

UCH-FC  
MAD-B  
B251  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE POSTGRADO

**ROL DE LA RESPUESTA DE PROTEINAS MAL PLEGADAS (UPR)  
EN LA PATOLOGÍA MEDIADA POR TDP-43 EN LA ESCLEROSIS  
LATERAL AMIOTRÓFICA**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas

**Leslie Ann Bargsted Elgueda**

Julio, 2016

Santiago - Chile

Director de Tesis: Dr. Claudio Hetz

Co-directora de Tesis: Dra. Soledad Matus

UNIVERSIDAD DE CHILE

## INFORME DE APROBACIÓN-TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

**Leslie Ann Bargsted Elgueda**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 26 de julio de 2016.

**Director de Tesis:**

Dr. Claudio Hetz



**Co-directora de Tesis:**

Dra. Soledad Matus

Soledad Matus

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dra. Cecilia Vergara

C. Vergara

Dr. Alejandro Roth



«La ciencia no solo es compatible con la  
espiritualidad; es una profunda fuente de  
espiritualidad».

Carl Sagan

## RESUMEN BIOGRÁFICO

Yo, Leslie Ann Bargsted Elgueda, nací el 15 de septiembre de 1989 en la ciudad de Santiago de Chile. Soy hija de Cristina Elgueda y hermana mayor de Andrew Bargsted, y puedo decir con mucho orgullo que tuve una infancia feliz y completa gracias a los increíbles esfuerzos de mi madre por lograrlo. Somos una familia hincha acérrima del más grande equipo de fútbol, Universidad de Chile, y claramente también tenemos una admiración incondicional con la casa de estudios.



Durante toda mi niñez y adolescencia asistí al Colegio Internacional Alba, institución donde recibí mi primera formación. Lo aprendido en el colegio ha sido fundamental para formar los cimientos que me permitieron llegar adonde estoy ahora. Desde ahí evidencé un interés por las ciencias en general y asombro por los distintos descubrimientos y aportes hechos a la humanidad durante los últimos siglos. Es posible que desde ahí haya surgido mi inspiración para dedicarme a la ciencia. Estudié Ingeniería en Biotecnología Molecular en mi alma mater, la Universidad de Chile, y ahora me perfecciono culminando un ciclo de Magister en Ciencias Biológicas en la misma casa de estudios. Soy una orgullosa hija de Bello.

El fin de este ciclo significa el inicio de otro más grande y con más desafíos. Iniciaré un programa de PhD. en Suiza, en la Universidad de Basilea, donde podré desarrollar mi carrera científica. Ojalá en el día de mañana, pueda ser un aporte para la comunidad investigadora en general y más importantemente, un aporte para mi querido país.

## AGRADECIMIENTOS

En el cierre de esta linda etapa y en el comienzo de una con muchos nuevos desafíos, el apoyo incondicional de mi familia y amigos ha sido fundamental. Gracias a ellos, que son un pilar trascendental en mi vida, logré terminar exitosamente esta tesis a pesar de todos los inconvenientes que surgieron en el camino. Mil gracias mami y hermanito por su ánimo cada día, los amo mucho. También abrazos gigantes a mis queridos "Bioteks", en especial a Blops, Perry, Kessi, Dani, Sandra y Vale por su alegría constante.

También quiero agradecer a mi tutor de tesis Claudio Hetz por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, lugar donde pude aprender muchísimo y crecer como persona y como investigadora. Gracias Claudio por el legado que me entregaste en cuanto al desarrollo de mi capacidad analítica y crítica a la hora de pensar en algún problema de índole científico.

Agradecer de igual forma a Soledad Matus, mi cotutora de tesis, por ser tan cercana y por todo lo que me enseñó directamente en el mesón y para la vida. Gracias Sole por tu increíble disposición, paciencia y aliento en cada uno de los momentos, los buenos y los no tan buenos.

Además, quiero dar agradecimientos más que especiales a Natalia Muñoz por su ayuda fundamental en la última etapa de esta tesis. Sin ti, amiga Nata, ¡no lo hubiese logrado!

A los miembros del Laboratorio de Estrés Celular y Biomedicina también quiero agradecerles por su buena onda y disposición, lo que también es muy importante en el momento de trabajar y desarrollarnos. Mencionar al Osito, Hugo, Denisse, Pilip, Estefanie, Hery, Javi y Caro por las risas eternas y el buen ambiente. Y tampoco olvido al ALS team por su constante ayuda y consejos en los experimentos.

Finalmente agradecer a los miembros de la comisión, la Dra. Cecilia Vergara y Dr. Alejandro Roth, por las acertadas acotaciones que me entregaron para el término de esta tesis.

## LISTA DE MATERIAS

### ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>1. ABSTRACT</b> .....	3
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
2.1. Esclerosis lateral amiotrófica (ELA).....	6
2.2. TDP-43 en ELA.....	10
2.3. Estrés del retículo endoplásmico (RE) y la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR).....	20
2.4. Antecedentes que relacionan la UPR con la ELA .....	25
2.4. TDP-43 y el estrés de RE .....	29
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	31
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	32
4.1. Objetivos Específicos.....	32
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
5.1. Mantenimiento de colonias de ratones TDP43 <sup>A315T</sup> y genotipificación .....	33
5.2. Monitoreo animales, pruebas motoras y conductuales .....	35
5.2.1. Mediciones de peso corporal .....	35
5.2.2. Prueba motora de <i>hanging</i> .....	35
5.3. Inyecciones intraperitoneales de tunicamicina en ratones .....	36
5.4. Análisis de muestras de tejido animal por microscopía.....	36
5.4.1. Perfusión de animales y cortes de tejido .....	36
5.4.2. Inmunofluorescencia de tejido .....	37
5.4.3. Inmunohistoquímica de tejido.....	38
5.5. Generación de líneas estables de células NSC34 TDP-43 <sup>WT</sup> y TDP-43 <sup>A315T</sup> ....	39
5.6. Cinética de Tunicamicina en células NSC34.....	41
5.7. Análisis de líneas celulares por microscopía.....	41
5.7.1. Inmunofluorescencia de células.....	41
5.7.2. Microscopía Automatizada (Cellomics).....	42

5.8.1.	Extracción de proteínas desde tejido animal .....	43
5.8.2.	Extracción de proteínas desde células .....	43
5.8.3.	SDS-PAGE y western blot .....	44
5.8.4.	Filter Trap .....	45
5.8.5.	Extracción de ARN y generación de ADN complementario.....	46
5.8.6.	PCR en tiempo real.....	47
5.8.7.	PCR convencional y digestión con enzima PstI .....	48
5.9.	Ensayo de luciferasa para células .....	49
5.9.	Análisis Estadístico .....	50
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
6.1.	Caracterización del modelo murino transgénico TDP-43 <sup>A315T</sup> .....	51
6.2.	Análisis bioquímico del tejido derivado del modelo TDP-43A315T en estadio sintomático terminal .....	60
6.3.	Análisis de los niveles de activación de la UPR en tejido derivado del modelo TDP-43 <sup>A315T</sup> en estadio sintomático terminal.....	63
6.4.	Evaluación de la capacidad de respuesta frente al estrés de RE del modelo TDP-43 <sup>A315T</sup> .....	63
6.5.	Evaluación de la capacidad de respuesta de un modelo <i>in vitro</i> de TDP-43WT y TDP-43 <sup>A315T</sup> frente a una condición de estrés de RE .....	72
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>84</b>
7.1.	Caracterización de la progresión a nivel de peso corporal y motor de la patología del modelo murino TDP43 <sup>A315T</sup> .....	85
7.2.	Análisis bioquímico e histológico del tejido nervioso del modelo murino TDP-43 <sup>A315T</sup> en estadio sintomático terminal .....	88
7.3.	Evaluación de la capacidad de respuesta del modelo murino TDP-43 <sup>A315T</sup> frente a una condición de estrés de RE .....	91
7.4.	Evaluación de la capacidad de respuesta de un modelo <i>in vitro</i> de TDP-43 <sup>WT</sup> y TDP-43 <sup>A315T</sup> frente a una condición de estrés de RE .....	94
<b>8.</b>	<b>PROYECCIONES .....</b>	<b>100</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>101</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Inclusiones ubiquitinadas y positivas para TDP-43 en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y demencia frontotemporal (DFT).	12
<b>Figura 2</b>	Estructura y funciones de TDP-43 en condiciones fisiológicas.	14
<b>Figura 3</b>	La Respuesta de Proteínas mal plegadas (UPR).	24
<b>Figura 4</b>	Esquema del proceso de cruza para amplificar la colonia TDP43 <sup>A315T</sup> .	34
<b>Figura 5</b>	Generación de líneas celulares estables con sistema Tet-One.	40
<b>Figura 6</b>	Caracterización del modelo murino transgénico para TDP-43 <sup>A315T</sup> .	53
<b>Figura 7</b>	Detección de la sobre-expresión de la proteína TDP-43 en el tejido nervioso de los animales TDP-43 <sup>A315T</sup> por inmunofluorescencia.	54
<b>Figura 8</b>	Determinación de la sobrevida de los animales TDP-43 <sup>A315T</sup> .	55
<b>Figura 9</b>	Perfil de expresión de la proteína TDP-43 en extractos de corteza y médula espinal comparando por género.	57
<b>Figura 10</b>	Curvas de progresión de la enfermedad de los ratones TDP-43 <sup>A315T</sup> determinadas por parámetros de peso corporal y habilidades motoras.	58
<b>Figura 11</b>	Determinación del inicio y duración de la enfermedad en los ratones TDP-43 <sup>A315T</sup> , separando por género.	59
<b>Figura 12</b>	Caracterización bioquímica de agregados proteicos en extractos de corteza de ratones TDP-43 <sup>A315T</sup> sintomáticos.	61
<b>Figura 13</b>	Caracterización bioquímica de agregados proteicos en extractos de médula espinal de ratones TDP-43 <sup>A315T</sup> sintomáticos.	62

<b>Figura 14</b>	Medición de la expresión basal de marcadores de la UPR a nivel transcripcional en extractos de corteza de ratones TDP-43 <sup>A315T</sup> sintomáticos.	64
<b>Figura 15</b>	Medición de la expresión basal de marcadores de la UPR a nivel transcripcional en extractos de médula espinal de ratones TDP-43 <sup>A315T</sup> sintomáticos.	65
<b>Figura 16</b>	Estandarización de la inyección intraperitoneal de la droga tunicamicina en ratones No-Tg.	67
<b>Figura 17</b>	Análisis de la expresión de marcadores de la UPR en extractos de corteza de animales TDP-43 <sup>A315T</sup> inyectados intraperitonealmente con tunicamicina.	69
<b>Figura 18</b>	Análisis de la expresión de marcadores de la UPR en extractos de médula espinal de animales TDP-43 <sup>A315T</sup> inyectados intraperitonealmente con tunicamicina.	70
<b>Figura 19</b>	Análisis de la expresión de marcadores de la UPR en extractos de hígado de animales TDP-43 <sup>A315T</sup> inyectados intraperitonealmente con tunicamicina.	71
<b>Figura 20</b>	Caracterización de las líneas estables inducibles NSC34 que expresan la forma humana de TDP-43 WT y con la mutación A315T.	73
<b>Figura 21</b>	Análisis bioquímico de la fragmentación de TDP-43 en las líneas estables NSC34 TDP-43 <sup>WT</sup> y TDP-43 <sup>A315T</sup> en condiciones de estrés de RE, con muestras proteicas en condiciones no reductoras (-DTT).	76
<b>Figura 22</b>	Análisis bioquímico de la fragmentación de TDP-43 en las líneas estables NSC34 TDP-43 <sup>WT</sup> y TDP-43 <sup>A315T</sup> en condiciones de estrés de RE, con muestras proteicas en condiciones reductoras (+DTT).	77
<b>Figura 23</b>	Evaluación de marcadores de la UPR a nivel proteico en las líneas estables inducibles NSC34 TDP-43 <sup>WT</sup> y TDP-43 <sup>A315T</sup> .	79
<b>Figura 24</b>	Análisis de la morfología del RE en células que expresan la TDP-43 en su forma WT bajo una condición de estrés de RE.	81
<b>Figura 25</b>	Análisis de la morfología del RE en células que expresan la TDP-43 en su forma mutante (A315T) bajo una condición de estrés de RE.	82
<b>Figura 26</b>	Evaluación de la función del factor XBP1 en presencia de TDP-43 en su forma WT y mutante (A315T) por medio de un ensayo de luciferasa.	83

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Genes asociados a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).	11
<b>Tabla 2</b>	Modelos de ganancia de función de TDP43.	18
<b>Tabla 3</b>	Modelos de pérdida de función de TDP43.	19
<b>Tabla 4</b>	Parámetros cuantitativos obtenidos de la caracterización sistemática del modelo TDP43 <sup>A315T</sup> por mediciones de peso corporal y prueba motora de <i>hanging</i> .	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AAAT** - Neutral amino acid transporter B
- ADN** - Ácido desoxirribonucleico
- ADNc** - Ácido Desoxirribonucleico complementario
- ALS2** - Amyotrophic Lateral Sclerosis 2 (juvenile)/Alsin
- ANG** - Angiogenin
- ANOVA** - Analysis of Variance
- ARN** - Ácido Ribonucleico
- ARNm** - Ácido Ribonucleico mensajero
- ASK1** - Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
- ATF4** - Activating transcription factor 4
- ATF6** - Activating Transcription Factor 6
- BCL-2** - B-Cell Lymphoma 2
- Bim/BCL2L11** - BIM, Bcl-2-like protein 11
- BIP** - Binding Immunoglobulin Protein/Grp78
- BSA** - Bovine Serum Albumin
- C9ORF72** - Chromosome 9 Open Reading Frame 72
- CaMKII** - Calcio-Calmodulina Quinasa II
- CHOP** - C/EBP Homologous Protein
- Cu/Zn** - Cobre/Zinc
- DLFT-TDP** - Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones positivas para TDP43
- DLFT-U** - Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones positivas para Ubiquitina
- DFT** - Demencia Frontotemporal
- dNTP** - Deoxinucleósido Trifosfato

**DTT** - Ditiotritol  
**ECL** - Enhanced Chemiluminescence  
**EDTA** - Ácido Etilendiaminotetraacético  
**EDEM** - ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein  
**eIF2 $\alpha$**  - eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$   
**ELA** - Esclerosis Lateral Amiotrónica  
**ERAD** - Endoplasmic Reticulum-associated degradation  
**ERp57** - Endoplasmic Reticulum Protein 57/Grp58  
**ERp72** - Endoplasmic Reticulum Protein 72  
**FUS** - Fused in Sarcoma  
**Grp94** - Glucose Regulated Protein 94  
**HeLa** - Henrietta Lacks (cell line)  
**hnRNP** - Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein  
**HRP** - Horseradish Peroxidase  
**HSP90** - Heat Shock Protein 90  
**hTDP-43** - human TAR DNA Binding Protein 43  
**IRE1** - Inositol Requiring Kinase 1  
**JNK** - c-Jun-N terminal Kinase  
**LTR** - Long Terminal Repeat  
**MEF** - Mouse Embryonic Fibroblast  
**NI** - No inducidas  
**No-Tg** - No Transgénico  
**NP-40** - Nonidet P-40  
**NSC34** - Neuroblastoma-Spinal Cord 34  
**NT** - No tratadas  
**OCT** - Optimal Cutting Temperature  
**OPTN** - Optineurin  
**PBS** - Phosphate-Buffered Saline  
**PCR** - Polymerase Chain Reaction

**PDI** - Protein Disulfide Isomerase  
**PERK** - PKR-like ER kinase  
**PFA** - Paraformaldehído  
**PrPm** - Promotor de Prion murino  
**PstI** - *Providencia stuartii* I  
**PUMA** - p53 Upregulated Modulator of Apoptosis  
**PVDF** - Polyvinylidene Fluoride  
**qPCR** - quantitative PCR  
**RE** - Retículo Endoplasmático  
**RNA** - Ribonucleic Acid  
**RPM** - Revoluciones Per Minuto  
**RRM** - RNA-Recognition Motif  
**RT** - Reverse Transcription  
**RT-qPCR** - Reverse Transcription- quantitative PCR  
**SDS** - Sodium Dodecyl Sulphate  
**SDS-PAGE** - Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
**SETX** - Senataxin  
**SNC** - Sistema Nervioso Central  
**SOD1** - Superóxido Dismutasa 1  
**TAR** - Trans-Activation Response element  
**TARDBP** - TAR DNA Binding Protein  
**TDP-43** - TAR DNA Binding Protein 43  
**TE** - Tris-Cl - EDTA  
**TEMED** - Tetrametiletilenodiamina  
**TEN** - Tris-Cl - EDTA – NaCl  
**Tm** – Tunicamicina  
**TRB3** - tribbles-related protein 3  
**UA** - Unidades Arbitrarias  
**UPR** - Unfolded Protein Response

**UPS** - Ubiquitin-Proteasome System

**UTR** - Untranslated Region

**VAPB** - Vesicle-associated membrane protein-associated protein B

**VIH-1** - Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1

**WT** - Wild Type

**XBP1** - X-Box binding protein-1

**XBP1s** - X-Box binding protein-1 spliced

**XBP1t** - X-Box binding protein-1 total

**XBP1u** - X-Box binding protein-1 unspliced

## 1. RESUMEN

TDP-43, una proteína nuclear cuyas funciones tienen relación con el metabolismo del ARN y ADN, es el principal constituyente de las inclusiones y agregados proteicos ubiquitinados presentes en tejido *post-mortem* de la mayoría de los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y demencia frontotemporal (DFT). En particular, la patología de la ELA ha sido asociada a un fenómeno de acumulación de proteínas mal plegadas y a su vez a una condición de "estrés de retículo endoplasmático (RE)" en las motoneuronas. Frente a esta condición de estrés de RE, la célula activa una vía de señalización llamada respuesta de proteínas mal plegadas (UPR, sigla en inglés). El rol de la UPR en la patología de la ELA ha adquirido gran relevancia en el campo de estudio en los últimos años. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descrito en forma cabal el rol que podría tener la UPR en el contexto de la proteinopatía de TDP-43. En esta tesis, se evaluó la respuesta frente a condiciones de estrés de RE en un modelo animal y celular de la proteinopatía de TDP-43. Para los estudios *in vivo* se utilizó un modelo murino que sobre-expresa en el sistema nervioso central la forma de TDP-43 humana con la mutación A315T, asociada a ELA. Se detectó que este ratón transgénico genera agregados positivos para TDP-43 en la corteza cerebral y la médula espinal en estadio sintomático terminal. Además, estos tejidos nerviosos no respondieron cabalmente a una condición de estrés de RE inducida farmacológicamente. Con una aproximación *in vitro* se observó el mismo fenómeno, ya que al tratar con un estresor de RE una línea celular de motoneuronas que expresa la TDP-43 con la mutación A315T, la

activación de blancos de la UPR fue significativamente menor a la de condiciones control. Estos resultados sugieren que la condición patológica asociada a la presencia de TDP-43 anómala estaría disminuyendo la capacidad adaptativa de las células frente a perturbaciones en la homeostasis del RE, alterando de esta forma la fisiología neuronal. Estos datos resultan ser bastante interesantes y novedosos para el campo de la ELA, y abren nuevas preguntas acerca de los mecanismos que alteran la supervivencia de las motoneuronas.

