) para la rehidratación de los tejidos. Luego se añadió el tinte, que constaba de galocianina ($0,3\ \text{g}/100\ \text{mL}\ \text{H}_2\text{O}$) y alumbre de cromo ($10\ \text{g}/100\ \text{mL}\ \text{H}_2\text{O}$), y se dejó actuar por 28 min. Una vez terminado el tiempo, se hicieron 2 lavados con agua del grifo para eliminar el exceso de tinte. Acto seguido, se deshidrató el tejido con soluciones crecientes de etanol (90% , 96% y 100% , 5 min cada una) y se realizaron 2 lavados de 5 min con xilol para eliminar los restos de alcohol. Finalmente, se sacaron los portaobjetos del frasco y se llevó a cabo el montaje empleando EUKITT[®].

Conteo de motoneuronas

Las motoneuronas del grupo ciático son las neuronas de interés en los modelos de ELA en ratones. Inervan los músculos de fatigación rápida de las extremidades traseras del ratón, que se ven predominantemente afectados en la enfermedad y, por lo tanto, una reducción en estas neuronas motoras puede funcionar como una lectura de la progresión de la ELA en modelos de ratones (Austin *et al.*, 2022; Frey *et al.*, 2000).

En la médula espinal, las neuronas motoras se encuentran en el asta ventral de la sustancia gris, la cual se tiñe de un color púrpura más oscuro que la materia blanca circundante (Figura 5A). Las motoneuronas del grupo ciático se agrupan lateralmente en el asta ventral, de manera que se dibujó una línea de 30° (respecto a la horizontal) en la materia gris ventral para que las neuronas motoras más mediales no se incluyeran por error en el recuento (Figura 5A). Se contaron las motoneuronas que se localizaban en la región por encima de la línea. Para que una motoneurona se incluyera en el conteo, debía tener las siguientes características: (1) Gran tamaño y tinción más oscura. (2) Citoplasma teñido más oscuro que el núcleo, dentro del cual

el nucleolo debía ser visible (Figura 5B). (3) Normalmente, tres o más dendritas extendiéndose desde el cuerpo (Austin *et al.*, 2022).

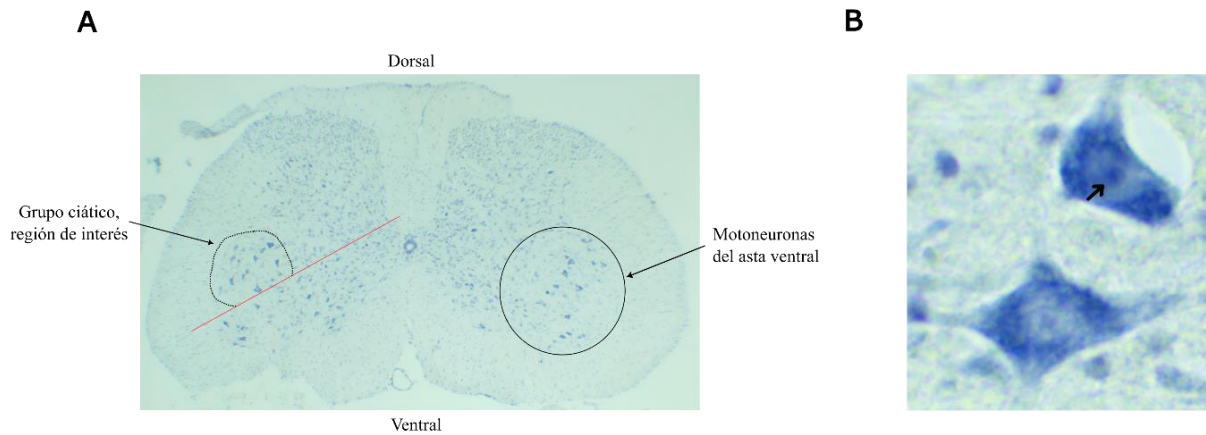


Figura 5. Localización y diferenciación de las neuronas motoras en secciones lumbares de la médula espinal. (A) Imagen representativa de un corte transversal de la región lumbar. Se encuentran resaltadas tanto las motoneuronas del asta ventral como, en concreto, las del grupo ciático, que son las de interés. La línea roja se empleó para separar el grupo ciático de otras neuronas motoras ventrales no contadas. (B) Imagen representativa de motoneuronas teñidas con galocianina. El citoplasma se tiñe de un púrpura más oscuro que el núcleo. El nucléolo se puede ver como un punto oscuro en el núcleo (flecha). Las motoneuronas son más grandes que las interneuronas circundantes y se pueden ver dendritas extendiéndose desde ellas.

Las motoneuronas se contaron en las regiones L4-L5 (Figura 6), de acuerdo con lo descrito en estudios previos (Austin *et al.*, 2022; Fratta *et al.*, 2018; Joyce *et al.*, 2016). En este sentido, es imprescindible poder diferenciar entre las regiones L1-L6, las cuales presentan varias diferencias en concordancia con las indicaciones expuestas en Austin *et al.*, 2022:

- L1: la médula tiene forma ovalada. El conducto central es redondeado. Forma de U/V de la sustancia gris dorsal (Figura 6A) de gran amplitud. Materia gris dorsal con protuberancias (Figura 6A, círculo rojo). Las motoneuronas se distribuyen por todo el asta ventral.
- L2: el conducto central se vuelve más ovalado. La forma de U/V de la sustancia gris dorsal se estrecha. Protuberancias dorsales de materia gris todavía presentes. Las neuronas motoras todavía están dispersas en el asta ventral.
- L3: la forma de U/V de la materia gris dorsal se estrecha aún más. Las protuberancias de la sustancia gris dorsal se vuelven más triangulares. Las neuronas motoras comienzan a agruparse lateralmente.
- L4 (Figura 6B): la forma de U/V se estrecha todavía más. Las protuberancias dorsales se vuelven más suaves y menos pronunciadas. Las neuronas motoras se agrupan lateralmente y se vuelven más fáciles de distinguir de las interneuronas circundantes.

- L5 (Figura 6C): la médula se vuelve menos ovalado y más circular. La forma U/V se estrecha un poco más y adquiere más forma de V. Las neuronas motoras se agrupan lateralmente.
- L6: La médula sigue teniendo una forma más circular. La forma de U/V es menos profunda que antes y tiene más forma de U.

A

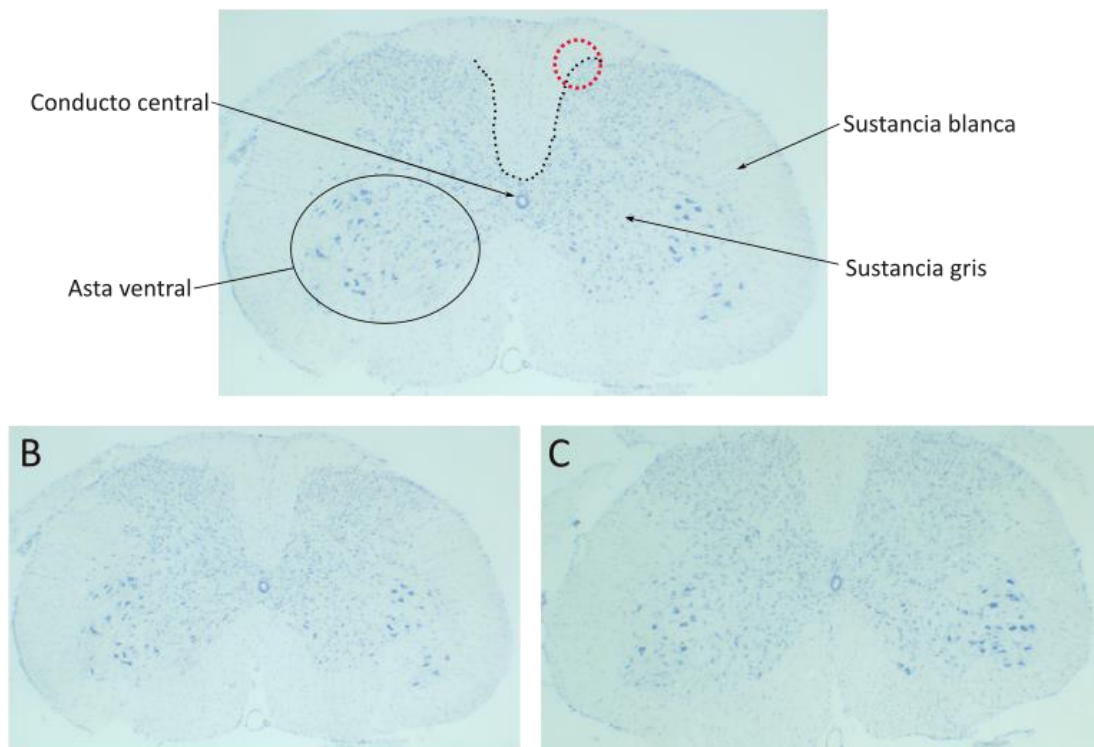


Figura 6. Cortes transversales representativas de las regiones lumbares L4 y L5 teñidos con galocianina. (A) Imagen de la región L4 donde se señalan las estructuras anatómicas que fueron utilizadas para diferenciar las diferentes regiones (L1-L6) de la zona lumbar de la médula espinal. La línea discontinua de puntos negros indica la región con forma U/V de la sustancia gris dorsal. El cirulo de puntos rojos señala una protuberancia de la materia gris dorsal. (B) Imagen representativa de L4. (C) Imagen representativa de L5.

Ganancia de función de *splicing* de TDP-43

Extracción de tejido

Se sacrificaron, por dislocación cervical, ratones *Tardbp*^{+/+} y *Tardbp*^{M323K/M323K} de 3 y 18 meses de edad. Asimismo, también se sacrificaron, por el mismo método, ratones de 1 año *Tardbp*^{+/+}, *Tardbp*^{+/M323K}, *Tardbp*^{+/Q331K}, *Tardbp*^{Q331K/Q331K}, *Tardbp*^{M323K/M323K} y *Tardbp*^{Q331K/M323K} (transheterocigotos). Utilizando material quirúrgico (pinzas, tijeras y bisturí), desinfectado con etanol al 70%, se extrajo de cada animal tejido de corteza y médula espinal, que se almacenó en tubos Eppendorf a -80°C.

Extracción de ARN

Primeramente, los tejidos extraídos se homogeneizaron en TRIzol™ (Thermo Scientific), empleando el homogeneizador-dispersor MICCRA D-1 (Paralab). Acto seguido, el lisado se centrifugó a 4°C (todas las centrifugaciones del protocolo serán a esta temperatura) a 12.000 x g y se recuperó el sobrenadante. Entonces, se realizó la separación de fases, empleando cloroformo (0,2 mL por cada 1 mL de TRIzol™) y centrifugando a 12.000 x g. Esto permitía disgregar el ARN de otras moléculas presentes, especialmente ADN y proteínas. Se rescató la fase acuosa y se procedió a precipitar el ARN, añadiendo isopropanol (0,5 mL por cada 1 mL de TRIzol™) y centrifugando 10 min a 12.000 x g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en etanol al 75% (1 mL por cada 1 mL de TRIzol™). Acto seguido, se centrifugó 5 min a 7.500 x g, se desechó el sobrenadante y se repitió este paso con el etanol, lo que añadiendo esta vez la mitad de alcohol. Una vez terminado, se dejó secar 10 min al aire para que se terminara de evaporar los restos de etanol y se resuspendió el pellet en 20-50 µL de agua AccuGENE™ de biología molecular (Lonza). Finalmente, para determinar la concentración y pureza del ARN extraído se utilizó el NanoDrop One (Thermo Scientific). Las muestras se almacenaron a -80°C para prevenir la degradación.

RT-PCR, PCR y electroforesis

Con los ARN extraídos se llevaron a cabo síntesis de ADNc (retrotranscripción) por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa), utilizando el termociclador T100 (Bio-rad). Se puso un volumen de 20 µL por pocillo, que se componía de 800 ng de ARN, 4 µL de mezcla de reacción qScript™ (Quantabio), 1 µL de retrotranscriptasa qScrip™ (Quantabio) y agua libre de nucleasas (Quantabio) con un volumen variable, en función del volumen de ARN que se halla añadido, para llegar a esos 20 µL. Los tiempos a los que se sometieron las muestras en el termociclador se exponen en la Tabla 3.

Con los ADNc resultantes se realizaron PCR para amplificar ciertos exones críticos de los genes *Eif4h*, *Prkd1*, *Ube3c* y *Dnajc5* (Tabla 4), cuya inclusión o no en el ARNm maduro dependen de la actuación de TDP-43 durante el proceso de *splicing*. Se utilizó, nuevamente, el termociclador T100 y se puso un volumen total de 10 µL por pocillo, que constaba de 1 µL de cDNA, 3,8 µL de agua AccuGENE™ de biología molecular (Lonza), 0,2 µL de cebadores (Microsynth) y 5 µL de mezcla maestra de PCR DreamTaq Green (Thermo Scientific), que contenía los componentes necesarios para que se diera la reacción adecuadamente (ADN polimerasa DreamTaq, tampón DreamTaq Green optimizado, MgCl₂ y dNTPs). Las secuencias

de los cebadores empleados se muestran en la Tabla 5 y los tiempos por ciclo a los que se sometieron las muestras se pueden observar en la Tabla 6.

Con los productos de PCR se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2,5% con tampón TBE 0,5X (Tris 5'4 g/L, ácido bórico 2,75 g/L y EDTA 2 g/L). Se usó bromuro de etidio (Thermo Scientific) para teñir el ADN. Las muestras se sometieron a un voltaje de 120 V, empleando la fuente de alimentación PowerPac™ Basic (Bio-rad). Posteriormente, los geles se visualizaron con el sistema de documentación Gel Doc EZ (Bio-rad) y los resultados se analizaron con el software Image Lab (Bio-rad). Cuando hay ganancia de función, en los genes con un exón *skiptic* aparece una segunda banda intensa por debajo de la primera (figura 7B), mientras que en los genes con un exón *cassette*, la banda inferior se vuelve más intensa que la superior (Figura 7A), en ambos casos con respecto al *wild type*. En este sentido, para cuantificar la GOF se empleó el porcentaje de inclusión (PSI, por sus siglas en inglés, figura 7C), que representa la proporción de copias de ARNm que incluyen el exón con respecto al total de copias de ARNm del gen. En la mayoría de los casos, cuando hay ganancia de función, el PSI disminuye, pues TDP-43 se une con mayor frecuencia a sus sitios diana y ejerce una acción represora (Figura 1).

	Temperatura	Tiempo
1	22°C	5 min
2	42°C	30 min
3	85°C	5 min

Tabla 3. Tiempo y temperaturas a las que se sometieron las muestras en la RT-PCR para la síntesis de ADNc.

Gen	Nº del exón	Tipo de exón
<i>Eif4h</i>	5	<i>Cassette</i>
<i>Prkd1</i>	15	<i>Skiptic</i>
<i>Ube3c</i>	6	<i>Skiptic</i>
<i>Dnajc5</i>	5	<i>Cassette</i>

Tabla 4. Genes diana de las PCR. Se muestra tanto el número del exón que se ha amplificado, como la naturaleza de este (*skiptic* o *cassette*).