## 1. ABSTRACT

TDP-43, a nuclear protein whose functions are related to the DNA and RNA metabolism, is the main constituent of the ubiquitinated inclusions and protein aggregates present in *post-mortem* tissue of most of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). In particular, the pathology of ALS has been associated with a phenomenon of accumulation of misfolded proteins and also with a condition of "endoplasmic reticulum (ER) stress" in motoneurons. Under this condition of ER stress, the cell activates a signaling pathway named unfolded protein response (UPR). The role of the UPR in ALS pathology has acquired great importance in the field in the recent years. However, to date, it is not well described the role which could have the UPR in the context of TDP-43 proteinopathy. In this thesis, we evaluated the response under ER stress conditions in an animal and cell model of TDP-43 proteinopathy. For *in vivo* studies, we used a mouse model that overexpress a human form of TDP-43 with the mutation A315T, that has been associated to ALS. We detected that this transgenic mouse in symptomatic end stage generates positive aggregates for TDP-43 in cerebral cortex and spinal cord. Furthermore, these nervous tissues did not fully respond to a condition of ER stress induced pharmacologically. With an *in vitro* approach the same phenomenon was observed, since we treated with a ER stressor a motoneuron cell line that express TDP-43 with the A315T mutation, the activation of UPR targets was significantly lower than control conditions. These results suggest that the pathological condition

associated with the presence of abnormal TDP-43 would be decreasing the adaptive capacity of cells against a disturbance of RE homeostasis, thereby altering neuronal physiology. These data are quite interesting and novel for the field of ALS, and open up new questions about the mechanisms that alter the survival of motoneurons.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas más comunes en los seres humanos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, ELA y la DFT, comparten la característica de presentar inclusiones proteicas en las células nerviosas de los tejidos afectados de los pacientes, las cuales pueden ser de naturaleza intra o extracelular (Kopito y Ron 2000; Taylor et al., 2002). La presencia de estas inclusiones se ha relacionado con alteraciones de las funciones celulares esenciales que podrían llevar al deterioro de las neuronas y en muchos casos a la muerte de ellas. Las perturbaciones generales de la funcionalidad neuronal podrían estar asociadas a anomalías en la sinapsis (Maselli et al., 1993), alteración en el transporte axonal (Ikenaka et al., 2012), inhibición proteosomal (Irmiler et al., 2012; Y. M. Kim et al., 2011) y el estrés oxidativo (Kovacic y Somanathan, 2012).

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta a las motoneuronas y no tiene una etiología clara. Hasta el año 2006, se habían identificado un porcentaje menor de mutaciones asociadas a formas familiares de la enfermedad, destacándose las presentes en el gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD1) dado que fue el primero que se identificó como causante de casos de ELA (Boillée et al., 2006; Rosen et al., 1993). En el año 2006, se publicó un hallazgo que marca un precedente dentro del área de la investigación de la ELA e incluso de otras enfermedades neurodegenerativas. Se identificó a una proteína llamada TAR DNA Binding Protein 43 (TDP-43) como el componente

principal de las inclusiones proteicas citoplasmáticas y nucleares presentes en tejido *post mortem* de pacientes con ELA y demencia lobar fronto-temporal con inclusiones positivas para ubiquitina (DLFT-U), un tipo de DFT. De los tejidos analizados la mayoría mostró presencia de inclusiones de TDP-43 ubiquitinadas; en el caso de los tejidos de pacientes con ELA éstas se localizaban en la médula espinal y la corteza, y en los pacientes con DFT estaban presentes en la corteza y el hipocampo (Neumann et al., 2006). Lo interesante de esta observación es que los tejidos analizados, en ambos casos, provenían de personas con desordenes de naturaleza familiar y esporádica (Neumann et al., 2006). Por lo tanto, este fue un descubrimiento que tomó una gran importancia a nivel clínico debido a que fue posible identificar una alteración molecular presente en la mayoría de los casos de ELA y DFT, abriendo incluso nuevos campos de investigación dedicados a dilucidar posibles conexiones entre estas dos enfermedades.

## **2.1. Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)**

La ELA (también conocida como enfermedad de Loy Gehrig y enfermedad de Charcot) es un desorden progresivo, letal y degenerativo que afecta principalmente a las motoneuronas, condición que le otorga un sello distintivo ya que ocurre la muerte selectiva de estos tipos celulares alojados en el cerebro y la médula espinal, luego de disminuir gradualmente su funcionamiento. Los pacientes que padecen ELA presentan cuadros de parálisis de los músculos voluntarios, acompañados de una exaltación de los reflejos tendinosos (Mitchell y Borasio, 2000; Pasinelli y Brown, 2006). En este contexto patológico la pérdida de fibras nerviosas va acompañada de

una "esclerosis", endurecimiento o cicatrización glial en la zona lateral de la médula espinal, que es una región constituida principalmente por axones nerviosos que participan directamente en el control de los movimientos voluntarios. Por otro lado, es "amiotrófica" debido a que se genera una atrofia muscular como una consecuencia de la inactividad muscular crónica por la carencia de recepción de señales nerviosas y que es provocada por la degeneración de las fibras señaladas.

Dentro de los signos a nivel celular en este tipo de enfermedad neurodegenerativa se destacan la acumulación de neurofilamentos fosforilados, cuerpos Bunina, inclusiones tipo cuerpo de Lewy, y por otro lado de forma excluyente acumulación de inclusiones esferoides y hebras de material ubiquitinado en los axones de las motoneuronas (Pasinelli y Brown, 2006). También es muy común en ELA la activación y proliferación de astrocitos y microglías (Ferraiuolo et al., 2011; Turner et al., 2013). Lamentablemente, hasta la fecha no existe una terapia primaria para este desorden, y Riluzol que es el único fármaco aprobado para el tratamiento, sólo mejora ligeramente los síntomas (Bensimon, Lacomblez y Meininger, 1994; Miller et al., 2007). El mecanismo de acción del fármaco Riluzol es desconocido, sin embargo, se ha sugerido que podría tener una acción anti-glutamatérgica (Doble, 1996). Se cree que los distintos fracasos en la prueba de fármacos en ELA podrían estar vinculados a una aplicación tardía dentro del transcurso de la enfermedad, debido a que el retraso promedio del diagnóstico es un año (Mitchell et al., 2010). Por otro lado, se desconoce cuándo se inician los cambios patológicos, pero aparentemente las manifestaciones clínicas se gatillan cuando los eventos nocivos a nivel celular son irreversibles (Turner et al., 2013). Un diagnóstico en

etapas prematuras de la patología podría generar mayor chance de obtener resultados óptimos en la introducción de las terapias.

La mayoría de los casos de ELA son clasificados como esporádicos (90%), es decir con la carencia de un origen asociado a un elemento genético obvio y sólo el 10% de los casos la enfermedad es heredada de forma dominante, otorgándole una categoría de familiar. Las primeras mutaciones que fueron descritas en casos familiares fueron asociadas al gen de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Rosen et al., 1993), y por muchos años se describieron las mutaciones en este gen como los casos más frecuentes dentro del grupo de cuadros de ELA familiar. Debido a esto, los modelos de estudio experimental en ELA asociado a la mutación en este gen son ampliamente utilizados y están bien establecidos. Sin embargo, recientemente se describió que la mutación dada por la expansión anormal de repeticiones de hexanucleótidos en el gen *C9ORF72*, constituye el factor de mayor incidencia en ELA (40% de los casos familiares y 7-10% de casos esporádicos (Boeve y Graff-Radford, 2012; Dafinca et al., 2016; Dejesus-hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Interesantemente, el hallazgo de las mutaciones en este gen no sólo se ha atribuido a cuadros de ELA, sino que también de DFT, otra enfermedad neurodegenerativa que no tiene cura (Boeve y Graff-Radford, 2012; Dejesus-hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011).

Tanto la ELA esporádica como familiar desencadenan síntomas similares, como manifestaciones progresivas de la disfunción de las neuronas motoras inferiores (atrofia muscular, calambres y fasciculaciones) y neuronas corticales motoras (espasticidad y reflejos patológicos) en ausencia de síntomas sensoriales

(McGuire et al., 1996). Las causas fisiológicas de estos síntomas no están aún bien definidas; las investigaciones han identificado múltiples perturbaciones de la función celular en las motoneuronas, hiperexcitabilidad, mal plegamiento de proteínas, producción de energía deteriorada, metabolismo del calcio anormal, transporte axonal disminuido y activación de proteasas y nucleasas, disfunción mitocondrial en cuanto al decrecimiento de la actividad de los componentes de la cadena transportadora de electrones, excitotoxicidad, estrés oxidativo, neuroinflamación (Cleveland y Rothstein, 2001; Ferraiuolo et al., 2011; Rozas et al., 2016.; Turner et al., 2013). En los últimos años la sintomatología de la ELA se ha relacionado estrechamente con características ligadas a la DFT (Lillo et al., 2014; Ling et al., 2013; Zago et al., 2011). Se han publicado registros de casos de ELA en que se han manifestado síntomas relacionados con demencia, como cambios en la personalidad y conducta, y viceversa en casos de DFT en los cuales se han evidenciado problemas motores (Lillo et al., 2014; Zago et al., 2011). Estas observaciones han llevado a un cambio en el paradigma de ambas enfermedades, donde se ha postulado que tanto ELA como DFT forman parte de un desorden neurodegenerativo común, debido a que comparten estrechamente los mecanismos moleculares ligados a la enfermedad y sus características histopatológicas (Arai et al., 2006; Ling et al., 2013; Neumann, 2009; Neumann et al., 2006). El hallazgo de las mutaciones en el gen *C9ORF72* puede ser clave en este tema, debido a que es la primera vez que se describe un vínculo genético entre ELA y DFT.

En la actualidad, se han identificado varios genes cuya alteración podría estar relacionada con posibles causas de la ELA y que se han relacionado con proteínas

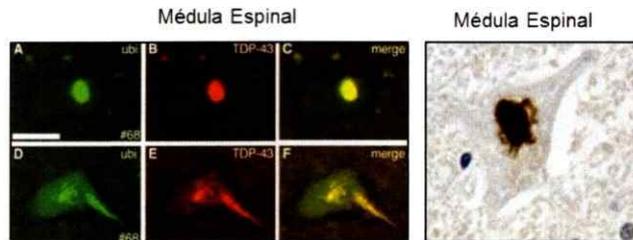
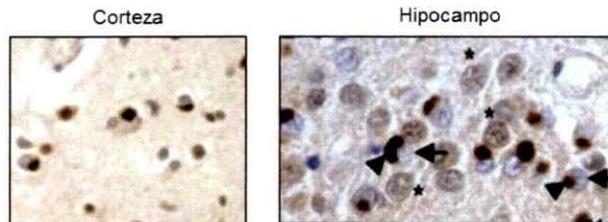
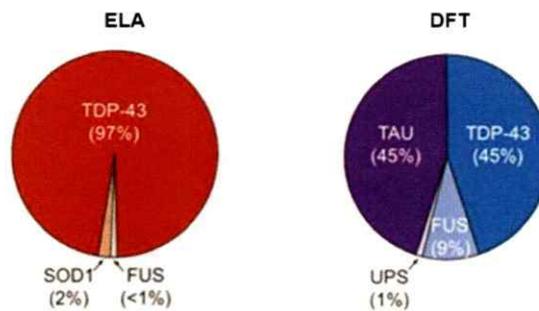
desreguladas en el contexto patológico a nivel celular (Tabla 1). A pesar de que hasta la fecha falta mucha información acerca de los mecanismos involucrados directamente en la etiología de la enfermedad, ha habido avances importantes. El desarrollo de distintos modelos experimentales como la generación y manipulación de animales transgénicos para algunos de estos genes relevantes en la enfermedad, y recientemente la utilización de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs, sigla en inglés) derivadas de pacientes han sido clave en este proceso (Chen et al., 2014; Kiskinis et al., 2014; Qu et al., 2014).

## **2.2. TDP-43 en ELA**

TDP-43 fue identificada en el año 2006 como la principal constituyente de las inclusiones proteicas en la mayoría de las formas de ELA y demencia lobar frontotemporal con inclusiones ubiquitinadas (ahora conocidas como DLFT-TDP) (Neumann et al., 2006) (Figura 1A). Desde entonces, otros grupos han confirmado este hallazgo (Arai et al., 2006) y han mostrado que mutaciones genéticas heredadas dentro del gen que codifica para esta proteína están relacionadas con los fenotipos de ELA y DFT (Neumann, 2009). Por otro lado, se ha encontrado a TDP-43 en condiciones patológicas también formando parte de inclusiones proteicas en casos esporádicos y familiares con mutaciones en otros genes. De esto último puede ejemplificarse con pacientes de ELA y DFT que poseen mutaciones en el gen *C9ORF72*, debido a que la totalidad de estos casos presenta inclusiones de TDP-43 (Boeve y Graff-Radford, 2012; Dejesus-hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011).

**Tabla 1. Genes asociados a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).** Se muestran algunos genes y proteínas que se han encontrado en un contexto anormal o desregulado en la condición de patología. En el caso de los tipos de ELA familiar se han detectado mutaciones puntuales y en los tipos esporádicos anomalías en las conformaciones de la proteína, su función y su localización. Información obtenida de la base de datos *ALS Online Genetics*.

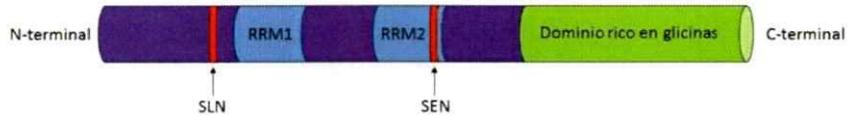
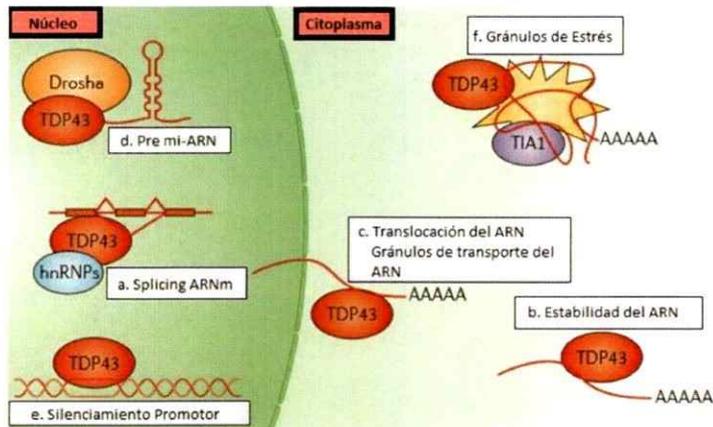
Gen	Nombre	Causante	Categoría	Tipo de ELA	Referencia
<i>SOD1</i>	Cu/Zn superoxide dismutase 1	ALS 1	Estrés Oxidativo	Familiar y Esporádico	Hu et al., 2012; Rosen et al., 1993; Sato et al., 2004
<i>ALS2</i>	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) homolog (human). Alsln	ALS 2	Regeneración, tropismo y muerte motoneuronal	Familiar	Hadano et al., 2001; Hentati et al., 1994; Kress et al., 2005
<i>SETX</i>	Senataxin	ALS 4	Procesamiento de DNA/RNA alterado	Familiar y Esporádico	Hirano et al., 2011; Zhao et al., 2009
<i>SPAST</i>	Hereditary spastic paraparesis	ALS 5	Defectos en neurofilamentos y microtúbulos	Esporádico	McDermott et al., 2003; Meyer et al., 2005
<i>FUS</i>	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	ALS 6	Muerte celular	Familiar	Belzil et al., 2011; Kwiatkowski et al., 2009; Nagayama et al., 2012; Yan et al., 2010
<i>VAPB</i>	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B	ALS 8	Transporte axonal y tráfico vesicular alterado	Familiar	Chen et al., 2010; Nishimura et al., 2004
<i>ANG</i>	Angiogenin	ALS 9	Procesamiento de DNA/RNA alterado	Familiar y Esporádico	Greenway et al., 2004; Padhi et al., 2012
<i>TARDBP(TDP43)</i>	TAR DNA binding protein	ALS 10	Procesamiento de DNA/RNA alterado	Familiar y Esporádico	Dickson et al., 2008; Neumann et al., 2006; Rutherford et al., 2008
<i>OPTN</i>	Optineurin	ALS 12	Muerte celular	Familiar y Esporádico	Belzil et al., 2010; Maruyama et al., 2010; Van Blitterswijk et al., 2012
<i>C9ORF72</i>	chromosome 9 open reading frame 72	ALS-FTD 2	Función no conocida	Familiar y Esporádico	Dejesus-herandez et al., 2011; Gijssels et al., 2010; Renton et al., 2011

**A****Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)****Demencia Frontotemporal (DFT)****B**

**Figura 1. Inclusiones ubiquitinadas y positivas para TDP-43 en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y demencia frontotemporal (DFT).** (A) Cortes histológicos de tejido *post mortem* de pacientes con ELA y DFT. Las imágenes que muestran las tinciones de casos de ELA, muestran inclusiones ubiquitinadas de TDP-43 presentes en motoneuronas de la médula espinal. Por otro lado, de los cortes de los pacientes con DLFT-U (un tipo de DFT) se detectan inclusiones TDP-43 positivas en neuronas de la corteza frontal e hipocampo. Fotos modificadas de Neumann et al., 2006 *Science*. (B) Gráficos de torta que muestran la estadística de los casos totales de ELA y DFT en cuanto a la naturaleza de las inclusiones en tejido *post mortem*. Las especies positivas para TDP-43 están presentes en el 97% de los casos de ELA y en un 45% de los casos de DFT. Modificado de Ling et al., 2013 *Neuron*.