Gen	Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>
<i>Eif4h</i>	TGGATTCAGGAAAGGTGGAC	GGTCTCTGTGCTCGTTCCTC
<i>Prkd1</i>	CCGGACAGTTTGAATTGTT	CCCACCACTGACCTCCTAAA
<i>Ube3c</i>	AAGAAGCGCGTTTGACCAAT	GTGCTCCCAGAAACTCCTCT
<i>Dnajc5</i>	CTCTATGTGGCGGAGCAGTT	GCTGTATGACGATCGGTGTG

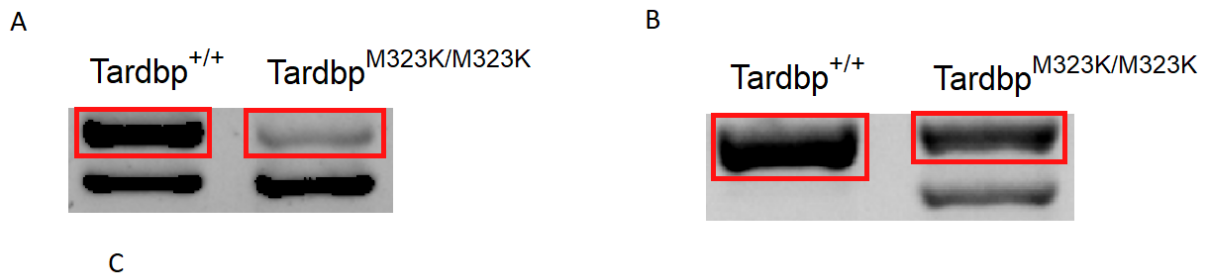
Tabla 5. Secuencias de las parejas de cebadores usadas en las PCR.

	Temperatura	Tiempo
1	95°C	3 min
2	95°C	30 min
3	60°C	1 min
4	72°C	1 min
Vuelta al paso 2 y repetición del ciclo 36 veces		
6	72°C	10 min

Tabla 6. Tiempo y temperaturas de los ciclos de la PCR.

Análisis estadístico

GraphPad Prism 9 (versión 9.5.1) fue el software estadístico que se utilizó para el análisis de los datos. En poblaciones muestrales extremadamente pequeñas ($N \leq 5$), como las encontradas en el estudio, la prueba U de Mann-Whitney es algo más conservadora (es decir, proporciona p-valores más altos) que la prueba t de Student (de Winter, 2013). Lo que significa que, si existe una diferencia estadísticamente significativa al emplear la U de Mann-Whitney, probablemente también la habrá al utilizar la t de Student. En este sentido, se optó por usar la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney de 2 muestras independientes para comparar los PSI de ratones *Tardbp*^{+/+} y *Tardbp*^{M323K/M323K}. Por otro lado, para analizar la variación de la GOF de *splicing* con la edad se empleó la prueba t de Student de 2 muestras pareadas para comparar los PSI de cada uno de los genes estudiados (Tabla 4) entre ratones *Tardbp*^{+/+} y entre ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} de 3 y 18 meses de edad. Para comparar la GOF de *splicing* ocasionada por *Tardbp*^{M323K} y la generada por *Tardbp*^{Q331K} se empleó el test ANOVA de 1 factor acompañado del test *post hoc* de comparaciones múltiples de Tukey. Por supuesto, previamente al uso de las



$$\text{PSI} = \frac{\text{Intensidad de la banda superior}}{\text{Suma de intensidades de las bandas superior e inferior}} \cdot 100$$

Figura 7. Electroforesis representativas de genes con exones *skiptic* y *cassette*. Los recuadros rojos resaltan la banda superior, que es la definitiva del PSI. (A) Patrón de bandas característico de la amplificación de un exón *cassette*. (B) Bandeo característico fruto de la amplificación de un exón *skiptic*. (C) Fórmula para calcular el valor del PSI.

pruebas paramétricas se comprobó que los residuos fueran normales y homocedásticos, empleando el test de Shapiro-Wilk y la prueba de Brown-Forsythe, respectivamente.

RESULTADOS

Supervivencia de las motoneuronas

Para investigar la existencia de neurodegeneración ligada a la mutación *Tardbp*^{M323K} y su evolución con la edad, se mantuvieron ratones *wild type* y homocigotos hasta los 12 y 24 meses. Entonces, se sacrificaron y se les extrajo la médula para realizar cortes de 20 μm con el criostato que luego se tiñeron con galocianina. Finalmente, se contaron las motoneuronas del grupo ciático en las regiones L4 y L5.

Al año de edad no se encontró diferencia significativa en el número de motoneuronas espinales entre los ratones *wild type* y los homocigotos M323K ($p > 0,05$; Figura 8A). No obstante, sí se apreciaba una cierta tendencia, donde los ratones homocigotos solían tener, en promedio, un menor número de motoneuronas por corte. De esta manera, en ratones de 2 años sí se encontró una diferencia significativa, donde los homocigotos presentaron un 28% menos de motoneuronas respecto a los *wild type* ($p < 0,05$; Figura 8B). Esto sugiere que los ratones homocigotos M323K desarrollan una disfunción motora progresiva.

Variación en la GOF de *splicing* con la edad

Se pretendía determinar si la GOF de *splicing* de TDP-43 en ratones con la mutación *Tardbp*^{M323K} se incrementaba o disminuía conforme su edad aumentaba. Para ello, mantuvieron ratones *wild type* y homocigotos M323K hasta los 3 y 18 meses de edad. Posteriormente, se sacrificaron y se extrajo tejido de corteza y médula para luego extraer el ARN. A continuación, por RT-PCR se sintetizó el cDNA que luego se utilizó en las PCR para amplificar los exones *skiptic* o *cassette* (según corresponda, Tabla 4) de *Prkd1*, *Ube3c*, *Eif4h* y *Dnajc5*. De esta manera, en los resultados de las electroforesis posteriores se analizó si existía una variación en la GOF de *splicing* con la edad, en función de en qué proporción se hayan incluido los exones críticos en los genes estudiados, factor que se ve reflejado en el valor del PSI (Figura 7).

Tanto a los 3 como a los 18 meses de edad, en ambos tejidos, se encontró un PSI significativamente reducido, de los 4 genes estudiados, en los ratones homocigotos con respecto a los *wild type* (Figuras 9 y 10). Por lo tanto, quedó evidenciada la existencia de una GOF de *splicing* de TDP-43. Asimismo, se observó que, en la corteza, 3 de los 4 genes estudiados (*Ube3c*, *Prkd1* y *Eif4h*) no presentaron variaciones en el PSI con la edad, ni entre ratones *wild type* ni entre homocigotos, indicando que no hubo cambios en la GOF de *splicing* (Figura 11A).

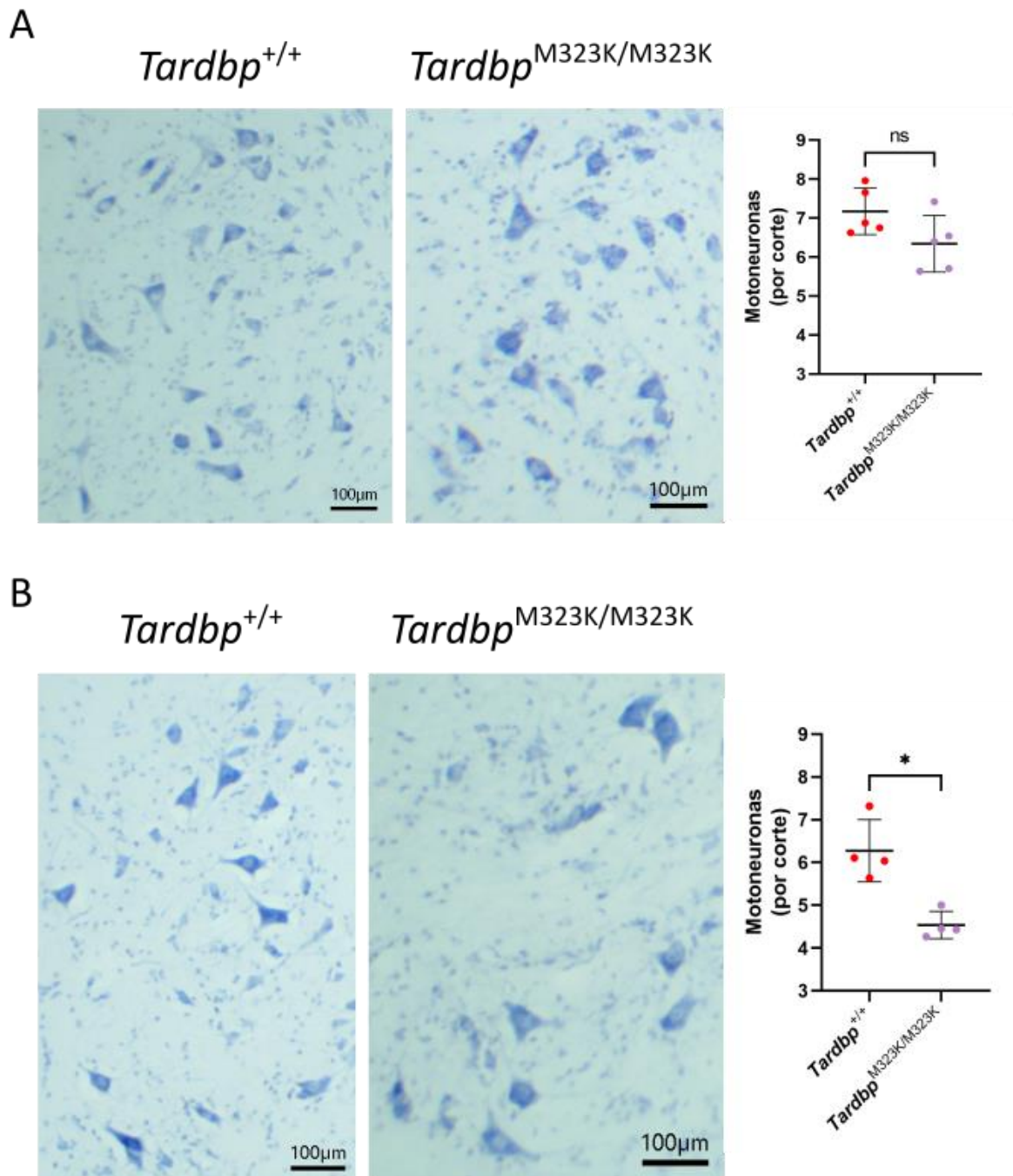
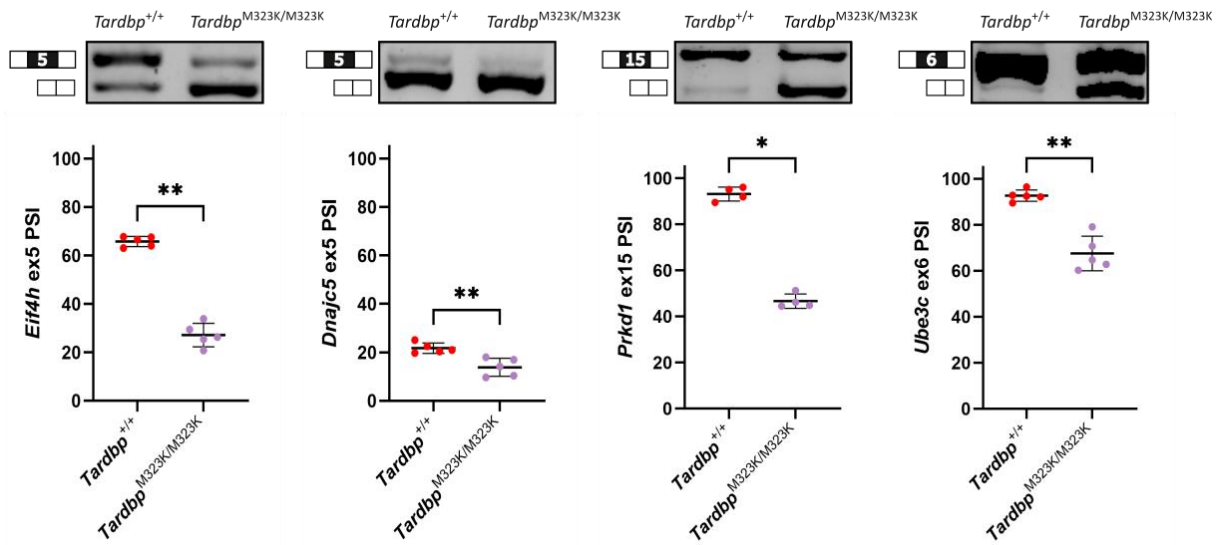


Figura 8. Motoneuronas por sección en ratones de 1 y 2 años. Se enseñan imágenes representativas de cortes transversales de médula en la región L4-L5 de ratones de 1 y 2 años. (A) Se muestra como en ratones de 1 año la diferencia entre los *wild type* (N = 5) y los homocigotos M323K (N = 5) no es significativa (ns, $p > 0,05$). (B) Se evidencia como en ratones de 2 años (N = 4) se encontró una diferencia significativa (*, $p < 0,05$) del 28% entre los *wild type* (N = 5) y los homocigotos (N = 5). En ambas figuras se representa la media junto con la desviación estándar (SD).

Tan solo *Dnajc5* mostró un PSI significativamente disminuido, entre ratones *wild type*, a los 18 meses, denotando una GOF (Figura 11A). No obstante, al tratarse este de un exón *cassette*, su