Se ha documentado que el 97% de los casos de ELA y el 45% de los casos de DFT presentan inclusiones positivas para TDP-43 (Ling et al., 2013) (Figura 1B). Por lo tanto, TDP-43 adquiere una gran relevancia en cuanto a su rol en el desarrollo de fenotipos patológicos de ELA y DFT, lo cual está evidenciado por los más de 600 estudios publicados sobre el tema.

Consistente con su función como una proteína de unión al ARN, TDP-43 se asocia con miembros de la familia de las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP, sigla en inglés), que son proteínas conocidas por formar complejos que regulan el procesamiento de los ARN mensajeros (Buratti et al., 2005; Freibaum et al., 2010). Las interacciones de TDP-43 con esta familia de ribonucleoproteínas dependen de su dominio rico en glicinas ubicado en su extremo C-terminal (Figura 2A). Por otro lado, la localización de TDP-43 en gránulos de ARN dentro de axones y dendritas también sugiere que está involucrada en el tráfico del ARN (Elvira et al., 2006) (Figura 2B). Además, diversos estresores celulares provocan la redistribución de TDP-43 desde el núcleo al citoplasma residiendo dentro de gránulos de estrés, lo cual hace presumir un rol en el tráfico y estabilización del ARN (Dewey et al., 2011; Elvira et al., 2006) (Figura 2B). Por otro lado, TDP-43 regularía la biogénesis de los micro-ARN, ya que se le ha encontrado localizada en las fibras de pericromatina que corresponde al lugar donde ocurre este proceso, y además se ha documentado su unión al complejo Drosha que es el encargado del procesamiento primario de estas moléculas (Figura 2B) (Buratti et al., 2010; Casafont et al., 2009; Fukuda et al., 2007). TDP-43 también interactúa con ADN de hebra simple, proceso que promueve la inhibición de la transcripción a través de

**A****B**

**Figura 2. Estructura y funciones de TDP-43 en condiciones fisiológicas. (A)** TDP-43 contiene dos motivos de reconocimiento de ARN: RRM1 Y RRM2 (RRM del inglés RNA-recognition motif), una señal de localización nuclear bipartita (SLN) y una señal de exportación nuclear (SEN). Además en el extremo C-terminal existe un dominio rico en glicinas que son claves para la interacción con los miembros de la familia ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas. **(B)** TDP-43 exhibe funciones biológicas relacionadas mayormente con vías de regulación del ARN. Forma complejos con las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) y de esta forma regulan el procesamiento de las especies de pre-ARNm. TDP-43 también se une a secuencias de ARNm, particularmente de la región no traducida 3' (3' UTR, sigla en inglés), y afecta la estabilidad y rotación del ARNm. También tiene un rol crucial en el tráfico de los ARNm, transloca rápidamente entre núcleo y citoplasma y se localiza dentro de gránulos de ARN dendríticos. TDP-43 es además un componente del complejo Drosha, el cual tiene función directa en el procesamiento primario de los micro-ARN. TDP-43 actúa también como un represor transcripcional a través de la unión a las secuencias promotoras de hebra simple. Finalmente se le ha observado formando parte de gránulos de estrés, los cuales secuestran y protegen al ARNm bajo condiciones de estrés celular. Modificado de Lee et al., 2011 *Nature Reviews*.

mecanismos desconocidos (Figura 2B) (Abhyankar et al., 2007; Kuo et al., 2009). Finalmente, TDP-43 es conocida por interactuar con la proteína de unión a ARN FUS (del inglés, *Fused in Sarcoma*), que también ha sido implicada en enfermedades neuromotoras y DFT (Ling et al., 2013; Ling et al., 2010).

La oleada inicial de los estudios de TDP-43 en ELA y DFT que describe la patología y anormalidad de esta proteína fueron realizados en tejido humano (Figura 1A) (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). En una rápida sucesión, esta proteinopatía también fue documentada en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y trastornos caracterizados por cuerpos de Lewy con inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína (Nakashima-Yasuda et al., 2007; Uryu et al., 2008). El grado de la patología en estas otras enfermedades está limitado en términos de la cantidad y distribución de TDP-43 en comparación con los casos de ELA primarios y DFT.

En condiciones patológicas TDP-43 presenta características anómalas como localización en el citoplasma, pérdida de su localización nuclear, modificaciones post-traduccionales como hiperfosforilación y ubiquitinación, y la generación de un fragmento proteico proveniente del extremo C-terminal de la proteína (Neumann et al., 2006). Estas alteraciones han sido asociadas a la agregación, a la formación de gránulos citoplasmáticos e intranucleares y también a una condición tóxica que induciría muerte celular (Barmada et al., 2010). La interpretación de estos hallazgos ha sido muy cuidadosa porque no se sabe a ciencia cierta cuáles de estas observaciones están causalmente ligadas a la neurodegeneración y cuáles son secundarias para la patología de la enfermedad, o si son epifenómenos. A pesar del

progreso de la investigación acerca de las proteinopatías de TDP-43, la principal pregunta a dilucidar es si la disfunción de esta proteína está incidiendo en la neurodegeneración a través de la ganancia de una función tóxica, por la pérdida de la función normal, o por el efecto pleiotrópico de ambas condiciones.

En los últimos años han surgido una cantidad considerable de trabajos que involucran la pérdida de las funciones normales de TDP-43 con la neurodegeneración. Esta proteína cumple distintas funciones dentro de la célula, lo cual podría repercutir en la fisiología neuronal frente a un escenario que involucre una carencia de la función o una condición aberrante de TDP-43. Dentro de su papel como regulador del procesamiento del ARN, se ha destacado la acción de esta proteína sobre blancos relacionados con la actividad sináptica (Polymenidou et al., 2011). También, la participación de TDP-43 en el control de biosíntesis de los micro-ARN ha adquirido gran atención dentro de los estudios actuales, ya que se ha documentado la relevancia de la regulación génica post-transcripcional dependiente de estos micro-ARN en el desarrollo y correcto funcionamiento de las neuronas, y además se ha descrito que la alteración de la función de los micro-ARN contribuye a la susceptibilidad a desarrollar enfermedades neurodegenerativas (Eacker et al., 2009).

Recientemente se describió que en una subpoblación de pacientes con ELA esporádico se activa la expresión de genes de un tipo de retrovirus humano endógeno llamado HERV-K, y este fenómeno no ocurre en individuos sanos (Li et al., 2015). Se demostró que la expresión de estos genes virales induce una retracción de neuritas en neuronas humanas y neurodegeneración en la corteza motora y médula

espinal en animales transgénicos. Interesantemente, también se describe que la expresión de los genes de este virus HERV-K está regulada por TDP-43 (Li et al., 2015). Esto podría ser un ejemplo de cómo una ganancia de función anómala de TDP-43 podría estar contribuyendo en la neurodegeneración.

Dada la importancia que representa la proteinopatía de TDP-43 en el contexto de ELA, y también de DFT, es que se han generado diversos modelos murinos transgénicos que sobre-expresan formas mutantes y *wild-type* de la proteína. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible establecer un modelo murino que, al menos en el contexto de ELA, recapitule todos los síntomas. Varios de estos modelos muestran algunos signos relacionados como temblores y caída de extremidades posteriores, además de la muerte temprana (Tablas 2 y 3). No obstante, prácticamente, ninguno de estos animales transgénicos ha evidenciado parálisis completa (Tablas 2 y 3), lo que contrasta con los modelos murinos que expresan la SOD1 mutante (Kong y Xu, 1998). Por otro lado, se han realizado estudios en iPSCs con el gen de TDP-43 mutado y se han logrado reproducir varios aspectos clave del contexto de la proteinopatía, como la formación de agregados proteicos y una reducción en la sobrevivencia celular (Bilican et al., 2012).

Tabla 2. Modelos de ganancia de función de TDP-43. Resumen de modelos murinos que sobreexpresan TDP-43 (mutante o WT) registrados hasta la fecha.

Animal	Transgén	Promotor	Fenotipo	Histopatología	Referencia
Ratón	flag-TDP-43A315T humano	prion murino (PrPm)	Entre los 8 y 3 meses se observa peso y apariencia normales. A los 4,5 meses se registra pérdida de peso, desplazamiento anormal.	Presencia de inclusiones ubiquitinadas TDP43 negativas en la capa V de la corteza cerebral y asta ventral de médula espinal, pérdida de localización nuclear de TDP43	Wegorzewska et al., 2009
Ratón	TDP-43WT humano	prion murino (PrPm)	10 fundadores muertos entre los 12 y 55 días de vida. En la línea 21 no se observó ningún fenotipo motor hasta los 11 meses	TDP43 nuclear difuso en neuronas y glías. Algunas neuronas del asta ventral de la médula y tronco cerebral con ubiquitina citoplasmática difusa	Stallings et al., 2010
Ratón	TDP-43A315T humano	prion murino (PrPm)	5 fundadores muertos entre 14 y 73 días, otros pueden reproducirse pero mueran entre 62-75 días o no tienen fenotipo. En la línea 23 se observa un declive en la fuerza de agarre y en la longitud del peso	TDP43 nuclear difuso en neuronas y glías. Colocalización de ubiquitina purificada e inclusiones de TDP43 fosforiladas en citoplasma y núcleo de neuronas del asta ventral y tronco encefálico	Stallings et al., 2010
Ratón	TDP-43WT humano	prion murino (PrPm)	Los hemicópticos son similares a los no transgénicos (WT). Dentro de los homocigotos a la edad de 14 días pesan menos los WT, a los 21 se observa caída de extremidades posteriores y temblores, y tienen una sobrevivencia entre 1 y 2 meses	Tinción difusa nuclear y citoplasmática de TDP43 en algunas neuronas. Tinción incrementada de ubiquitina en núcleo y citoplasma. 15% de molonuronas de la médula con inclusiones nucleares de TDP fosforiladas (en citoplasma raramente detectados)	Xu et al., 2010
Ratón	TDP-43M337V humano	prion murino (PrPm)	Los hemicópticos son similares a los WT hasta el año de vida. Los homocigotos a los 21 días muestran caída de extremidades posteriores, temblores corporales y desplazamiento anormal	Tinción difusa nuclear y citoplasmática de TDP43 en algunas neuronas. Tinción incrementada de ubiquitina en núcleo y citoplasma. Muchas motoneuronas de la médula con inclusiones nucleares de TDP fosforiladas (en citoplasma raramente detectados)	Xu et al., 2011
Ratón	TDP-43WT humano	Thy1.2 murino	Los hemicópticos muestran caída de extremidades posteriores a los 14 meses de vida y a los 15 empeoramiento de desempeño en rotarod. Los hemicópticos a los 2 meses muestran caída anormal de extremidades posteriores y a los 4 meses baja en el desempeño motor en rotarod	Agregados ubiquitinados intranucleares y citoplasmáticos en neuronas de la capa V cortical y médula espinal. Tinción nuclear difusa de TDP43 en neuronas. Las inclusiones intranucleares ubiquitinadas son positivas para TDP43 y TDP43 fosforilado. Algunas inclusiones citoplasmáticas son positivas para TDP43 fosforilado	Wils et al., 2010
Ratón	TDP-43WT humano	Thy1.2 murino	Los machos a la edad de 14 a 18 días evidencian caída de extremidades, temblores, anomalías en el desplazamiento; y a las 4 semanas sufren una caída del 20% del peso comparados con los controles WT. Las hembras hasta los 3 meses tienen apariencia completamente normal y después de los 3 meses se observan temblores finos	Se observa en los machos tinción nuclear de TDP43 difusa. Inclusiones intranucleares de TDP43 humano colocan con FUS/TLS y SC35. Tinción de ubiquitina difusa en citoplasma	Shan et al., 2010
Ratón	TDP-43WT murino	Ca2+/calmodulin-dependientkinasell (CaMKII)	Los homocigotos a los 2 meses de vida muestran un empeoramiento del desempeño en prueba de laberinto de agua y condicionamiento del miedo. A los 6 meses muestran caída anormal de extremidades posteriores y baja en desempeño de rotarod. Sobrevivencia promedio de 495 días	Acumulación de TDP43 en citoplasma y colocación con ubiquitina. Ausencia de tinción de TDP43 en 15-20% de las neuronas corticales. Tinción difusa de TDP43 en otras neuronas	Tsai et al., 2010
Ratón	TDP-43WT Tet-off humano (inducido a los 28 días)	CaMKIIa-tTA-tetOff	1-3 post-inducción se observa caída anormal de extremidades	Tinción de TDP43 mayoritariamente nuclear en neuronas corticales en un patrón en mosaico. Menos del 0,1% de las neuronas corticales tienen inclusiones de TDP43 fosforiladas que colocan con ubiquitina. En neuronas que expresan la TDP43 humana se observa un decrecimiento en la expresión de TDP43 murina	Igaz et al., 2011
Rata	TDP-43WT humano	22 kb mínimos del gen TDP43 humano proveniente de cromosoma artificial bacteriano	No se observó parálisis dentro de los 200 días de vida	Tinción difusa de TDP43 fosforilada en citoplasma y núcleo. Tinción difusa de ubiquitina	Zhou et al., 2010
Rata	TDP-43M337V Tet-off humano	CAG-tTA-tetOff	En línea 16 sin tratamiento con doxiciclina: parálisis y muerte en P20. Línea 16 inducida 4 días antes del destete; parálisis en P35. Línea 7 inducida 4 días antes del destete; debilidad en P40, parálisis y muerte en P55, fenotipo más severo en machos que en hembras	Tinción difusa de TDP43 fosforilada en citoplasma y núcleo. Inclusiones anormales en la corteza, pero no en médula espinal. Tinción difusa de ubiquitina	Zhou et al., 2010

**Tabla 3. Modelos de pérdida de función de TDP-43.** Resumen de modelos murinos con deficiencia de TDP-43 registrados hasta la fecha.

Tipo de Deficiencia	Deficiencia de TDP-43	Fenotipo	Referencia
Constitutiva	deleción exones 2 y 3	Letalidad de peri-implantación; los blastocistos de los homocigotos mostraron crecimiento defectuoso de la masa celular interna in vitro	Wu et al., 2010
Constitutiva	inserción en intrón 2 y fusión del exón 2 con el marcador b-galactosidasa/neomicina por <i>gene trapping</i>	Letalidad embrionaria entre días 3,5 y 8,5; expansión anormal de la masa celular interna en blastocistos homocigotos	Sephton et al., 2010
Constitutiva	inserción en intrón 2 y fusión del exón 2 con el marcador b-galactosidasa/neomicina por <i>gene trapping</i>	Letalidad embrionaria alrededor del día 7,5	Kraemer et al., 2010
Condicional	deleción exón 2	Fenotipo metabólico y muerte prematura en ratones adultos	Chiang et al., 2010
Condicional	deleción exones 2 y 3	Fenotipo relacionado con ELA, baja de peso, deterioro en desempeño de prueba motora (más leve que los de ganancia de función). Acumulación de proteínas ubiquitinadas en motoneuronas	Wu et al., 2012

### **2.3. Estrés de retículo endoplasmático (RE) y la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR)**

Varios son los mecanismos moleculares que han sido implicados en el daño de las motoneuronas en el contexto patológico de la ELA (Ferraiuolo et al., 2011). Uno de ellos se relaciona con la presencia de inclusiones proteicas intracelulares que se ha observado en tejido *post mortem* de pacientes (Ferraiuolo et al., 2011; Pasinelli y Brown, 2006). La acumulación anormal de agregados proteicos ha sido asociada a un mecanismo de mal plegamiento de proteínas dentro del retículo endoplasmático (RE) y a una condición llamada "estrés de RE" (Hetz et al., 2015; Hetz y Mollereau, 2014). Este tópico ha adquirido una gran relevancia en el área de estudio de la ELA, tanto para la indagación de las causas como también para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos de la enfermedad (Hetz et al., 2013; Hetz y Mollereau, 2014; Matus et al., 2013)

El retículo endoplasmático (RE) es un organelo distribuido por casi la totalidad del citoplasma de la célula eucarionte y es un elemento fundamental del sistema de endomembranas. Está formado por una serie de túbulos, sacos y vesículas conectados entre sí. En particular, el RE rugoso presenta en su superficie ribosomas que sintetizan proteínas cuyos destinos posibles son la membrana plasmática, el exterior de la célula o los lisosomas y endosomas. Por otro lado, en el lumen de este organelo, las proteínas sintetizadas son plegadas gracias a la expresión de chaperonas y foldasas, al ambiente oxidante que lo caracteriza y que facilita la formación de puentes disulfuros, y a las modificaciones post-traduccionales como las

N-glicosilaciones sobre residuos de asparragina. Estos son aspectos muy importantes para la generación de proteínas funcionales que translocan desde el RE hasta su sitio final correspondiente (Gorlach et al., 2006).