3 meses de edad



18 meses de edad

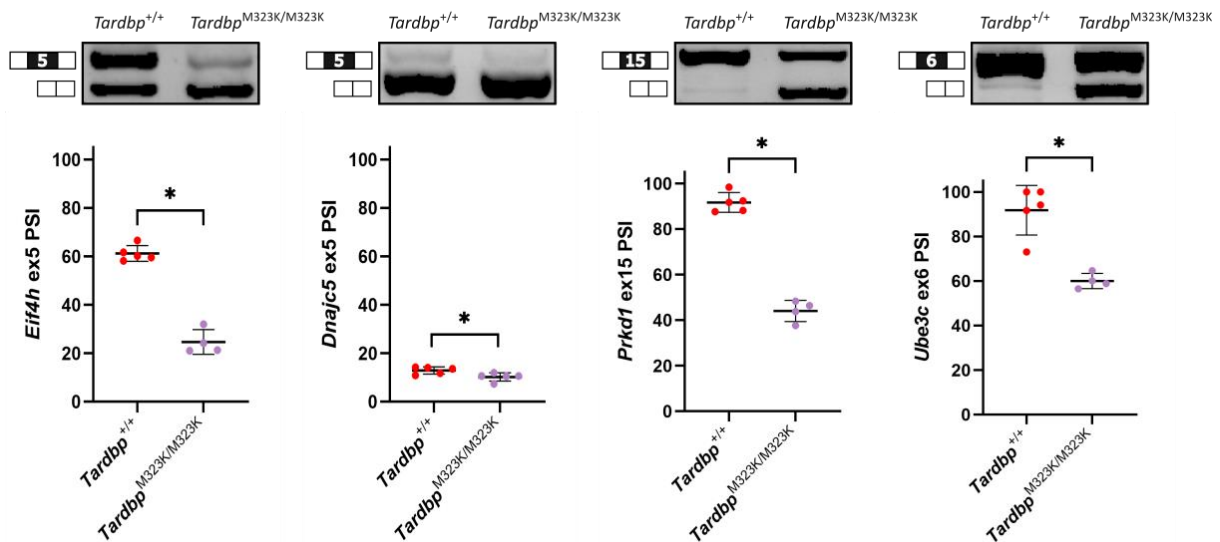
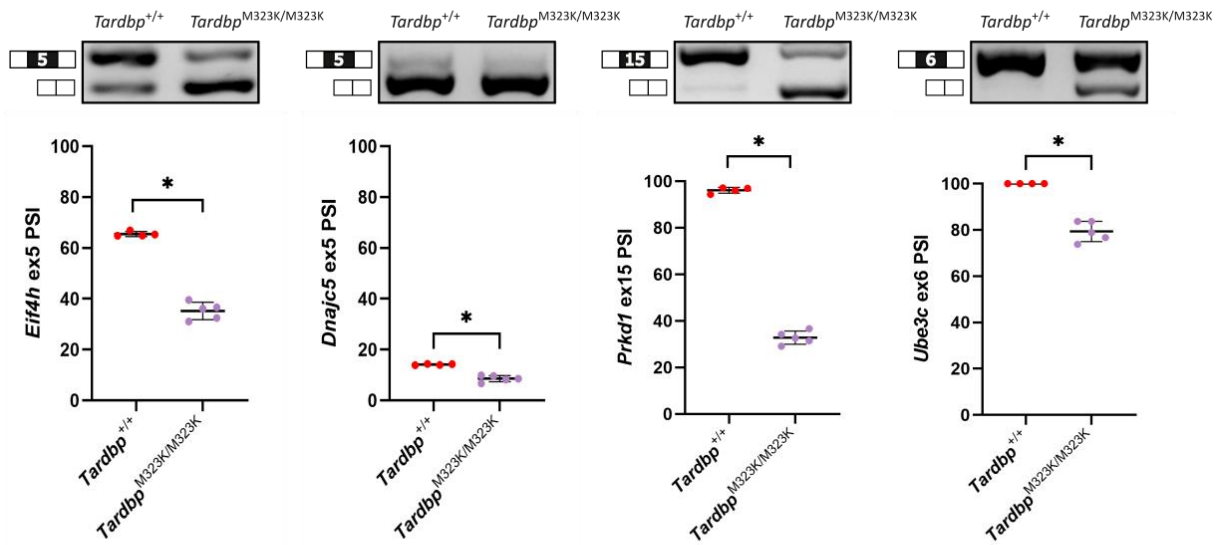


Figura 9. Cuantificación del PSI, en tejido de corteza cerebral, de ciertos exones de los genes *Eif4h*, *Dnajc5*, *Prkd1* y *Ube3c* en ratones *wild type* y homocigotos M323K de 3 y 18 meses de edad. En todos los casos, el PSI es significativamente menor en los homocigotos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$), lo que evidencia una clara GOF de *splicing*. En cada gráfico se representa la media acompañada de la desviación estándar.

mayor o menor inclusión en el ARNm depende del contexto biológico del animal y está regulada por varias proteínas. De esta manera, una variación en el porcentaje de inclusión conforme el animal envejece no tiene por qué significar un cambio en la GOF de *splicing* de TDP-43. Por otro lado, en la médula espinal, 2 de los 4 genes analizados (*Prkd1* y *Ube3c*) exhibieron una disminución significativa del PSI con la edad en ratones homocigotos (Figura 11B). *Eif4h* no mostró variaciones en el PSI con el envejecimiento y *Dnajc5* presentó un PSI significativamente aumentado, tanto entre ratones *wild type* como entre homocigotos, a los 18

3 meses de edad



18 meses de edad

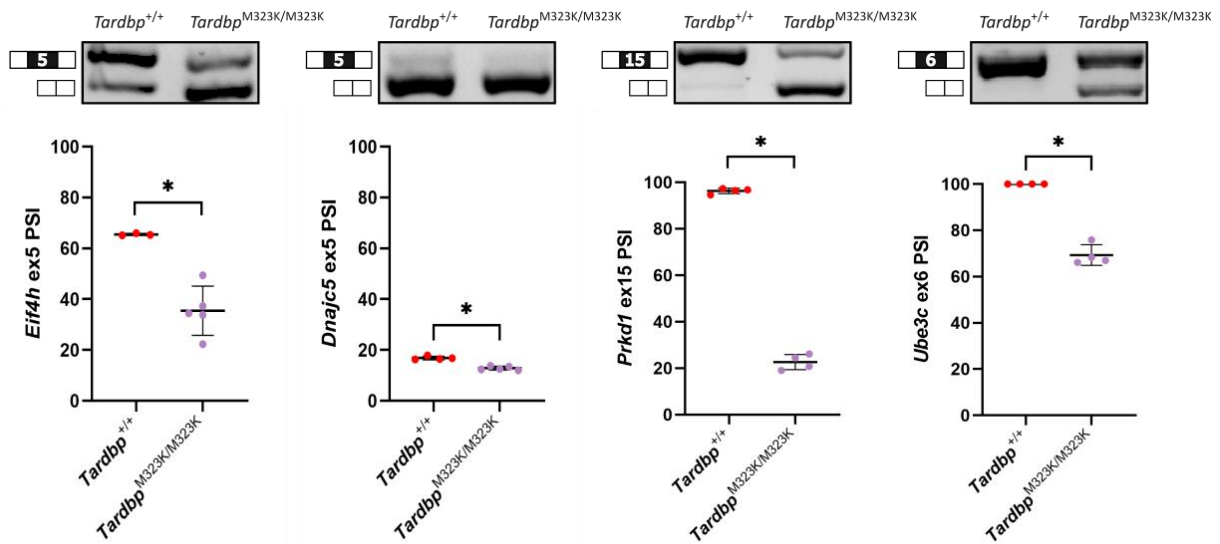
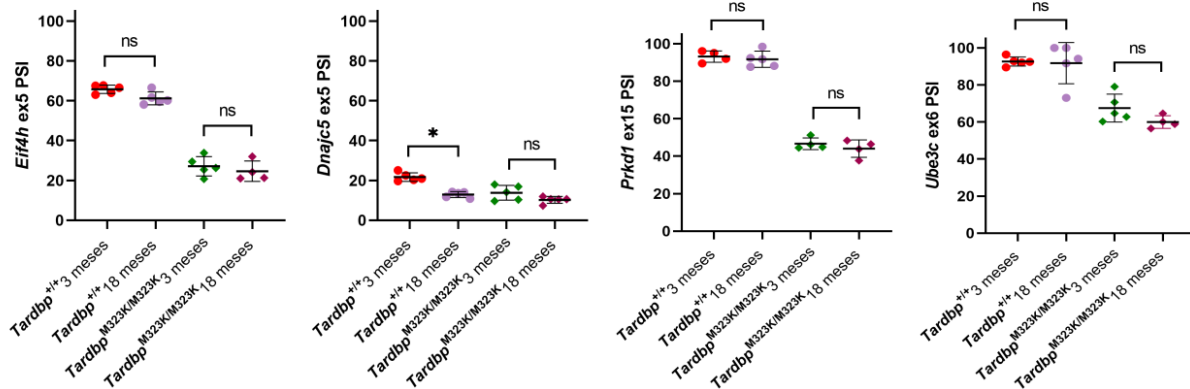


Figura 10. Cuantificación del PSI, en tejido de médula espinal, de determinados exones críticos de los genes *Eif4h*, *Dnajc5*, *Prkd1* y *Ube3c* en ratones *Tardbp*^{+/+} y *Tardbp*^{M323K/M323K} de 3 y 18 meses de edad. En todos los casos se puso de manifiesto una evidente GOF de *splicing*, pues el PSI resultó ser siempre significativamente menor en los homocigotos (*, $p < 0,05$). En cada gráfico está representada la media junto con la desviación estándar.

meses de edad (Figura 11B). En este caso, se aprecia como los 2 exones *skiptic*, que se deberían incluir constitutivamente en condiciones normales (pero en ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} empiezan a excluirse), experimentan una mayor exclusión conforme el animal envejece. Esto evidencia que este evento patológico, inherente a la GOF de TDP-43, se intensifica, sugiriendo un aumento de la GOF de *splicing* con la edad. Los cambios en el PSI de *Dnajc5*, que denotan una

A

Variación en Corteza



B

Variación en médula espinal

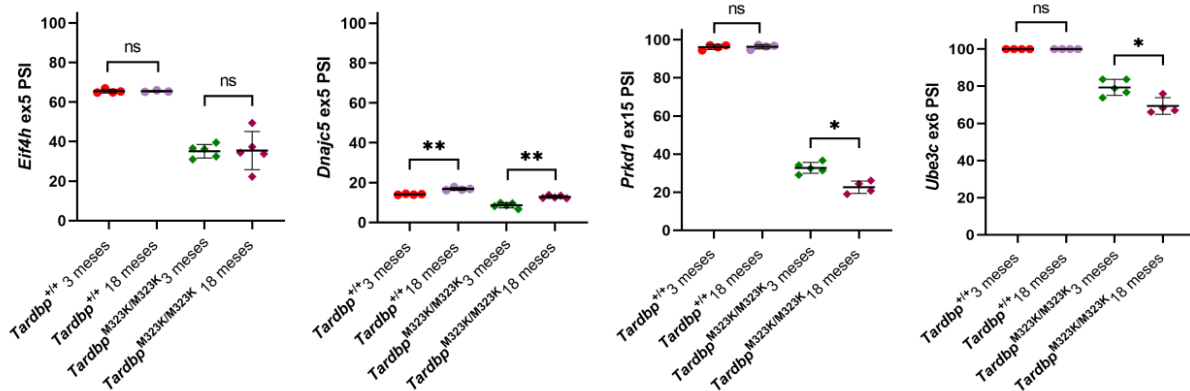


Figura 11. Variación del PSI con la edad en tejidos de corteza y médula. (A) En corteza, *Eif4h*, *Prkd1* y *Ube3c* no muestran diferencias significativas (ns) en el PSI entre los 3 y los 18 meses de edad ni en ratones *wild type* ni en homocigotos M323K. Solo *Dnajc5* presenta un PSI significativamente menor (*, $p < 0,05$), a los 18 meses de edad, entre ratones *wild type*. (B) En médula espinal, *Prkd1* y *Ube3c* exhiben un PSI significativamente menor ($p < 0,05$), entre ratones homocigotos, a los 18 meses edad. *Dnajc5* presenta un PSI significativamente mayor (**, $p < 0,01$), a los 18 meses, tanto entre homocigotos como entre *wild types*. *Eif4h* no muestra una variación significativa del PSI con la edad ni en ratones *wild type* ni en homocigotos. En todos los gráficos está representada la media acompañada de la desviación estándar.

pérdida de función con la edad, o la falta de variación en el PSI de *Eif4h* no son tan relevantes en este contexto, pues como ya se explicó, se tratan de exones *cassette*.

Comparación de la GOF de *splicing* de *Tardbp*^{M323K} y *Tardbp*^{Q331K}

Para establecer la comparación se analizó la GOF de *splicing* en tejido de médula espinal de ratones *Tardbp*^{M323K}, *Tardbp*^{Q331K} y *Tardbp*^{Q331K/M323K} de 1 año de edad. Para ello, se sacrificaron los animales, se extrajo tejido de médula y de esta se extrajo el ARN.

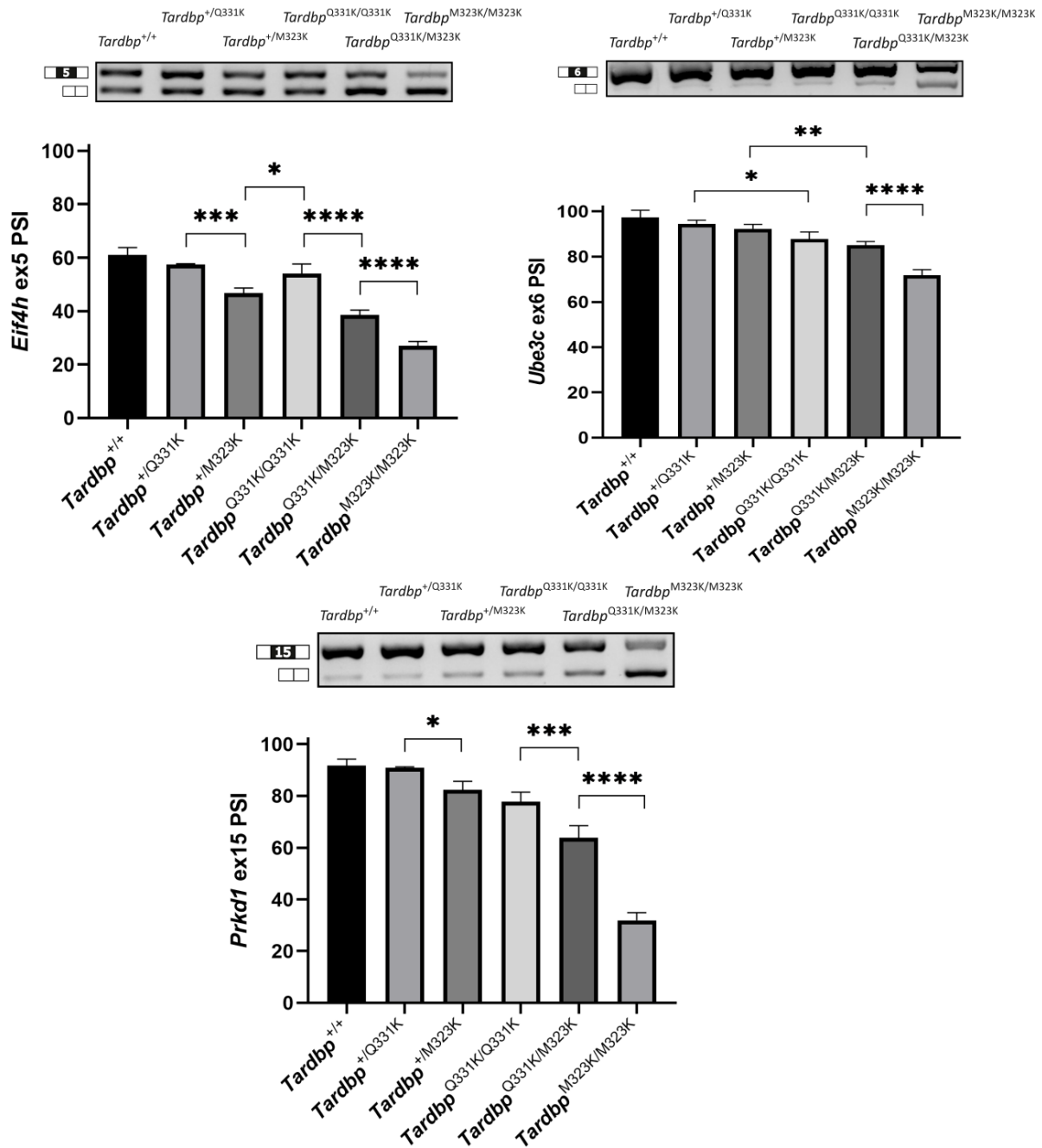


Figura 12. Cuantificación del PSI, en tejido de médula espinal, de determinados exones críticos de los genes *Eif4h*, *Ube3c* y *Prkd1*, en ratones *Tardbp*^{Q331K} (N = 3-5 por genotipo) y *Tardbp*^{M323K} (N = 3-5) de 1 año de edad. Se evidencia una mayor GOF de *splicing* proveniente de *Tardbp*^{M323K}, observándose un PSI significativamente menor a medida que se incrementa el número de alelos mutantes M323K (*, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; ****, p < 0,0001). En cada gráfico de barras se representa la media en conjunto con la desviación estándar.