Sin embargo, distintas condiciones que perturban la función del RE, pueden traer como consecuencia un incremento desregulado de la síntesis de proteínas o la generación de proteínas mal plegadas en su interior, generando la condición celular de "estrés de RE" (Ron y Walter, 2007). Las condiciones que pueden desencadenar el estrés de RE pueden ser, por ejemplo, alteraciones en la homeostasis del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), estrés oxidativo y alteraciones en el balance redox en el lumen (Ron y Walter, 2007; Woehlbier y Hetz, 2011). Frente a esto, en organismos eucariontes multicelulares, se activa la respuesta adaptativa llamada "respuesta de proteínas mal plegadas" (UPR, del inglés *Unfolded Protein Response*), que constituye una cascada de señales integradas que apunta a la recuperación de la homeostasis celular, aumentando la capacidad de producir proteínas correctamente plegadas para disminuir la acumulación y la carga de proteínas mal plegadas y disfuncionales dentro del RE (Cao y Kaufman, 2012).

La UPR, en primera instancia, incrementa la capacidad del RE de plegar proteínas a través de una regulación positiva en la expresión de varias chaperonas reticulares como BiP, Grp94, calreticulina, calnexina y proteínas disulfuro-isomerasas (PDIs). También la activación de la UPR regula la expresión de genes involucrados en el control de calidad de las proteínas que transitan por la vía secretoria, la degradación proteica por autofagia (Ogata et al., 2006) y por ERAD (del inglés *ER-associated degradation*) que involucra la participación del proteosoma cuyo proceso

de degradación se encuentra dentro de lo que se denomina UPS (del inglés *Ubiquitin-Proteasome System*) (Vembar y Brodsky, 2008).

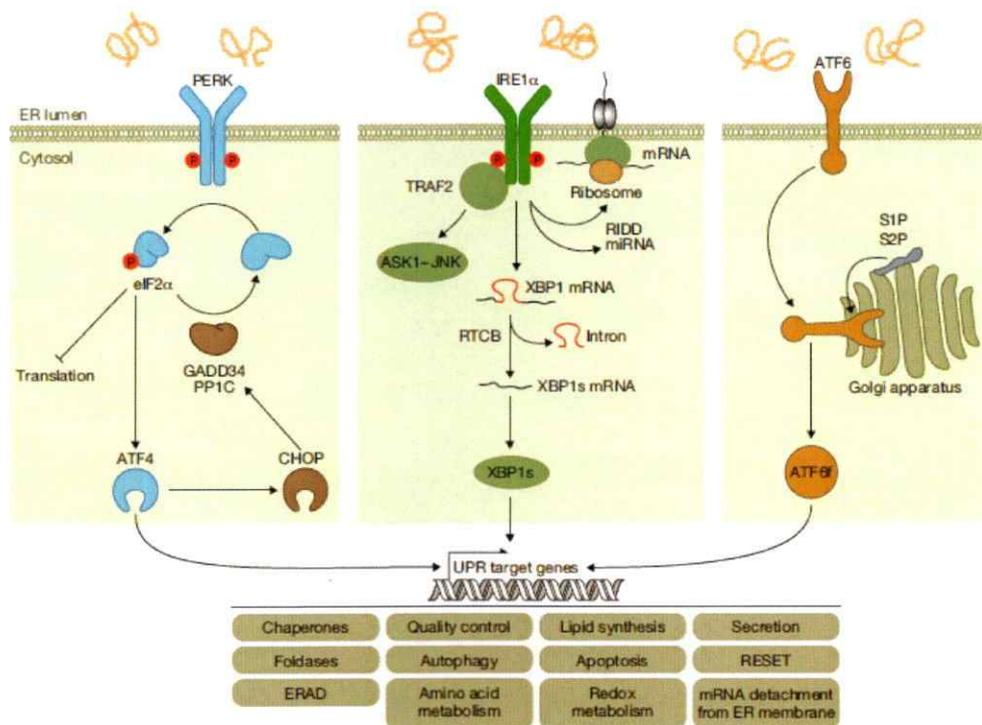
Existen proteínas transmembranas del RE que actúan como sensores de estrés y activan la UPR, y son conocidas como IRE1 (del inglés *inositol requiring kinase*) destacándose la isoforma IRE1 $\alpha$  por su ubicuidad, PERK (del inglés *PKR-like ER kinase*) y ATF6 (del inglés *activating transcription factor 6*) (Fig. 3) (Ron y Walter, 2007). Estos sensores transducen la información acerca del estado de plegamiento de proteínas del lumen del RE hacia el núcleo y el citosol controlando la expresión de algunos factores de transcripción específicos y otros efectos rápidos en la síntesis de proteínas (Hetz, 2012).

IRE1 $\alpha$  es una Serina/Treonina quinasa y una endorribonucleasa que procesa el ARNm que codifica para el factor de transcripción XBP-1 (del inglés *X Box Binding Protein-1*). Este evento regulatorio conlleva a la traducción de una proteína más estable llamada XBP-1s (Calfon et al., 2002; K. Lee et al., 2002), la cual transloca al núcleo y controla la expresión de un conjunto de genes relacionados con la UPR. Los blancos de XBP-1s participan en el control de calidad de proteínas, en el plegamiento de proteínas, participan en el sistema ERAD y en la biogénesis del RE y el aparato de Golgi (Acosta-Alvear et al., 2007; Lee et al., 2003). IRE1 $\alpha$  tiene otras funciones en la señalización celular, como la activación de vías de alarma mediada por las vías de ASK1 (del inglés *Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*) y de JNK (del inglés *c-Jun-N terminal Kinase*) (Kim et al., 2009; Urano et al., 2000). IRE1 $\alpha$  también participa en la modulación de los niveles de autofagia, una vía clásicamente ligada a adaptación y supervivencia celular en un contexto de carencia nutritiva. En células que experimentan

estrés de RE, la autofagia podría operar como un mecanismo para eliminar proteínas anormalmente agregadas y organelos dañados (Levine y Kroemer, 2008).

La activación de la quinasa PERK conlleva a la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 $\alpha$  (del inglés, *eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$* ), inhibiendo la traducción de proteínas en el RE (Blais et al., 2006). Este proceso de fosforilación aumenta la traducción específica del ARNm que codifica para ATF4 (del inglés *activating transcription factor-4*), un factor de transcripción que promueve la expresión de un conjunto de genes relacionados con la UPR que funcionan en procesos de homeostasis de procesos redox, metabolismo de aminoácidos, apoptosis y autofagia (Ameri y Harris, 2008; Kouroku et al., 2006; Rouschop et al., 2010) (Figura 3). Finalmente, la activación de ATF6 lleva a su translocación desde la membrana del RE hasta el aparato de Golgi, donde es procesada proteolíticamente, liberando su dominio citosólico que funciona como un factor de transcripción que transloca al núcleo y regula positivamente genes de chaperonas reticulares, ERAD y aumenta el ARNm codificante para XBP-1 (Chen et al., 2002; Haze et al., 1999).

El estrés de RE prolongado puede llevar a la apoptosis, proceso en el cual se han identificado diferentes reguladores como los miembros de la familia de proteínas BCL-2 como PUMA y BimL (Heath-Engel et al., 2008; Tabas y Ron, 2011). La activación de ASK1 y JNK también regula la apoptosis bajo condiciones de estrés de RE (Kim et al., 2009; Urano et al., 2000); y la señalización sostenida de PERK ha sido propuesto como un efector pro-apoptótico (Lin et al., 2009).



**Figura 3. La Respuesta de Proteínas mal plegadas (UPR).** La UPR es gatillada frente a una condición de estrés generada por la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo endoplasmático (RE). Los sensores de estrés (PERK, IRE1 $\alpha$ , ATF6) son proteínas transmembrana que activan cascadas de transducción de señales que llevan a un incremento de la capacidad de plegamiento proteico por parte del RE. Estos eventos permitirán el restablecimiento de la homeostasis celular. Sin embargo, los factores de transcripción que actúan en la UPR también pueden determinar el destino de la célula en términos de la regulación de genes relacionados con la apoptosis, cuando el sistema se ve afectado por condiciones de estrés crónico. Modificado de Hetz et al., 2015 *Nature Cell Biology*.

#### **2.4. Antecedentes que relacionan la UPR y la ELA**

Algunos trabajos que analizan muestras de pacientes con ELA evidencian que esta enfermedad neurodegenerativa presenta una condición de estrés de RE en los tejidos afectados (Ilieva et al., 2007). Además, a través de la evaluación bioquímica de extractos de médula espinal de pacientes se ha podido documentar la activación de la UPR y una regulación positiva de los genes blanco de esta respuesta en este tejido mencionado (Hetz et al., 2009).

La relación de ELA con la activación de la UPR está bien caracterizada en modelos murinos transgénicos para la forma mutada de la proteína SOD1 (Atkin et al., 2006; Hetz et al., 2009). Diversos reportes han demostrado que las mutaciones en SOD1 causan su retención y acumulación en el RE, condición que favorece su mal plegamiento al interior de este compartimiento (Kikuchi et al., 2006; Tobisawa et al., 2003; Wate et al., 2005). Se ha descrito también que en las motoneuronas presentes en la médula espinal de ratones transgénicos para SOD1 mutante, las mitocondrias tienen una capacidad de captación de calcio reducida (Damiano et al., 2006). Una disfunción en el almacenamiento mitocondrial del calcio puede causar una perturbación en su recarga del RE, provocando a su vez una disminución del calcio en el lumen del RE y una acumulación de proteínas mal plegadas en este compartimiento (Grosskreutz et al., 2010). Además, un dato muy relevante es que se ha demostrado que la presencia de SOD1 mutante genera una disfunción en la maquinaria de ERAD al interactuar con un componente de ella, lo cual provoca la condición de estrés de RE (Nishitoh et al., 2008).

Por otro lado, el estrés de RE estaría jugando un papel crucial en los mecanismos que llevan al estado de vulnerabilidad de un grupo de motoneuronas, aspecto que sería clave en el desarrollo de la disfunción motora y la parálisis en ELA. Un estudio realizado en modelos transgénicos de SOD1 mutante describió que existe un subtipo de motoneuronas vulnerables selectivamente en el contexto de la enfermedad y que este grupo de células manifiesta la activación de genes de UPR en etapas presintomáticas tempranas del ratón, y es más propenso a condiciones de estrés de RE desde el nacimiento (Saxena et al., 2009). La relación del contexto de SOD1 mutante y la UPR se ha corroborado en estudios con iPSCs desde células provenientes de pacientes con la mutación en este gen (Kiskinis et al., 2014; Naujock et al., 2016).

Recientemente, se publicó un modelo murino de tipo *knock-in* con una mutación en el gen de VAPB (*vesicle-associated membrane protein-associated protein B*), el cual ha sido asociado a formas raras de ELA familiar. En este modelo se pudo observar nuevamente activaciones de respuesta celular frente a una condición de estrés de RE y de autofagia en etapas previas al inicio de los síntomas y a los defectos en conducta del animal (Larroquette et al., 2015). VAPB es una proteína integral del RE y ha sido implicada en distintos procesos celulares como tráfico vesicular (Gkogkas et al., 2008), homeostasis de  $Ca^{+2}$  (De vos et al., 2012; Mórotz et al., 2012), transporte de RE a Golgi (Amarillo et al., 2005; Souissan et al., 1999), liberación de neurotransmisores (Skehel et al., 1995), establecimiento de unión neuromuscular (Pennetta et al., 2002), e interesantemente en estrés de RE y UPR (Gkogkas et al., 2008; Kanekura et al., 2006).

En el contexto patológico de ELA asociado a la proteína FUS también ha sido documentada una condición de estrés de RE, donde se ha descrito la inducción de marcadores de UPR en muestras de médula espinal lumbar de pacientes con mutaciones en FUS, y también en células NSC34 (línea de motoneuronas) que sobreexpresan FUS mutante (Farg et al., 2012). FUS es una proteína que presenta características muy similares a TDP-43, ya que ambas proteínas cumplen una función relacionada con la regulación a nivel transcripcional y ambas se han encontrado formando inclusiones citoplasmáticas en distintas muestras de pacientes ELA familiar y esporádico (Kwiatkowski et al., 2009; Neumann et al., 2006; Sproviero et al., 2012) (Tabla 1).

Por otro lado, dos estudios actuales a partir de iPSCs derivadas de pacientes con las repeticiones de hexanucleótidos en el gen de *C9ORF72* han relacionado la condición patológica con disfunciones en la homeostasis de  $Ca^{+2}$ , incremento en la apoptosis, formación de gránulos de estrés, defectos en el crecimiento de neuritas, inhibición de la actividad proteosomal, generación de especies proteicas de alto peso molecular y estrés de RE (Dafinca et al., 2016; Zhang et al., 2014).

La importancia del impacto funcional de la UPR en el contexto patológico de la ELA ha quedado evidenciada en distintos estudios *in vivo*, donde esta respuesta celular ha sido manipulada. Se han realizado intervenciones farmacológicas que han modulado las vías de señalización que participan en la UPR. Por ejemplo, se documentó que la administración de los inhibidores de las fosfatasa de eIF2 $\alpha$  "Salubrinal", "Guanabenz" y "Sephin-1" generaron efectos beneficiosos en la patología del modelo murino transgénico para SOD1 mutante (Das et al., 2015; Jiang

et al., 2014; Saxena et al., 2009). Los tratamientos con el compuesto Salubrinal atenuaron la denervación periférica y retrasaron la progresión de la enfermedad en el modelo murino (Saxena et al., 2009). El compuesto Guanabenz indujo una extensión de la supervivencia y un retraso en el inicio de los síntomas del ratón transgénico (Jiang et al., 2014). La administración de Sephin-1 previno defectos motores, morfológicos y moleculares, además de la atenuación de la expresión del gen apoptótico CHOP (Das et al., 2015).

También se han llevado a cabo intervenciones genéticas para modular distintos factores que tienen un rol en las vías de señalización de la UPR. Se han documentado deleciones de ciertos factores de transcripción como XBP1 (Hetz et al., 2009) y ATF4 (Matus et al., 2013) en un modelo murino que expresa SOD1 mutante en el sistema nervioso. Estas manipulaciones genéticas se generaron desde el nacimiento en los ratones (Hetz et al., 2009; Matus et al., 2013). A pesar de que en ambos trabajos se esperaba un aumento en la patogenicidad debido a la presencia de SOD1 mutante, la carencia de estos factores generó un retraso en el inicio de la enfermedad del animal y una prolongación en la supervivencia (Hetz et al., 2009; Matus et al., 2013). En el caso de la deleción del factor XBP1, se demostró que la modulación de la UPR en esa vía promovía la activación de la macroautofagia, y de esta forma los agregados de SOD1 mutante eran degradados (Hetz et al., 2009). El fenotipo asociado a la deleción de ATF4, por tanto, se relacionó con la disminución de la expresión de genes apoptóticos como CHOP y Bim (Matus et al., 2013). Sin embargo, la deficiencia de ATF4 intensificó la agregación de SOD1 mutante en

tiempos tardíos de la enfermedad del modelo, lo cual se atribuyó a alteraciones en el estado redox de la célula (Matus et al., 2013).

## 2.5. TDP-43 y el estrés de RE

Hasta la fecha se han publicado muy pocos estudios que relacionen directamente condiciones de estrés de RE con la patogénesis neurológica ligada a TDP-43, por lo que es un campo muy abierto a ser explorado. Si bien se ha documentado la presencia de inclusiones positivas para TDP-43 en tejido *post-mortem* de pacientes con ELA está en controversia si la formación de agregados o inclusiones es realmente la causal de la neurodegeneración. Se ha planteado que la degeneración podría ser gatillada como una consecuencia de un defecto sistémico de otra fuente como la alteración de la función de TDP-43 como regulador, determinada por una ganancia o pérdida de función, o quizás estaría influyendo un efecto pleiotrópico más complejo (Lee et al., 2012).

De lo presente en la literatura, se puede mencionar un estudio que muestra que la sobre-expresión leve de TDP-43 en células NSC34, HeLa y MEF genera un aumento en la expresión de CHOP (Suzuki y Matsuoka, 2012). CHOP es un blanco proapoptótico de la UPR (Puthalakath et al., 2007) y es regulado principalmente por la vía PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 (Marciniak et al., 2004), sin embargo, en este trabajo no se observan marcadores de esta vía. Por lo tanto, los autores sugieren que TDP-43 aumenta la expresión de CHOP producto de un incremento de sus niveles de ARNm y la atenuación de la degradación de la proteína, y postulan que este proceso podría ser independiente de las vías relacionadas con la UPR.

Por otro lado, otro trabajo del año 2012 publicó un estudio *in vivo* que relaciona la proteinopatía de TDP-43 con la UPR (Tong et al., 2012). En este estudio se utilizó un modelo de rata que sobre-expresa la TDP-43 humana con la mutación M337V de forma inducible sólo en neuronas del encéfalo y no en glías (Zhou et al., 2010). En cuanto a la histopatología se observaron inclusiones ubiquitinadas, pero no positivas para TDP-43 en neuronas de la corteza frontal e hipocampo. Además, se observó un decrecimiento progresivo de la señal de XBP-1s y XBP-1t en hipocampo y corteza mediante inmunofluorescencia en cortes de cerebro de ratas de distintas edades (50, 55 y 60 días); y se demostró que la disminución en la expresión de estas proteínas se correlaciona con el inicio de la sobreexpresión de la TDP-43 humana mutante. Por lo tanto, en este trabajo se postuló que la sobreexpresión de TDP-43 en las ratas induce una depleción de XBP-1 y por lo tanto la inactivación de la UPR. Un hallazgo muy interesante de este trabajo es que se detectó que la integridad del RE como el del aparato de Golgi estaba afectada, lo cual es un factor crucial a considerar en una eventual respuesta a una condición de estrés de RE y las respuestas que se generan desde ese organelo (Tong et al., 2012). En contraste, otro reporte muestra que la sobreexpresión de TDP-43 con la mutación A315T y también Q331K en una línea celular neuronal induce la translocación de ATF6 al aparato de Golgi y la translocación de CHOP y XBP1 al núcleo. Los autores asocian estos resultados a una posible inducción de estrés de RE por parte de la TDP-43 mutada y una posible activación de la UPR (Walker et al., 2013).