Posteriormente, mediante RT-PCR se hizo la síntesis del cDNA que se empleó en las PCR para amplificar los exones *skiptic* o *cassette* de *Prkd1*, *Ube3c* y *Eif4h*. Finalmente, los resultados de las electroforesis posteriores revelaron qué genotipos poseían una mayor o menor GOF de *splicing*, atendiendo al valor del PSI.

En médula de ratones de 1 año la GOF de *splicing* de TDP-43 es significativamente mayor con la mutación *Tardbp*^{M323K} que con la mutación *Tardbp*^{Q331K}. Esto queda demostrado por varios factores que se muestran en la Figura 12: (1) El PSI de los ratones *Tardbp*^{Q331K/Q331K} es significativamente mayor que el de los ratones *Tardbp*^{M323K/M323K}. (2) El PSI de los ratones *Tardbp*^{Q331K/M323K} tiene un valor intermedio con respecto al de los ratones *Tardbp*^{Q331K/Q331K} y *Tardbp*^{M323K/M323K}. (3) Los ratones *Tardbp*^{+/Q331K} tienen un PSI mayor (con una diferencia significativa en *Eif4h* y *Prkd1*) que los ratones *Tardbp*^{+/M323K}. Por consiguiente, todo indica que la mutación *Tardbp*^{M323K} otorga una mayor GOF de *splicing* que *Tardbp*^{Q331K}, por lo menos al año de edad.

DISCUSIÓN

Datos previos de nuestro laboratorio sugieren que la ganancia de función de *splicing* de TDP-43 es uno de los posibles mecanismos en la patogénesis de la esclerosis lateral amiotrófica. En este sentido, en el presente trabajo se ha enfrentado la cuestión, por primera vez, de si existe alguna correlación entre la GOF de *splicing* de TDP-43 y la degeneración de motoneuronas espinales. Esto se ha estudiado en 2 modelos únicos de ratones con mutaciones endógenas (*knock-in*) en *Tardbp* (*Tardbp*^{M323K} y *Tardbp*^{Q331K}), los cuales tienen el mismo fondo genético híbrido C57BL/6JxDBA/2J. De esta manera, los fenotipos obtenidos solo pueden ser debidos a los efectos de las mutaciones. *In vivo*, ambos modelos presentan notables diferencias. Los ratones *Tardbp*^{M323K} sufren una reducción progresiva en el número de motoneuronas espinales y desarrollan un fenotipo motor gradual caracterizado, entre otros factores, por una disminución en la fuerza muscular (Fratta *et al.*, 2018). Sin embargo, según datos de White *et al.* del 2018 (en ratones con fondo genético C57BL/6J) y resultados aún no publicados de nuestro laboratorio, los ratones *Tardbp*^{Q331K} no presentan ni neurodegeneración de las neuronas motoras espinales ni el fenotipo motor mencionado.

En este estudio se ha demostrado, por conteo directo en cortes de médula espinal teñidos con galocianina, que existe una disminución del 28% en el número de motoneuronas espinales en ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} a los 2 años de edad (Figura 8B). Fratta *et al.* (2018) encontraron exactamente la misma reducción, lo que robustece y evidencia aún más que los ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} presentan degeneración de las neuronas motoras de la médula. Como novedad, en el presente trabajo también se contaron las motoneuronas espinales al año de edad, no encontrándose una diferencia significativa de los ratones homocigotos M323K con respecto a los *wild type* (Figura 8A). De esta manera, los resultados indican que los ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} sufren una degeneración progresiva de las motoneuronas espinales con la edad, lo que sugiere una disfunción motora gradual. Esto ya fue propuesto por Fratta *et al.* (2018) y ahora, con estos datos, se refuerza todavía más dicha teoría.

El análisis de inclusión de ciertos exones pertenecientes a los genes *Eif4h*, *Dnajc5*, *Ube3c* y *Prkd1* (Tabla 4), ha permitido determinar la existencia de una GOF de *splicing* de TDP-43 en ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} de 3 y 18 meses de edad, tanto en tejido de médula como de corteza (Figuras 9 y 10). El cómo evoluciona dicha GOF de *splicing* con la edad va de la mano, esencialmente, de cómo varía la inclusión los exones *skiptic* con el tiempo, puesto que estos son un evento completamente patológico fruto de esa GOF atípica de TDP-43. La mayor o menor inclusión de los exones *cassette* en el ARNm no depende, únicamente, de la actuación de TDP-43 y fluctúa en función del contexto biológico del animal. De esta manera, cambios en

su porcentaje de inclusión a lo largo de la vida del animal son normales (Roux & Rechavi, 2010) y no implican, necesariamente, que la GOF de *splicing* haya variado con la edad. Dicho esto, en médula se observó cómo los 2 exones *skiptic* (de *Ube3c* y *Prkd1*) presentaron un incremento significativo de su inclusión con la edad en ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} (Figura 11B), lo que sugiere que la GOF se incrementa conforme el animal envejece, algo que no se había señalado antes. Por otro lado, en corteza no existió una variación significativa en la inclusión de los exones *skiptic* con la edad ni en ratones *wild type* ni en homocigotos M323K (Figura 11A). Esto apunta a que no hubo una variación de la GOF de *splicing* con el envejecimiento de los ratones. En conjunto, se ha descrito como en médula parece haber una evolución de la GOF con la edad, mientras que en corteza no se presentan variaciones significativas. Resultados aún no publicados de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que los ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} exhiben un cerebro notablemente degenerado desde el momento de nacimiento. Esto podría explicar esa falta de variación de la GOF de TDP-43 con los años, pues ya desde un inicio la corteza está profundamente dañada. Sin embargo, la médula presenta un fenotipo más progresivo, acorde a una GOF de *splicing* que evoluciona con el tiempo.

Se han obtenido resultados que revelan que en la médula espinal la mutación *Tardbp*^{M323K} otorga una mayor GOF de *splicing* que la mutación *Tardbp*^{Q331K} (Figura 12). Para evidenciar esto, uno de los aspectos más destacados, que no se había realizado previamente, fue la realización de intercruces de ratones *Tardbp*^{+/M323K} con *Tardbp*^{+/Q331K}, obteniéndose así los ratones trans-heterocigotos (*Tardbp*^{Q331K/M323K}). De ser cierta la mayor GOF de *Tardbp*^{M323K}, estos ratones debían tener una GOF intermedia entre *Tardbp*^{M323K} y *Tardbp*^{Q331K} al tener un alelo de cada mutación y, justamente, así fue (Figura 12), culminando con la demostración. Fratta *et al.* (2018) ya observaron esta menor GOF ocasionada por *Tardbp*^{Q331K}, pero en ratones de diferentes edades y con distinto fondo genético (los *Tardbp*^{Q331K} eran C57BL/6J, mientras que los *Tardbp*^{M323K} eran C57BL/6JxDBA/2J), por lo que los resultados no eran tan robustos. De esta manera, en este estudio se ha demostrado, por primera vez en ratones con el mismo fondo genético y al año de edad, que en la médula *Tardbp*^{M323K} genera una mayor GOF que *Tardbp*^{Q331K}.

Como ya se ha resaltado, los ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} tienen una reducción de motoneuronas espinales progresiva, con una significativa neurodegeneración a los 2 años. Sin embargo, los ratones *Tardbp*^{Q331K/Q331K} no presentan neurodegeneración a esta edad. Además, también se comprobó que en la médula espinal la GOF de *splicing* ocasionada por *Tardbp*^{M323K} es superior a la causada por *Tardbp*^{Q331K}. Si combinamos estos factores, una plausible

explicación a todo este fenómeno es que exista una correlación, en la médula, entre ganancia de función de *splicing* de TDP-43 y degeneración de neuronas motoras espinales. En este sentido, podría existir un umbral de GOF a partir del cual empezaría a manifestarse la neurodegeneración. Así, la GOF ocasionada por *Tardbp*^{Q331K} no sobrepasaría dicho punto y, por ende, no habría neurodegeneración espinal. Por supuesto, son necesarios muchos más estudios para dilucidar hasta qué punto esta correlación es real. Un experimento que ayudaría en este cometido es comprobar si hay reducción de neuronas motoras espinales en ratones *Tardbp*^{Q331K/M323K} a los 2 años y compararla con la existente en ratones *Tardbp*^{M323K/M323K}. De existir una correlación, la neurodegeneración debería ser menor que la de *Tardbp*^{M323K/M323K} pues la GOF de *splicing* es inferior.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

La conclusión general de este trabajo es que podría existir una correlación en la médula espinal entre degeneración de las motoneuronas y ganancia de función de *splicing* de TDP-43. Esta relación se apoya en los siguientes puntos:

- Los ratones *Tardbp*^{M323K/M323K} presentan degeneración de las motoneuronas espinales, al contrario que los ratones *Tardbp*^{Q331K/Q331K}.
- La mutación *Tardbp*^{M323K} genera una ganancia de función de *splicing* de TDP-43 superior a la producida por la mutación *Tardbp*^{Q331K}.
- En la médula, tanto la degeneración de motoneuronas como la ganancia de función de *splicing* de TDP-43 se producen de forma progresiva.

The general conclusion of this work is that there could be a correlation in the spinal cord between motor neuron neurodegeneration and TDP-43 splicing gain-of-function. This relationship is based on the following points:

- *Tardbp*^{M323K/M323K} mice show degeneration of spinal motor neurons, unlike *Tardbp*^{Q331K/Q331K} mice.
- *Tardbp*^{M323K} mutation generates a higher TDP-43 splicing gain-of-function than *Tardbp*^{Q331K}.
- In the spinal cord, both motor neuron degeneration and TDP-43 splicing gain-of-function occur progressively.

BIBLIOGRAFÍA

- Austin, A., Beresford, L., Price, G., Cunningham, T., Kalmar, B., & Yon, M. (2022). Sectioning and counting of motor neurons in the L3 to L6 region of the adult mouse spinal cord. *Current Protocols*, 2, e428. <https://doi.org/10.1002/cpz1.428>
- Costa, J., & De Carvalho, M. (2016). Emerging molecular biomarker targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 455, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.01.011>
- De Boer, E. M., Orié, V. K., Williams, T. J., Baker, M., De Oliveira, H. G. *et al.* (2021). TDP-43 proteinopathies: a new wave of neurodegenerative diseases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 92(1), 86–95. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-322983>
- De Giorgio, F., Maduro, C., Fisher, E. M. C., & Acevedo-Arozena, A. (2019). Transgenic and physiological mouse models give insights into different aspects of amyotrophic lateral sclerosis. *Disease Models & Mechanisms*, 12(1). <https://doi.org/10.1242/dmm.037424>
- Devoy, A., Price, G., De Giorgio, F., Bunton-Stasyshyn, R. K. A., Thompson, D. R. *et al.* (2021). Generation and analysis of innovative genomically humanized knockin SOD1, *TARDBP* (TDP-43), and FUS mouse models. *IScience*, 24(12), 103463. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103463>
- de Winter, J.C.F. (2013). Using the Student's t-test with extremely small sample sizes. *Practical Assessment, Research, and Evaluation*, 18(10). <https://doi.org/10.7275/e4r6-dj05>
- Feldman, E. L., Goutman, S. A., Petri, S., Mazzini, L., Savelieff, M. G. *et al.* (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)
- Fratta, P., Sivakumar, P., Humphrey, J., Lo, K., Ricketts, T. C. *et al.* (2018). Mice with endogenous TDP-43 mutations exhibit gain of splicing function and characteristics of amyotrophic lateral sclerosis. *The EMBO Journal*, 37(11). <https://doi.org/10.15252/embj.201798684>
- Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W. *et al.* (2000). Early and Selective Loss of Neuromuscular Synapse Subtypes with Low Sprouting Competence in Motoneuron Diseases. *The Journal of Neuroscience*, 20(7), 2534–2542. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-07-02534.2000>
- Goutman, S. A., Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chiò, A., Savelieff, M. G. *et al.* (2022). Emerging insights into the complex genetics and pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *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)
- Jiang, L., Xue, W., Hong, J., Zhang, J., Minter, S. D., *et al.* (2017). The N-terminal dimerization is required for TDP-43 splicing activity. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06263-3>
- Johnson, S. M., Fang, T., De Marchi, F., Neel, D. S., Van Weehaeghe, *et al.* (2022). Pharmacotherapy for Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Review of Approved and Upcoming Agents. *Drugs*, 82(13), 1367–1388. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01769-1>
- Joyce, P. R., Fratta, P., Landman, A., McGoldrick, P., Wackerhage, H. *et al.* (2016). Deficiency of the zinc finger protein ZFP106 causes motor and sensory neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 25(2), 291–307. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv471>
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C. *et al.* (2006). Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*, 314(5796), 130–133. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>

- 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. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00025>
- Ratti, A., & Buratti, E. (2016). Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *Journal of Neurochemistry*, 138, 95–111. <https://doi.org/10.1111/jnc.13625>
- Roche Diagnostics. (2019). *LightCycler® 480 Instrument: Operator's Manual*. Suiza. MA: Autor
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P. *et al.* (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59–62
- Rouaux, C., De Aguilar, J. D., & Dupuis, L. (2018). Unmasking the skiptic task of TDP-43. *The EMBO Journal*, 37(11). <https://doi.org/10.15252/embj.201899645>
- Roux, J., & Robinson-Rechavi, M. (2010). Age-dependent gain of alternative splice forms and biased duplication explain the relation between splicing and duplication. *Genome Research*, 21(3), 357–363. <https://doi.org/10.1101/gr.113803.110>
- Suk, T. R., & Rousseaux, M. W. (2020). The role of TDP-43 mislocalization in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00397-1>
- Taylor, J., Brown, R. S., & Page, D. C. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*, 539(7628), 197–206. <https://doi.org/10.1038/nature20413>
- Truett, G. E., Heeger, P. S., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. P. *et al.* (2000). Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques*, 29(1), 52–54. <https://doi.org/10.2144/00291bm09>
- Van Damme, P., Robberecht, W., & Van Den Bosch, L. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. *Disease Models & Mechanisms*, 10(5), 537–549. <https://doi.org/10.1242/dmm.029058>
- White, M. S., Kim, E., Duffy, A., Adalbert, R., Phillips, B. L. *et al.* (2018). TDP-43 gains function due to perturbed autoregulation in a *Tardbp* knock-in mouse model of ALS-FTD. *Nature Neuroscience*, 21(4), 552–563. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0113-5>