Se ha sugerido que la chaperona reticular PDI podría interactuar físicamente con TDP-43 en el contexto de la ELA (Honjo et al., 2011; Walker et al., 2013), lo que

también ha sido documentado para inclusiones de FUS en tejido *post-mortem* de casos familiares y esporádicos (Farg et al., 2012). Además, se ha identificado a TDP-43 junto a ERp57 (PDIA2), otro miembro de las disulfuro-isomerasas, como biomarcadores de la progresión de la ELA desde muestras de células mononucleares de sangre periférica provenientes de pacientes (Nardo et al., 2011).

La UPR ha resultado ser una vía de señalización clave no sólo en ELA, si no que en distintos contextos neurodegenerativos asociados a proteinopatías (Hetz y Mollereau, 2014). Es por esto que en esta tesis se investigará el rol de esta respuesta celular en el contexto de la proteinopatía de TDP-43 dado que en él, hasta la fecha, no se ha descrito de forma clara un mecanismo que muestre lo que está ocurriendo con la UPR. Se utilizarán modelos de estudio *in vivo* e *in vitro* que expresan la forma humana de TDP-43 con la mutación A315T, la cual ha sido asociada a ELA. Debido a que el estudio de anomalías asociadas a TDP-43 tiene una gran importancia para el campo de la ELA, y también de la DFT, lo que se explorará en este trabajo constituye un interesante tópico a ser explorado.

### 3. HIPÓTESIS

La expresión de la proteína TDP-43 con la mutación A315T induce la activación de la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) en modelos experimentales de ELA *in vivo* e *in vitro*.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la expresión de TDP-43 mutante induce una condición de estrés de RE de activación de la UPR en los modelos de estudio.

##### 4.1. Objetivos Específicos

- 1) Caracterizar la progresión de la enfermedad del modelo murino transgénico de ELA/DFT que sobre-expresa TDP-43 mutante (TDP-43<sup>A315T</sup>) en el SNC.
- 2) Analizar la presencia de agregados o formas modificadas de TDP-43 en tejido nervioso de los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> a través de técnicas bioquímicas e histológicas.
- 3) Evaluar los niveles de marcadores de estrés de RE y UPR en los extractos de tejido nervioso de los animales TDP-43<sup>A315T</sup> en condiciones basales.
- 4) Evaluar los niveles de marcadores de estrés de RE y UPR en los extractos de tejido nervioso de los animales TDP-43<sup>A315T</sup> en condiciones de inducción farmacológica de estrés de RE.
- 5) Analizar la activación de la UPR en un modelo *in vitro* inducible que expresa la forma humana de TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> en condiciones de estrés de RE.

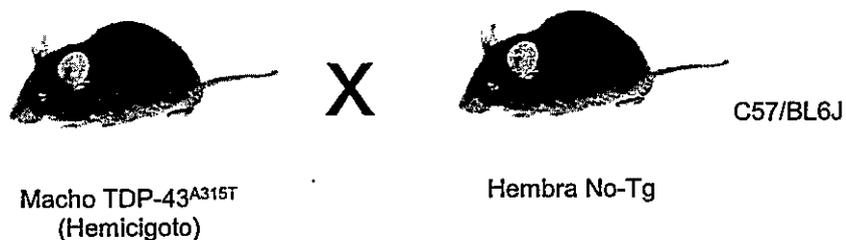
## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Mantención de colonias de ratones TDP-43<sup>A315T</sup> y genotipificación

El modelo utilizado corresponde a ratones transgénicos que sobreexpresan la forma humana mutante de TDP-43, con una sustitución aminoacídica (A315T) que se asocia a ELA (Wegorzewska et al., 2009) (Tabla 2). Este transgén está compuesto por un ADN complementario (ADNc) que codifica para esta proteína y también por una secuencia *flag* en el extremo N-terminal. La expresión está dirigida al SNC mediante el uso de un promotor y regiones potenciadoras de la proteína prion de ratón (PrP o Prnp). Los ratones fueron publicados originalmente en un fondo genético (o *background*) mixto C57BL/6;CBA (Wegorzewska et al., 2009), sin embargo la colonia que se manejó en este trabajo presentó un *background* C57BL/6 puro. Éstos se obtuvieron desde el Laboratorio de Jackson en EEUU y están disponibles en la actualidad (asignados bajo el código No. 010700, [www.jax.org](http://www.jax.org)).

Se ha descrito que los ratones hemicígoticos para este transgén son viables y fértiles, y desarrollan una enfermedad neurodegenerativa progresiva y fatal de carácter fulminante, cuyos síntomas remedan a la ELA y la DFT con agregados ubiquitinados. (Wegorzewska et al., 2009). El trabajo que publicó este modelo muestra una sobrevivencia promedio de  $154 \pm 19$  días para este modelo. Para la amplificación de colonias se realizaron cruces de machos transgénicos con hembras silvestres o no transgénicas para evitar problemas en el nacimiento de las crías (Fig. 4). Las crías se destetaron a la edad de 21 días y dada la agresividad del fenotipo

patológico, todos los ratones fueron monitoreados al menos 3 veces a la semana con el objetivo de evitar la pérdida de la colonia.



**Figura 4. Esquema del proceso de cruce para amplificar la colonia TDP-43<sup>A315T</sup>.** Como protocolo establecido para las colonias de modelos murinos de ELA o de enfermedades motoras, se cruza un macho transgénico (el que se enfermará) con una hembra WT para evitar problemas en el nacimiento de las crías. El fondo genético de los animales de la colonia es puro del tipo C57/BL6J.

Para la genotipificación se utilizó la técnica de PCR convencional. La detección del transgén se realizó con el uso de los partidores sentido 5' GGA TGA GCT GCG GGA GTT CT 3' y antisentido 5' TGC CCA TCA TAC CCC AAC TG 3', los cuales permiten la amplificación de un producto de 400 pb. Además se utilizaron los partidores sentido 5' CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG 3' y antisentido 5' GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT 3' para la obtención de un control interno representado por un producto de 200 pb. Para la extracción de ADN se obtuvieron muestras a partir de trozos de cola de los ratones con un largo aproximado de 5 mm y se incubaron con 600  $\mu$ L de buffer de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl y 1% SDS) y 6  $\mu$ L de proteinasa K a una concentración de 10 mg/mL por 16 h a 55°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13000 g por 5 minutos y el sobrenadante fue mezclado con 450  $\mu$ L de isopropanol al 100% para obtener un

precipitado centrifugando nuevamente con los mismos parámetros. El precipitado se lavó con etanol al 70% y finalmente fue resuspendido en buffer TE (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA). Para la reacción PCR, 1  $\mu$ L de ADN se incubó con 12,5  $\mu$ L de Go Taq Master Mix (Promega) y 1  $\mu$ M de cada partidor para un volumen final de 25  $\mu$ L. El programa de PCR utilizado contaba con 1 ciclo de denaturación por 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, y un ciclo final de elongación de 2 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron a través de electroforesis en geles de agarosa al 2% con SYBR (Invitrogen) a una concentración de 1:30000 a 100 V.

## **5.2. Monitoreo animales, pruebas motoras y conductuales**

### **5.2.1. Mediciones de peso corporal**

Las mediciones de peso corporal de todos los ratones se realizaron con el objetivo de monitorear la evolución en el fenotipo a partir de los 37 días de edad y dos veces por semana mínimo. En el caso de los ratones TDP-43<sup>A315T</sup>, la medición se hizo hasta el día de su eutanasia o muy cerca de la edad de muerte. Dentro de los ratones No-Tg (no transgénicos), en machos y hembras se realizaron mediciones hasta los 110 días y 160 días de vida respectivamente.

### **5.2.2. Prueba motora de *hanging***

Los ratones se ubicaron de forma individual con sus patas delanteras sobre una barra horizontal con un largo de 39 cm y a una altura de 35 cm. Se observó en un período de 30 segundos grabando con una cámara de video la reacción del ratón y su posición corporal. Esta prueba se realizó tres veces para cada ratón y una vez

por semana. Cada video se analizó para asignarle un puntaje, y se promediaron las tres mediciones por ratón. El criterio grueso de puntuación utilizado fue: 0 cuando el ratón no pudo sostenerse en la barra por más de 10 segundos, 1 cuando el ratón sólo pudo mantenerse en la barra con las patas delanteras, 2 cuando el ratón pudo mantenerse con las patas delanteras y trató de usar las traseras para llegar a la barra pero sin éxito, 3 cuando utilizó las patas delanteras y pudo usar una o las dos patas traseras, 4 cuando utilizó las cuatro patas y además la cola, 5 cuando escapó activamente de la barra horizontal y bajó por la barra vertical en un tiempo menor a 30 segundos.

### **5.3. Inyecciones intraperitoneales de tunicamicina en ratones**

Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una solución de tunicamicina 0,25 mg/mL (Calbiochem) diluido en glucosa 150 mM. Se administraron 20 µL por gramo de peso corporal para obtener una concentración de 5 µg/g. Como control de tratamiento, se realizaron inyecciones 20 µL por gramo de peso corporal de DMSO 0,25 mg/mL también diluido en glucosa 150 mM. Para la estandarización de la técnica, se sacrificaron los ratones 12, 24 y 48 h después de la inyección para análisis bioquímicos en tejidos.

### **5.4. Análisis de muestras de tejido animal por microscopía**

#### **5.4.1. Perfusión de animales y cortes de tejido**

Los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de una solución 6 µL de ketamina y xilazina (Vetcom) en agua destilada (concentración final ketamina al 2% y xilazina al 0,4% v/v) por gramo de peso corporal. Se

perfundieron de forma transcardiacal con 20 mL de NaCl al 0,9%, seguido de 30 mL de PFA al 4% en PBS 0,1 M frío y a pH 7,4. Luego de este proceso, se extrajo el cerebro de cada ratón y se incubó por 12 horas en PFA al 4% pH 7,4 a 4°C. Una vez transcurridas las 12 h, cada cerebro extraído se deshidrató con sacarosa al 30% más 0,02% de azida en agua destilada, cambiándolos a la misma solución fresca dos veces cada 24 h. Los cerebros se congelaron en medio OCT (*optimal cutting temperature compound*, Tissue Tek). Utilizando un criostato (Leica) se realizaron cortes de 40 µm de espesor desde posterior hacia anterior iniciando en bregma (coordenada 0 fijada en el atlas de cerebro de ratón de Franklin y Paxinos, 2001).

#### **5.4.2. Inmunofluorescencia de tejido**

Para el análisis de inmunofluorescencia se realizó todo el protocolo en cortes montados de cerebro y médula espinal de ratón de 40 µm de espesor, los cuales se bloquearon con BSA al 5% y Tritón X-100 al 0,2% en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente los cortes se incubaron con el anticuerpo primario durante 16 h a 4°C (anti-TDP-43, 10782-2-AP, 1:500, ProteinTech Group) en solución de bloqueo. Los cortes se lavaron a temperatura ambiente 4 veces por 5 minutos en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-rabbit, 1:1000, Alexa 488, Molecular Probes) en PBS. Se lavaron 2 veces por 5 minutos en PBS y finalmente se incubaron con la sonda Hoechst (1:5000, Invitrogen) que fue utilizada como marcador nuclear. Los cortes se embebieron en medio Fluoromount (Electron Microscope Science) y se cubrieron por un cubreobjeto sellado con esmalte acrílico transparente, para posteriormente ser guardados a 4°C protegidos de la luz. El análisis de los cortes se

realizó por microscopía confocal mediante la utilización del microscopio Olympus IX71 y las imágenes se capturaron con la cámara QImaging QICAM Fast 1934.

### **5.4.3. Inmunohistoquímica de tejido**

Para el análisis de inmunohistoquímica se realizó el protocolo en cortes montados de cerebro y médula espinal de ratón de 25  $\mu\text{m}$  de espesor. Se incubaron los cortes montados en los portaobjetos en buffer citrato pH 4,5 a una temperatura de 95°C por 10 minutos. Posteriormente, se dejaron enfriando por 15 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron en PBS por 5 minutos. Se incubaron los cortes por 10 minutos en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% diluido en metanol (Merck) a temperatura ambiente y después se lavaron en PBS 2 veces por 5 minutos. Los cortes se bloquearon con BSA al 5% y Tritón X-100 al 0,2% en PBS por 45 minutos. Luego, se incubaron con el anticuerpo primario durante 16 h a 4°C en solución de bloqueo (anti-Flag, F7245, 1:250, Sigma; anti-ubiquitina, Mab 1510, 1:200, Chemicon). Después, los cortes se lavaron en PBS 3 veces por 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario en BSA al 1% diluido en PBS (anti-rabbit-HRP y anti-mouse-HRP 1:1000, Invitrogen) durante 1h a temperatura ambiente. Nuevamente, se lavaron en PBS 3 veces por 5 minutos y se revelaron utilizando el compuesto 3,3-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich). Los cortes se sumergieron en agua destilada para lavar y se deshidrataron por medio de una batería de alcoholes (etanol al 70%, 80%, 95% y 100%) y xileno. Finalmente, los cortes se sellaron utilizando el medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich).

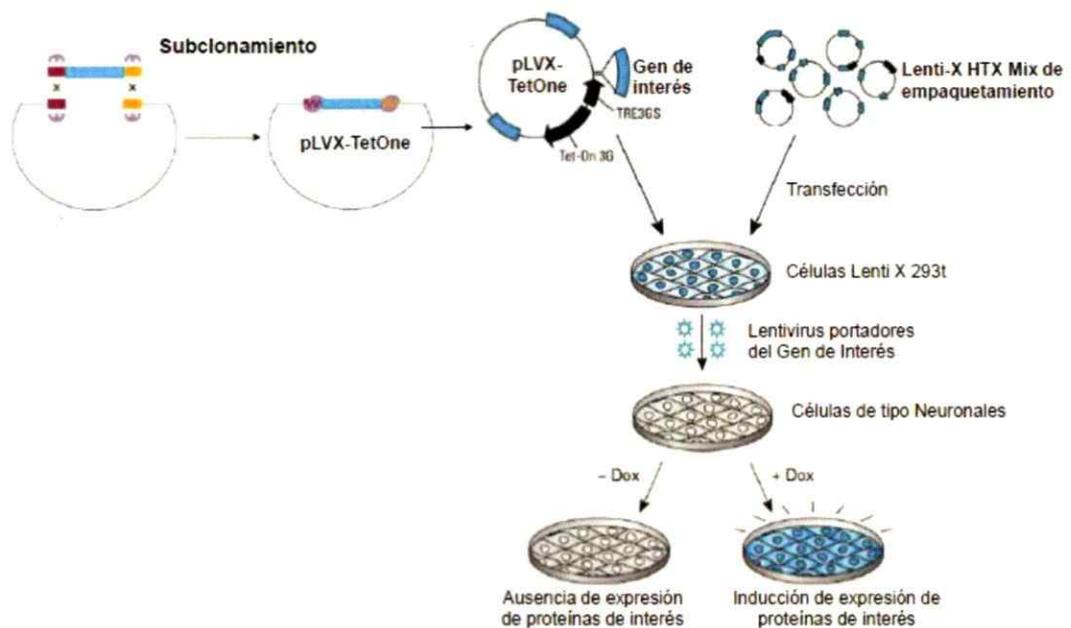
## 5.5. Generación de líneas estables de células NSC34 TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup>

Se generaron líneas estables de NSC34 que expresan de manera inducible las formas humanas de TDP-43 en su forma silvestre (WT) y mutante (A315T) fusionadas al reportero GFP. Para esto se utilizó el sistema de expresión inducible TetOne (Clontech), el cual fue transducido a estas células mediante lentivirus. Los plasmidios pLVX-TetOne tienen el sistema inducible con doxiciclina y un gen de resistencia a puromicina.

Para la generación de lentivirus se sembraron células LENTI X 293t (Clontech) en medio DMEM, SFB al 10% libre de tetraciclina (Clontech), y luego de 24 h se transfectaron los plasmidios pLVX-TetOne con los genes de interés subclonados, utilizando el kit Xfect Polymer (Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, después de 48 h, se llevó a cabo el proceso de cosecha de lentivirus, colectando el medio y centrifugándolo a 500 RPM por 10 minutos. Se rescató el sobrenadante, se eliminaron los restos celulares por medio de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y finalmente las alícuotas de lentivirus se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se sembraron células NSC34 en medio DMEM (Gibco), SFB (Gibco) al 5%, piruvato de Na (Gibco) 1X, penicilina/streptomina (Biological Industries) 1X. Al día siguiente se infectaron con los lentivirus generados utilizando un título 1:2 de la preparación. Luego de 48 h, se incubaron las células en medio con puromicina (Sigma) a una concentración de 3  $\mu\text{g/ml}$ . Finalmente, después de 48 h, se obtuvo una subpoblación celular resistente a puromicina que contiene el gen de interés inserto en su genoma de manera estable (Figura 5). La inducción de la expresión de

TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> fusionadas a GFP se realizó en presencia de doxiciclina (100 ng/mL).



**Figura 5. Generación de líneas celulares estables con sistema Tet-One.** Diagrama del protocolo utilizado para la generación de los modelos *in vitro* inducibles y estables NSC34 TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup>. Las secuencias de genes de interés fueron subclonadas en el plasmidio pLVX utilizando secuencias adaptadoras para la recombinación homóloga. A continuación, para obtener las partículas virales, los plasmidios que contienen el gen de interés fueron co-transfectados junto al mix de empaquetamiento Lenti-X HTX en células empaquetadoras Lenti X 293t. Finalmente, las células de tipo neuronal (NSC34) fueron infectadas con los virus portadores del gen de interés y seleccionadas con puromicina (3 µg/ml) para la obtención de células estables. Para la inducción de la expresión de la proteína (TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> fusionadas a GFP) se incubaron las células con doxiciclina (100 ng/mL). Imagen modificada de Clonetech (COD: 631844).

## **5.6. Cinética de tunicamicina en células NSC34**

Se sembraron células NSC34 TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> que fueron inducidas 72 h con doxiciclina. Posteriormente, se trataron con tunicamicina a una concentración de 500 ng/mL por distintos tiempos (4, 8 y 16 h) y un control no tratado (NT). Una vez realizados los tratamientos, se colectaron las células para la extracción de proteínas. Para el caso del análisis por microscopía, luego de la inducción con doxiciclina, las células fueron tratadas con tunicamicina por 16 h.

## **5.7. Análisis de líneas celulares por microscopía**

### **5.7.1. Inmunofluorescencia de células**

Se depositaron cubreobjetos de 12 mm en placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon) y se agregaron 300 µL de poli-D-lisina (Sigma) a cada uno. Se incubó la placa con los cubreobjetos por 1h a 37°C y posterior a eso se recuperó la poli-D-lisina y los pocillos se lavaron 3 veces con agua destilada autoclavada. Se sembraron 10000 células por pocillo y luego de los tratamientos experimentales correspondientes, se lavaron los pocillos una vez con PBS Ca/Mg por 5 minutos. Se agregó a cada pocillo PFA al 4% por 30 minutos para fijar las células. La placa se guardó a 4°C por 16 h.

Se fijaron nuevamente las células con PFA al 2% por 15 minutos y se lavaron los cubreobjetos en PBS Ca/Mg por 5 minutos. Se incubaron los cubreobjetos 500 µL de solución de permeabilización (PBS Ca/Mg Tritón X100 al 0,2%) por 10 minutos y se lavaron 3 veces con PBS Ca/Mg por 5 minutos. Posteriormente, se incubaron con

500  $\mu$ L de solución de bloqueo (BSA al 0,5% y SFB al 10%) durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego con el anticuerpo primario (anti-ERp72, SPS-720, 1:200, ENZO) en BSA al 0,5% por 16 h a 4°C. Se lavaron los cubreobjetos 3 veces con PBS Ca/Mg por 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-rabbit, 1:1000, Alexa 568, Molecular Probes) en BSA al 0,5% por 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de esto, se lavaron 3 veces con PBS Ca/Mg por 5 minutos y se incubaron con la sonda Hoechst (1:5000, Invitrogen) en PBS por 5 minutos. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron 1 vez con PBS, se montaron con 3  $\mu$ L de Fluoromount (Electron Mycroscope Science) en portaobjetos y se sellaron con esmalte acrílico transparente para guardarse a 4°C protegidos de la luz. Las muestras fueron observadas con el microscopio Olympus DSU Confocal System y Nikon C2 Plus confocal.

#### **5.7.2. Microscopía automatizada (Cellomics)**

Se sembraron células NSC34 TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> en placas de 12 pocillos (Falcon), y se indujo la expresión de las variantes de TDP-43 fusionadas a GFP con doxiciclina (100 ng/mL) por 72 h. Se cuantificó el porcentaje de población de células vivas GFP positivas utilizando el microscopio Cellomics™ (ThermoFisher) realizando adquisición de imágenes con el software "Thermo Scientific HSC Studio Cellomics Navigator". Previo a la medición, se tiñeron los núcleos con Hoechst (1:5000, Invitrogen) por 30 minutos.

## **5.8. Análisis bioquímico de muestras animales y celulares**

### **5.8.1. Extracción de proteínas desde tejido animal**

Los tejidos de corteza y médula espinal se homogenizaron en 100  $\mu$ L de PBS frío suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). Una parte de este homogenizado se llevó a 100  $\mu$ L (en extractos de corteza) y 50  $\mu$ L (en extractos de médula espinal) de PBS 1% Tritón X-100. Posteriormente, las muestras se sonicaron 2 veces por 10 segundos y seguido de esto se centrifugaron a 10000 RPM a 4°C por 5 minutos para descartar trozos de tejido que no se lograron homogenizar completamente. El sobrenadante rescatado se cuantificó mediante el ensayo micro-BCA (Pierce) para determinar la concentración total de proteínas. Las muestras se prepararon usando 10-50  $\mu$ g del total de proteínas, se incubaron con DTT a una concentración final de 100 mM por 10 minutos a temperatura ambiente, y luego se mezclaron con buffer de carga 5X (0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 0,05% azul de bromofenol y 20% glicerol) y se calentaron por 5 minutos a 95°C.

### **5.8.2. Extracción de proteínas desde células**

Se recolectaron células desde las placas y fueron centrifugadas a 5000 RPM por 5 minutos a 4°C. Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en PBS frío para lavar y nuevamente se centrifugaron 5000 RPM por 5 minutos a 4°C. Se repitió una vez más este proceso de lavado y los *pellets* se resuspendieron en buffer TEN 1X, (tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM pH 8, NaCl 100 mM), NP40 al 1%, iodoacetamida 50 mM, suplementado con mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). Las muestras se sonicaron 2 veces por 10 segundos y se procedió a cuantificar mediante el ensayo micro-BCA (Pierce) para determinar la concentración total de proteínas.

Las muestras se prepararon usando 10-30  $\mu\text{g}$  del total de proteínas, se incubaron con DTT a una concentración final de 100 mM por 10 minutos a temperatura ambiente, y luego se mezclaron con buffer de carga 5X (0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 0,05% azul de bromofenol y 20% glicerol) y se calentaron por 5 minutos a 95°C.

### 5.8.3. SDS-PAGE y western blot

Para la electroforesis de las muestras de proteínas se utilizaron mini-geles denaturantes. El gel concentrador fue preparado con Tris-HCl pH 6,8, 4% acrilamida-bis-acrilamida, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amonio y 0,06% TEMED. El gel separador fue preparado con 380 mM Tris-HCl pH 8,3, 8% acrilamida-bis-acrilamida, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amonio y 0,06% TEMED. Una vez que se cargaron las muestras en el gel, se inició la electroforesis en solución buffer de corrida (25 mM Tris, 250 mM glicina y 0,1% SDS) a un voltaje constante de 80 V mientras el frente pasó por el gel concentrador y se ajustó a 100 V cuando pasó al separador. La corrida se detuvo cuando el frente azul dejó el gel. Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF en solución buffer de transferencia (25 mM Tris, 250 mM glicina y 20% de metanol) a un voltaje constante de 100 V por 2 h y 30 minutos en hielo. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en una solución de leche al 5% en PBS-tween al 0,02% por 16 h a 4°C: anti-TDP-43 (1:3000, ProteinTech Group), anti-GFP (1:2000, Santa Cruz) anti-XBP1 (1:1000, Biolegend), anti-BiP (Abcam 1:2000), anti-ATF4 (1:2000, Santa Cruz), anti-HSP90 (1:3000, Santa Cruz), anti- $\beta$  actina (1:20000, MP Biomedicals), anti- $\alpha$

tubulina (1:2000, Oncogene). Las membranas se lavaron 6 veces por 5 minutos con PBS-tween al 0,1% y luego se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP o anti-mouse-HRP (1:3000, Invitrogen) en solución de leche al 5% en PBS-tween al 0,02% por 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente las membranas se lavaron con PBS-tween, pero esta vez 3 veces por 5 minutos. Finalmente, se revelaron mediante el kit ECL Substrate Western Blotting (Pierce) y la detección de la señal por medio del equipo ChemiDoc™ (BioRad). Para cuantificar los niveles de proteínas obtenidos, las intensidades de las bandas se calcularon usando el programa computacional ImageJ. En el caso de las muestras de tejido animal, las bandas se normalizaron respecto al promedio de señal de los No-Tg presentes en el mismo gel, y luego una nueva normalización con respecto al control de carga. En los resultados de extractos de células, se normalizaron dentro del mismo gel con respecto al control sin inducción con doxiciclina, ni tratamiento con tunicamicina, para después normalizar con respecto al control de carga.

#### **5.8.4. Filter Trap**

La muestra de proteína ya resuspendida en un buffer con detergente y cuantificada se preparó en una solución de SDS al 1% diluido en PBS. Para las muestras de tejido se utilizaron entre 30-60 µg de proteína. Se utilizó el dispositivo BioDot Microfiltration Apparatus (BioRad) para realizar filtración de muestras a través de una membrana de acetato de celulosa, la cual posee poros de 0,22 µm.

La membrana de acetato de celulosa se dispuso en el aparato filtrador por sobre una membrana de PVDF. Previo a esto, la membrana de acetato de celulosa se lavó en una solución de SDS al 1% diluido en PBS, y la de PVDF se activó con

metanol puro (Merck) y posteriormente se lavó en metanol al 10% diluido en agua destilada. A continuación, se procedió a cargar las muestras y filtrarlas al vacío. Después de filtrar las muestras, se lavaron las membranas de acetato de celulosa con la solución de SDS al 1% y se bloquearon con leche al 5% por 30 minutos a temperatura ambiente. Se dejaron incubando con los anticuerpos primarios diluidos en una una solución de leche al 5% en PBS-tween al 0,02% por 16 h a 4°C. Se utilizó anti-TDP-43 (1:3000, ProteinTech Group) y anti-poliubiquitina (1:2000, FK1, ENZO). Las membranas se lavaron 6 veces por 5 minutos con PBS-tween al 0,1% y luego se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP o anti-mouse-HRP (1:3000, Invitrogen) en solución de leche al 5% en PBS-tween al 0,02% por 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente las membranas se lavaron con PBS-tween, pero esta vez 3 veces por 5 minutos. Finalmente, se revelaron mediante el kit ECL Substrate Western Blotting (Pierce) y la detección de la señal por medio del equipo ChemiDoc™ (BioRad).

#### **5.8.5. Extracción de ARN y generación de ADN complementario**

Los tejidos de corteza y médula espinal se homogenizaron en 100 µL de PBS frío suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). Un volumen de 30 µL se transfirió a 600 µL de TRIzol (Invitrogen) y la extracción de ARN se realizó bajo el protocolo sugerido por el fabricante. El ADNc se sintetizó a partir de 2 µg de ARN total con el kit iScript cDNA Syntesis (BioRad), Buffer RT 10X, dNTPs 1 mM cada uno, partidores *random p(dN)6* (Roche) y 1 µL de transcriptasa reversa en un volumen final de 20 µL. El programa para esta reacción RT fue: 25°C por 5 minutos, 44°C por 45 minutos y 85°C por 5 minutos.

### 5.8.6. PCR en tiempo real

El PCR en tiempo real o qPCR (del inglés *quantitative* PCR) se llevó a cabo utilizando EvaGreen™ Dye (Biotium) en una mezcla de 4 µL de una dilución 1:20 del cDNA, 0,5 µL de partidores 10 µM, 10 µL de Mix 2x y 7,5 µL de agua libre de nucleasas en un volumen final de 20 µL. El programa de qPCR usado fue: 10 minutos a 95 °C (ciclo de denaturación), 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 57 °C (*annealing*), 15 segundos a 72 °C y 1 ciclo de 10 segundos a 95 °C, 5 segundos a 25 °C, 1 segundo a 70 °C y 1 segundo a 95 °C en el equipo ABI PRISM7700 system (Applied Biosystems).

Las secuencias de los partidores fueron diseñadas con el programa Primer Express (Applied Biosystems, USA) o bien obtenidas desde el Primer Data Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>). Los niveles relativos de ARNm para cada gen de interés fueron obtenidos a partir del ciclo umbral y normalizados con los niveles de actina. El ciclo umbral de actina fue utilizado como control de amplificación.

Los partidores utilizados fueron:

*Xbp1s* sentido 5'- TGCTGAGTCGGCAGCAGGTG -3'

*Xbp1s* antisentido 5'- GACTAGCAGACTCTGGGGAAG -3'

*Xbp1t* sentido 5'- TTGTCA CCTCCCCAGAACATC -3'

*Xbp1t* antisentido 5'- TCCAGAATGCCCAAAGGAT -3'

*Edem* sentido 5'- AAGCCCTCTGGAAGCTTGCG -3'

*Edem* antisentido 5'- AACCCAATGGCCTGTCTGG -3'

*Aff4* sentido 5'- TCCGGGACAGATTGGATGTT -3'

*Aff4* antisentido 5'- TGGCCAATTGGGTTCACTGT -3'

*Chop* sentido 5'- TGGAGAGCGAGGGCTTTG -3'

*Chop* antisentido 5'- GTCCCTAGCTTGGCTGACAGA -3'

*Bip* sentido 5'- TCATCGGACGCACTTGGAA -3'

*Bip* antisentido 5'- CAACCACCTTGAATGGCAAGA -3'

*Trb3* sentido 5'- CCAGAGATACTCAGCTCCCG -3'

*Trb3* antisentido 5'- GAGGAGACAGCG GATCAGAC -3'

*Aaat* sentido 5'- CATCAACGACTCTGTTGTAGACC -3'

*Aaat* antisentido 5'- CTGGATACAGGATTGCGGTATTT -3'

*Actina* sentido 5'-TACCACCATGTACCCAGGCA-3'

*Actina* antisentido 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'

#### **5.8.7. PCR convencional y digestión con enzima PstI**

Las muestras de ADNc se amplificaron por PCR convencional. Se utilizaron los partidores que amplifican productos de aproximadamente 600 pb de *xbp-1t* (a una concentración final de 0,5  $\mu$ M en 25  $\mu$ L de reacción):

*Xbp1t* sentido 5'-AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC-3', *Xbp1t* antisentido 5'-GGATCTCTAAACTAGAGGCTTGGTG-3'.

También se utilizaron partidores que amplifican productos de aproximadamente 100 pb de *actina* (a una concentración final de 0,25  $\mu$ M en 25  $\mu$ L de reacción):

*Actina* sentido 5'-TACCACCATGTACCCAGGCA-3,' *Actina* antisentido 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'.

El producto de *Xbp1* se sometió a un proceso de digestión con la enzima PstI (Fermentas), siguiendo el protocolo del fabricante. Esta enzima reconoce un sitio de restricción en la secuencia de transcrito de *Xbp1u* (*unspliced*, no procesado) que permite el corte del producto en la mitad de su secuencia, entregando productos de 300 pb. Los productos de PCR (*Xbp1* con la digestión PstI y *actina*) se analizaron a través de electroforesis en geles de agarosa ultrapura al 2,5% con tinción de SYBR (Invitrogen) a una concentración de 1:30000 a 100 V.

#### **5.9. Ensayo de luciferasa para células**

Para este ensayo se sembraron células NSC34 en placa de 48 pocillos. Al día siguiente, se transfectaron de manera transitoria con el kit Effectene Transfection Reagent (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plasmidios que se utilizaron son pGL4-Renilla, pGL3-5 $\times$ UPRE-luc (contiene 5 repeticiones del sitio de unión a ADN de XBP1), pcDNA3-XBP1s, pEGFP- TDP-43<sup>WT</sup>, pEGFP- TDP-43<sup>A315T</sup>, pEGFP (vector vacío). Luego de 48 h, se midió la actividad de luciferasa con el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante.

### **5.10. Análisis Estadístico**

Los datos numéricos y cuantificaciones realizadas para cada resultado experimental se mostraron como promedio +/- error estándar. Las pruebas estadísticas que se utilizaron para determinar la normalidad de los datos fueron las de Kolmogórov-Smirnov, Omnibus D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk. Para determinar las diferencias en los análisis de datos que cumplían con la normalidad se utilizaron pruebas paramétricas como t-Student y ANOVA de una vía (para comparaciones múltiples). En el caso del análisis de datos que no cumplían con la distribución normal se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para detectar diferencias. Se consideró con un valor de  $p < 0,05$  una diferencia estadísticamente significativa. Todos estos análisis se realizaron usando las herramientas del programa computacional GraphPad Prism 5.

## 6. RESULTADOS

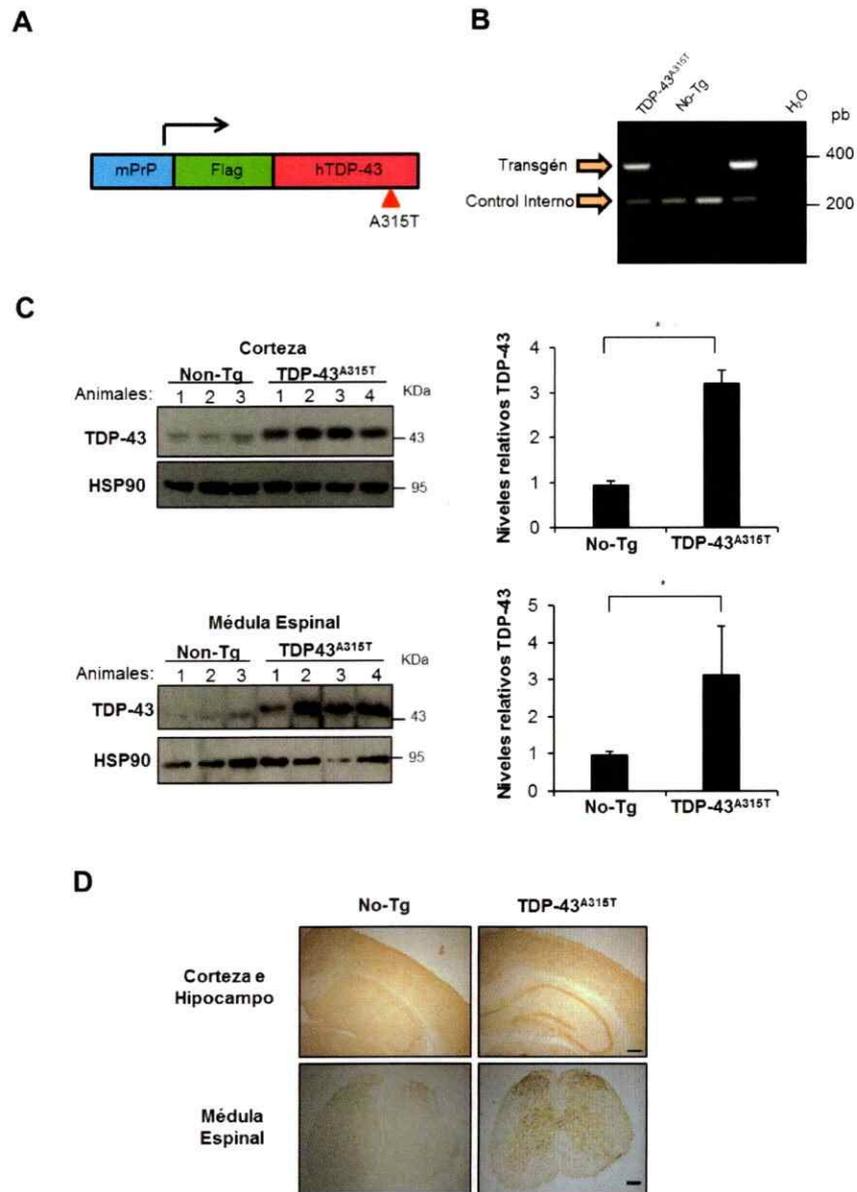
### 6.1. Caracterización del modelo murino transgénico TDP-43<sup>A315T</sup>.

Para realizar los estudios *in vivo* sobre la patogenicidad de TDP-43, en este trabajo se utilizó un modelo murino que sobre-expresa la proteína TDP-43 humana con la mutación A315T en el SNC (Wegorzewska et al., 2009). El constructo que expresa el animal transgénico contiene una secuencia de ADNc que codifica para la proteína TDP-43 humana y la mutación corresponde a una del tipo *missense* ubicada en el dominio rico en glicinas que se encuentra presente en el extremo C-terminal. Además, la secuencia codificante contiene el marcador *flag* en el extremo N-terminal (Figura 6A) y su expresión está dirigida por el promotor de la proteína prion de origen murino (PrPm) que permite la sobre-expresión del transgén principalmente en el SNC.

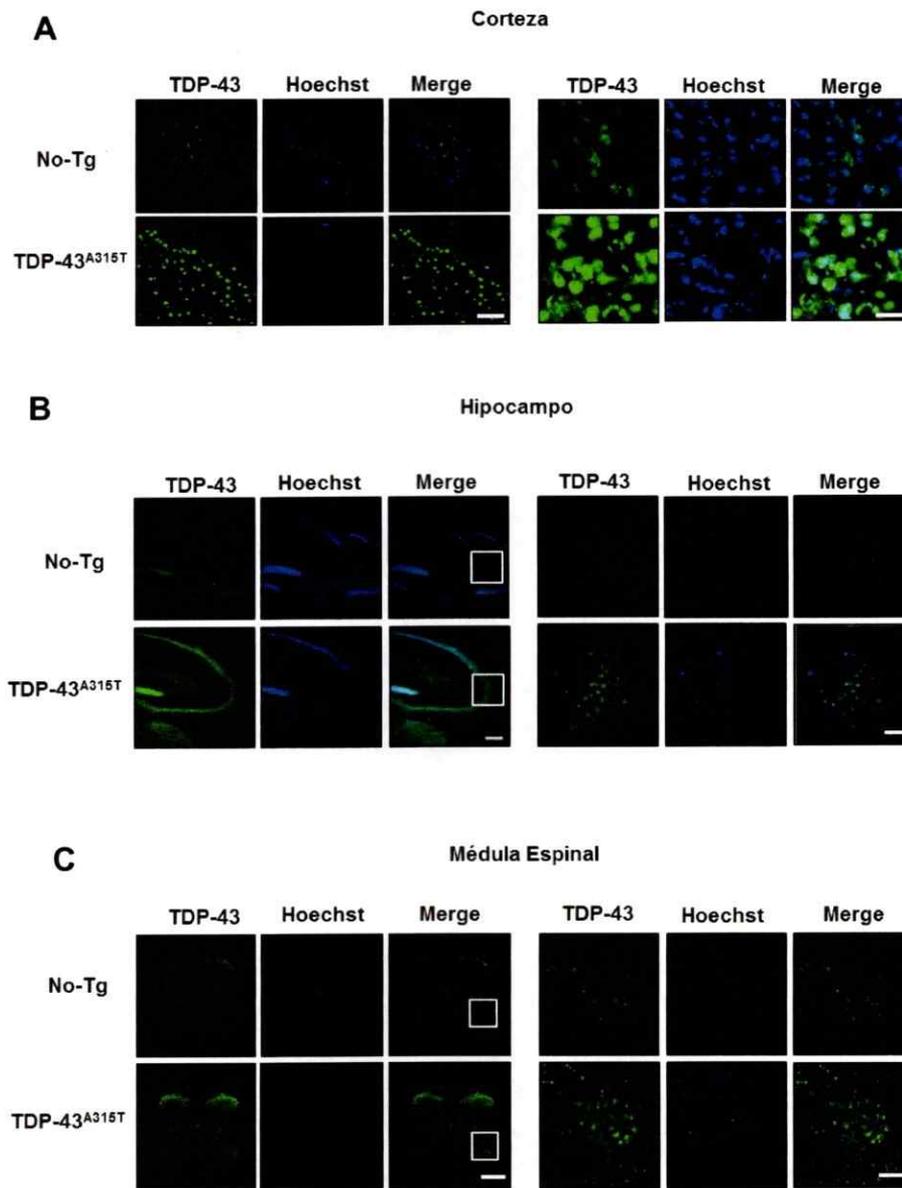
Los animales experimentales transgénicos para TDP-43 (TDP-43<sup>A315T</sup>) se generaron mediante cruces entre animales silvestres o no transgénicos (No-Tg) y TDP-43<sup>A315T</sup>, por lo que todos los animales sólo portaron un alelo mutante. Para identificar los genotipos de los animales obtenidos, se realizó la técnica de PCR convencional utilizando los parámetros especificados en Materiales y Métodos. Los partidores utilizados en la mezcla de reacción (denominados 9442 y 9443) reconocen una secuencia específica del transcrito de TDP-43 humano, es decir sólo amplifican el transgén generando un producto de un tamaño de 400 pb (Figura 6B). La otra pareja de partidores (denominados oIMR8744 y oIMR8745) reconoce una secuencia

específica del cromosoma 14 perteneciente al genoma de ratones de fondo genético C57/BL6J y permite generar un producto de 200 pb, lo que se utilizó como un control interno de la reacción (Figura 6B). Se evaluaron los niveles de proteína TDP-43 en la corteza y la médula espinal de animales TDP-43<sup>A315T</sup> con sus respectivos controles No-Tg por la técnica de Western Blot (Figura 6C). Los niveles de sobre-expresión de TDP-43 fueron cercanos a las 3 veces por sobre los niveles basales, en ambos tejidos analizados (Figura 6C). Se pudo detectar la presencia de la secuencia "flag" por inmunohistoquímica en corteza, hipocampo y médula espinal en los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> (Figura 6D). La sobre-expresión de TDP-43 en los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> también fue observada por inmunofluorescencia en zonas de corteza (Figura 7A), hipocampo (Figura 7B) y médula espinal (Figura 7C).

En edades jóvenes, luego del destete a los 21 días de vida, los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> mostraron una apariencia fenotípica completamente normal sin diferenciarse de los ratones hermanos No-Tg. Sin embargo, transcurridas 14 semanas aproximadamente, se comenzaron a evidenciar signos que muestran algún tipo de deterioro fisiológico (Wegorzewska et al., 2009). En estos animales, se pudo detectar una baja de peso corporal, curvatura de la columna (Figura 8A), caída de las extremidades posteriores (Figura 8A) y dificultades en el desplazamiento. Sin embargo, nunca se observó un desarrollo de parálisis total, a diferencia de otros modelos de ELA como aquellos que expresan formas mutantes de la enzima SOD1 (Gurney et al., 1994; Ripps et al., 1995). Los ratones se sacrificaron cuando se observó un descenso brusco del peso y problemas motores. Se realizó un análisis de la sobrevivencia de los animales y se observó que este parámetro es diferenciado en

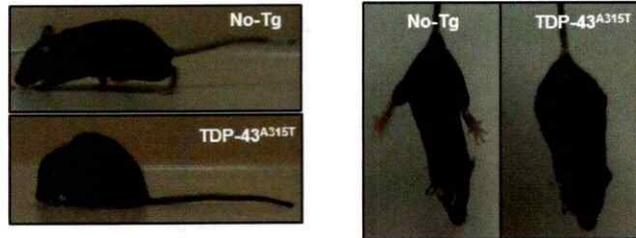


**Figura 6. Caracterización del modelo murino transgénico para TDP43<sup>A315T</sup>.** (A) Diagrama esquemático que representa a la construcción que contiene al transgén TDP-43 humano con la mutación A315T; en él un ADNc contiene la secuencia codificante para esta proteína (sección en fucsia) y además la secuencia del reportero *flag* (sección verde). Su expresión está dirigida bajo un promotor priónico de origen murino (PrPm) (sección azul). (B) Ejemplo de genotipificación de los ratones de la colonia TDP-43<sup>A315T</sup>. La banda de 400 pb indica la presencia del transgén y la de 200 pb corresponde a un control interno de la reacción. (C) Análisis de los niveles de la proteína TDP-43 en corteza (panel superior) y médula espinal (panel inferior) de los animales TDP-43<sup>A315T</sup> y hermanos de camada No-Tg por la técnica de Western Blot. La cuantificación se realizó normalizando con el control de carga HSP90 (\* 0.01 < p < 0.05, prueba no paramétrica Mann-Whitney) Edades ratones machos No-Tg: 80, 63 y 72 días. Edades ratones machos TDP43<sup>A315T</sup> = 59, 68, 72 y 71. (D) Inmunohistoquímica del marcador *flag* en animales No-Tg y TDP-43<sup>A315T</sup> (Barra panel superior = 300  $\mu$ M, barra panel inferior = 200  $\mu$ M).

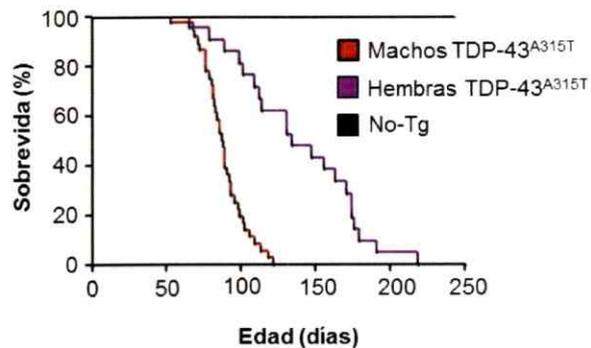


**Figura 7. Detección de la sobre-expresión de la proteína TDP-43 en el tejido nervioso de los animales TDP-43<sup>A315T</sup> por inmunofluorescencia.** Detección de la proteína TDP-43 por inmunofluorescencia en distintos tejidos nerviosos de ratones machos TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 3) con sus respectivos hermanos de camada No-Tg (n = 3). Se analizaron a la edad de 70 días. Se evaluó la expresión de TDP-43 en **(A)** la corteza (barra panel izquierdo = 30  $\mu$ M, barra panel derecho = 12  $\mu$ M), **(B)** hipocampo (barra panel izquierdo = 150  $\mu$ M, barra panel derecho = 25  $\mu$ M) y **(C)** médula espinal (Barra panel izquierdo = 500  $\mu$ M, barra panel derecho = 150  $\mu$ M). Imágenes de microscopía confocal (Olympus IX71).

**A**



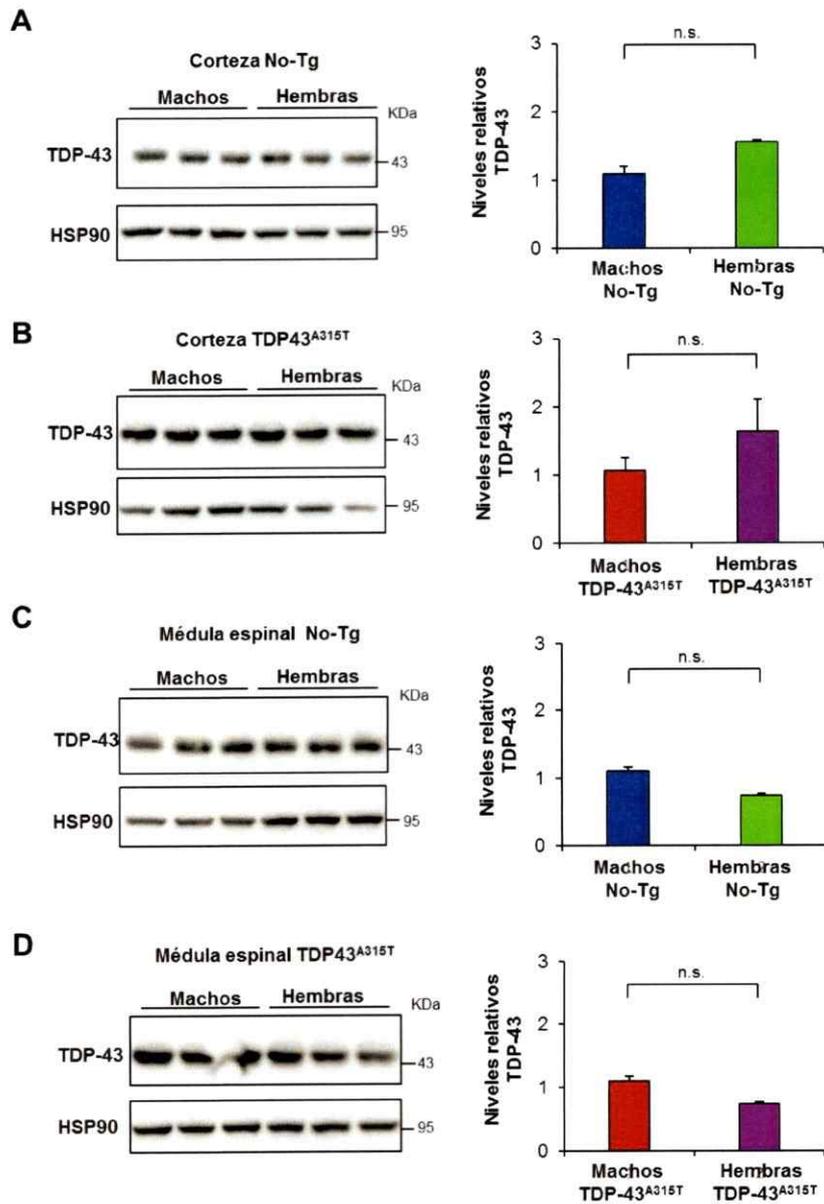
**B**



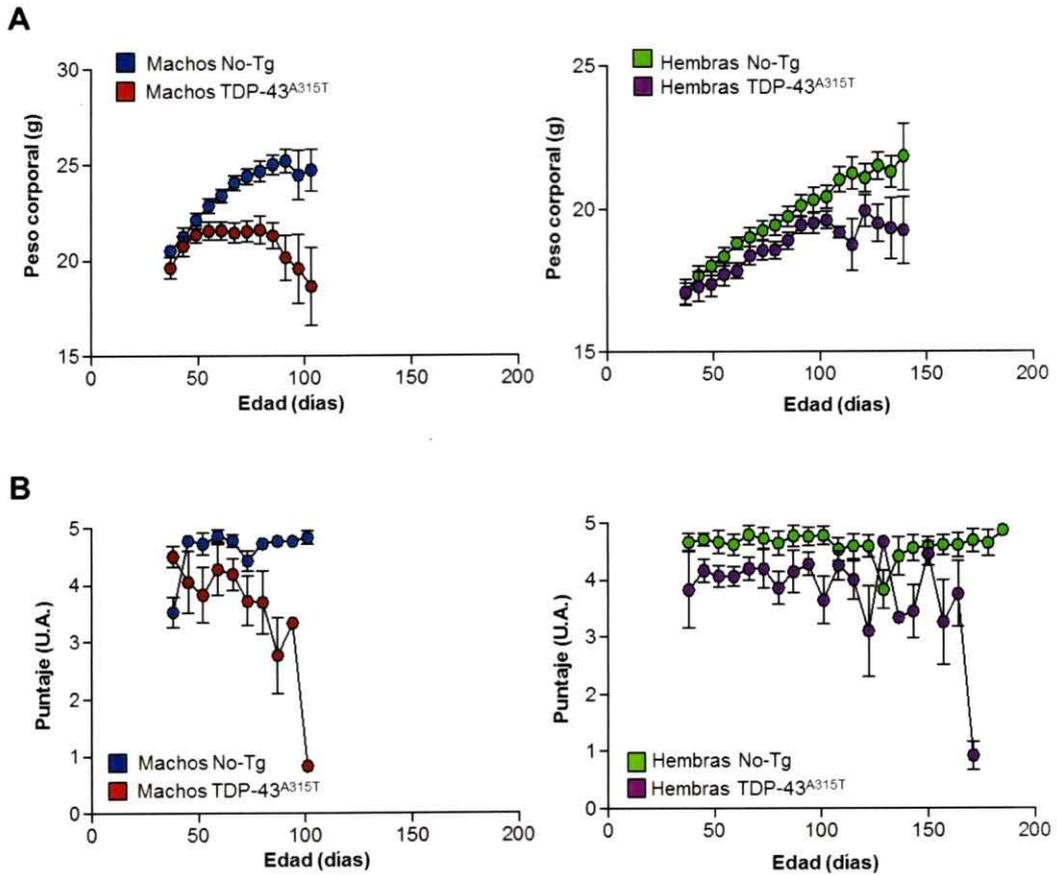
**Figura 8. Determinación de la sobrevivencia de los animales TDP-43<sup>A315T</sup>.** (A) Fotografía que muestra el fenotipo patogénico un ratón TDP-43<sup>A315T</sup> en etapa sintomática tardía comparando con su hermano no transgénico (No-Tg) de la misma edad (179 días, género femenino). Se muestra también la caída de las extremidades posteriores del ratón transgénico en su estadio sintomático. (B) Curva de sobrevivencia de ratones No-Tg y TDP-43<sup>A315T</sup>. Todos los ratones No-Tg (línea negra) (n = 83) sobrevivieron más allá de los 200 días. Los machos TDP-43<sup>A315T</sup> (línea roja) (n = 36) tienen un promedio de sobrevivencia de 88 días y las hembras TDP-43<sup>A315T</sup> (línea morada) (n = 21) tienen un promedio de sobrevivencia de 138 días (p = 0,0004, prueba Mantel-Cox).

cuanto a grupos de género (Figura 8B). Los machos TDP-43<sup>A315T</sup> mostraron un promedio de supervivencia de  $88 \pm 2$  días y las hembras TDP-43<sup>A315T</sup> de  $138 \pm 9$  días. Dada esta observación, se evaluaron los niveles de la proteína de TDP-43 en corteza y médula espinal comparando por género en animales No-Tg (Figura 9A, 9C) y TDP-43<sup>A315T</sup> (Figura 9B, 9D), sin embargo, no se detectó ninguna diferencia significativa (Figura 9). Estos datos muestran que los machos y hembras TDP-43<sup>A315T</sup> tienen fenotipos distintos, pero esto no depende de los niveles de expresión de TDP-43.

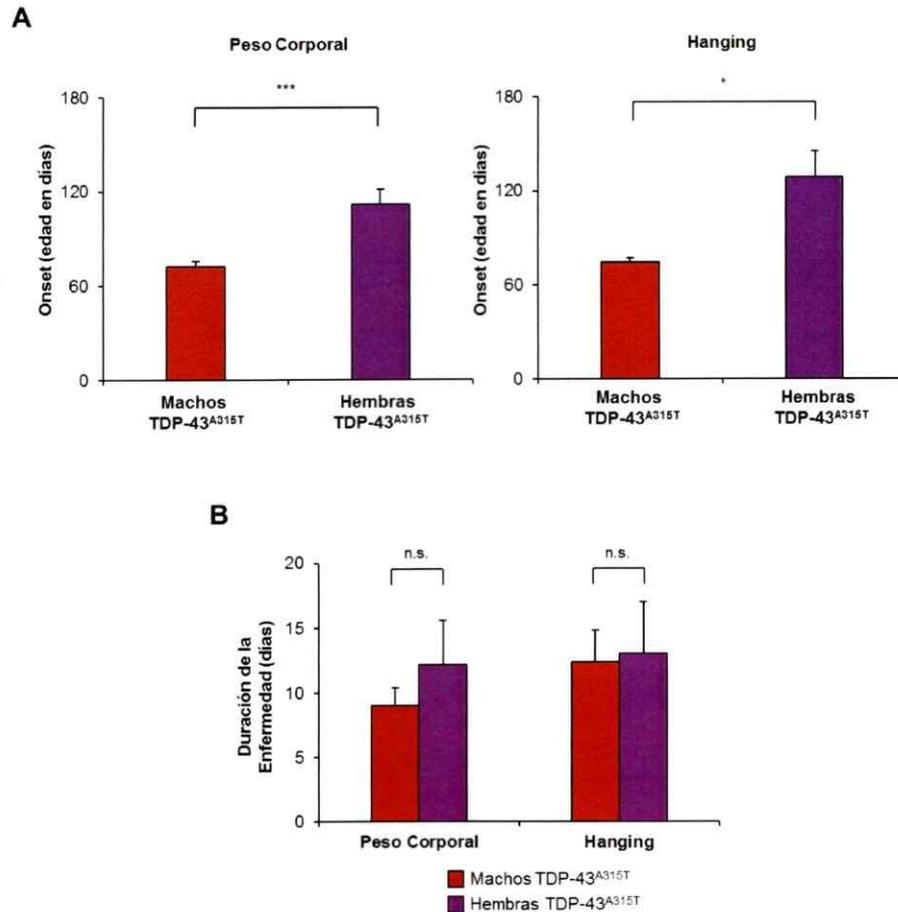
Por otro lado, la enfermedad desarrollada por el modelo murino TDP-43<sup>A315T</sup> fue monitoreada de forma sistemática con mediciones de peso corporal y de las habilidades motoras con la prueba de *Hanging*, en la cual puntajes arbitrarios son asignados acordes al desempeño del ratón en una tarea (ver Materiales y Métodos). Es posible apreciar, a partir de las curvas promedio, que los animales transgénicos perdieron progresivamente peso (Figura 10A). Además, experimentaron un deterioro motor y de coordinación, lo cual fue observado por la prueba de *Hanging* (Figura 10B). Se analizaron de forma individual las curvas de progresión de peso corporal y prueba de *Hanging* y fue posible detectar un inicio de los síntomas evidentes en los animales TDP-43<sup>A315T</sup>, es decir, establecer un "onset" o inicio de la enfermedad. En el caso del análisis a partir del peso corporal, el *onset* se determinó como el día en que se midió una baja del 2,5% del máximo después de haber sido alcanzado. Por otro lado, a partir del análisis de desempeño en prueba de *Hanging*, el *onset* se determinó como el primer punto de la caída de la pendiente en cada curva individual. Se observó que las hembras presentan un *onset* más tardío que los machos (Figura 11A) y no hay diferencias en la duración de la enfermedad (Figura 11B).



**Figura 9. Perfil de expresión de la proteína TDP-43 en extractos de corteza y médula espinal comparando por género.** Comparación de los niveles de la proteína TDP-43 entre machos (n = 3) y hembras (n = 3) No-Tg en (A) corteza y (C) médula espinal; y también entre machos (n = 3) y hembras (n = 3) TDP-43<sup>A315T</sup> en (B) corteza y (D) médula espinal. (n.s. p > 0.05 prueba no paramétrica Mann-Whitney). Se utilizaron ratones de 80 días de vida.



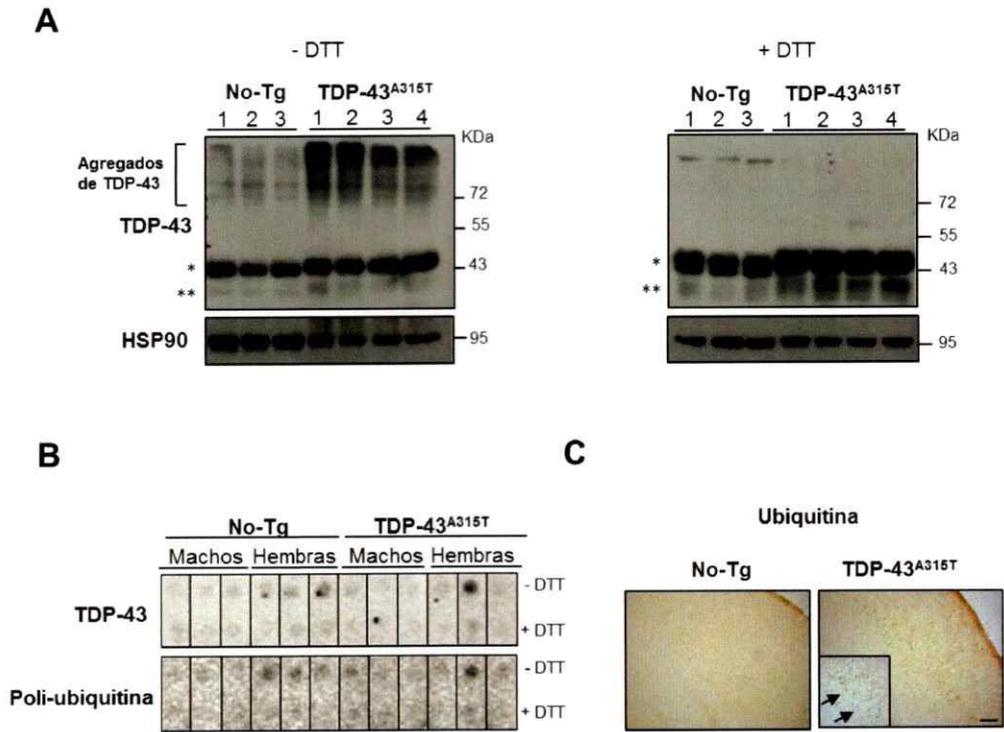
**Figura 10. Curvas de progresión de la enfermedad de los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> determinadas por parámetros de peso corporal y habilidades motoras. (A) Progresión promedio de peso corporal de los grupos experimentales transgénicos y no transgénicos. El peso corporal fue monitoreado 2 veces a la semana, empezando a la edad de 37 días de vida. Machos No-Tg (n = 11, curva azul), machos TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 16, curva roja), hembras No-Tg (n = 12, curva verde), hembras TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 9, curva morada). (B) Curvas de progresión promedio de habilidades motoras por prueba de *Hanging*. Los puntajes de esta evaluación fueron asignados con unidades arbitrarias (U.A.) dados ciertos parámetros de acuerdo al desempeño del animal (ver materiales y métodos). Machos No-Tg (n = 8, curva azul), machos TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 6, curva roja), hembras No-Tg (n = 9, curva verde), hembras TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 4, curva morada).**



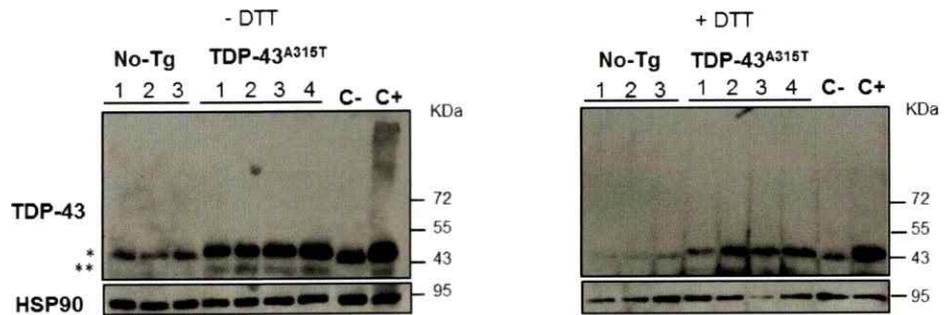
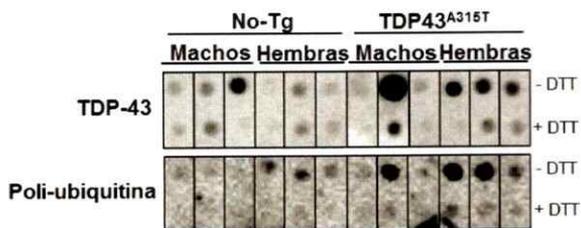
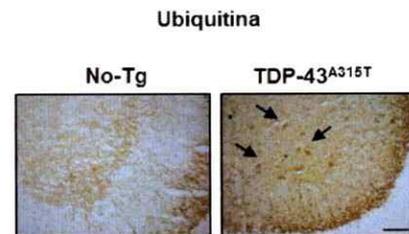
**Figura 11. Determinación del inicio y duración de la enfermedad en los ratones TDP-43<sup>A315T</sup>, separando por género.** (A) Inicio de los síntomas u *onset* los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> comparando por género. Se analizó cada curva individual de progresión de peso corporal (panel izquierdo) y desempeño motor por prueba de *Hanging* (panel derecho), y se promediaron por grupos experimentales. En el caso del análisis a partir del peso corporal, el *onset* se determinó como el día en que se midió una baja del 2,5% del máximo después de haber sido alcanzado. Por otro lado, a partir del análisis de desempeño en prueba de *Hanging*, el *onset* se determinó como el primer punto de la caída de la pendiente en cada curva individual. Machos TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 16), hembras TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 9). (\*\*\* p < 0,001 prueba t-Student no pareada; \* 0,01 < p < 0,05 prueba no paramétrica Mann-Whitney). (B) Duración de la enfermedad o síntomas evidentes en los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> comparando por género. Este período fue determinado como los días que abarcan entre el *onset* que presenta el animal y el día de su muerte. Machos TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 6), hembras TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 4). (n.s. p > 0,05 prueba t-student no pareada; n.s. p > 0,05 prueba no paramétrica Mann-Whitney).

## **6.2. Análisis bioquímico del tejido derivado del modelo TDP-43<sup>A315T</sup> en estadio sintomático terminal.**

Con el objetivo de evaluar si es que existe la presencia de especies oligoméricas de TDP-43, se realizó una caracterización bioquímica de extractos de tejido de corteza cerebral y médula espinal del modelo murino TDP-43<sup>A315T</sup> en estadio sintomático terminal por la técnica de Western Blot y Filter Trap (ver Materiales y Métodos). Para ambos tejidos y ambas técnicas, se corrieron muestras con DTT y sin DTT. El análisis mediante Western Blot permitió detectar especies de alto peso molecular sensibles a DTT en la corteza frontal de los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> (Figura 12A), sin embargo, en la médula espinal no fue posible detectarlas mediante este método (Figura 13A). Inesperadamente, cuando se analizaron las muestras a través de la técnica de "Filter Trap", técnica que permite la detección de proteínas de alto peso molecular, no se detectaron spots positivos en la corteza (Figura 12B), pero sí en la médula espinal para TDP-43 (Figura 13B). Así mismo, fue posible detectar la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas de alto peso molecular en la médula espinal (Figura 13B). En ambos tejidos, se detectaron inclusiones ubiquitinadas por la técnica de inmunohistoquímica (Figuras 12C y 13C). Estas inclusiones ubiquitinadas se detectaron en neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza (Figura 12C) y en motoneuronas del asta ventral de la médula espinal (Figura 13C). Con estos resultados es posible concluir que la expresión de TDP-43 mutante en el sistema nervioso de los animales induce la formación especies agregadas anormales de la proteína.



**Figura 12. Caracterización bioquímica de agregados proteicos en extractos de corteza de ratones TDP-43<sup>A315T</sup> sintomáticos. (A)** Ensayo de Western Blot para TDP-43 en extractos de proteína provenientes de corteza de animales TDP-43<sup>A315T</sup> y controles No-Tg, realizado en condiciones no reductoras (-DTT) y reductoras (+DTT, a una concentración 100 mM). Edades ratones machos No-Tg: 80, 63 y 72 días. Edades ratones machos TDP43<sup>A315T</sup> = 59, 68, 72 y 71. (\* = TDP-43 endógena, \*\* = fragmento de 35 KDa de TDP-43). **(B)** Ensayo de Filter Trap para TDP-43 y especies poli-ubiquitinadas en extractos de proteína provenientes de corteza de animales TDP-43<sup>A315T</sup> y controles No-Tg, realizado en condiciones reductoras (+DTT, a una concentración 100 mM) y no reductoras (-DTT). Edades ratones machos No-Tg: 80, 63 y 72 días. Edades ratones hembras No-Tg: 102, 171 y 106 días de vida. Edades ratones machos TDP-43<sup>A315T</sup> = 59, 68 y 72 días. Edades ratones hembras TDP-43<sup>A315T</sup> = 99, 171 y 106 días. **(C)** Detección de proteínas ubiquitinadas por técnica de inmunohistoquímica en la capa 5 de la corteza de animales TDP-43<sup>A315T</sup> (Barra = 200  $\mu$ M). Edad ratones machos No-Tg y TDP-43<sup>A315T</sup> = 88 días.

**A****B****C**

**Figura 13. Caracterización bioquímica de agregados proteicos en extractos de médula espinal de ratones TDP-43<sup>A315T</sup> sintomáticos. (A)** Ensayo de Western Blot para TDP-43 en extractos de proteína provenientes de médula espinal de animales TDP-43<sup>A315T</sup> y controles No-Tg, realizado en condiciones reductoras (+DTT, a una concentración 100 mM) y no reductoras (-DTT). (\* = TDP-43 endógena, \*\* = fragmento de 35 KDa de TDP-43). Control negativo (C-) = extracto de corteza de animal No-Tg Control positivo (C+) = extracto de corteza de animal TDP-43<sup>A315T</sup> sintomático. Edades ratones machos No-Tg: 80, 63 y 72 días. Edades ratones machos TDP43<sup>A315T</sup> = 59, 68, 72 y 71. **(B)** Ensayo de Filter Trap para TDP-43 y especies poli-ubiquitinadas en extractos de proteína provenientes de médula espinal de animales TDP-43<sup>A315T</sup> y controles No-Tg, realizado en condiciones reductoras (+DTT, a una concentración 100 mM) y no reductoras (-DTT). Edades ratones machos No-Tg: 80, 63 y 72 días. Edades ratones hembras No-Tg: 102, 171 y 106 días de vida. Edades ratones machos TDP-43<sup>A315T</sup> = 59, 68 y 72 días. Edades ratones hembras TDP-43<sup>A315T</sup> = 99, 171 y 106 días. **(C)** Detección de proteínas ubiquitinadas por técnica de inmunohistoquímica en motoneuronas del asta ventral de la médula espinal de animales TDP-43<sup>A315T</sup> (Barra = 100  $\mu$ m). Edad ratones machos No-Tg y TDP-43<sup>A315T</sup> = 88 días.

### **6.3. Análisis de los niveles de activación de la UPR en tejido derivado del modelo TDP-43<sup>A315T</sup> en estadio sintomático terminal.**

Dado que fue posible detectar agregados e inclusiones ubiquitinadas de TDP-43 tanto en corteza como en médula espinal de los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> en estadio sintomático terminal, se evaluaron marcadores de la UPR y de estrés de RE como *Xbp1s*, *Xbp1t*, *Atf4*, *Edem* y *Chop* por la técnica de RT-qPCR en extractos de estos tejidos. Se evaluaron tejidos de machos (n = 3) y hembras (n = 3) incluidos todos en el mismo grupo por genotipo (n = 6 por grupo). Inesperadamente, se obtuvo una disminución significativa de la expresión de la mayoría estos genes en la corteza de los ratones transgénicos (Figuras 14A, 14B, 14C y 14D). En el caso de la médula espinal, no se observaron variaciones en la mayor parte de los genes analizados (Figuras 15A, 15B, 15C, 15D y 15E). Estos resultados fueron sorprendentes debido a que no se observó activación de la UPR, como estaba documentada en otros modelos de ELA (Atkin et al., 2006; Hetz et al., 2009; Kiskinis et al., 2014; Naujock et al., 2016; Saxena et al., 2009).

### **6.4. Evaluación de la capacidad de respuesta frente al estrés de RE del modelo TDP-43<sup>A315T</sup>**

Dado que se observaron niveles disminuidos de blancos de la UPR en los animales TDP-43<sup>A315T</sup> a nivel basal, se quiso conocer cómo este modelo *in vivo* respondería a una condición de estrés de RE experimental. Para establecer tal condición, se realizó una estandarización de inyecciones intraperitoneales de

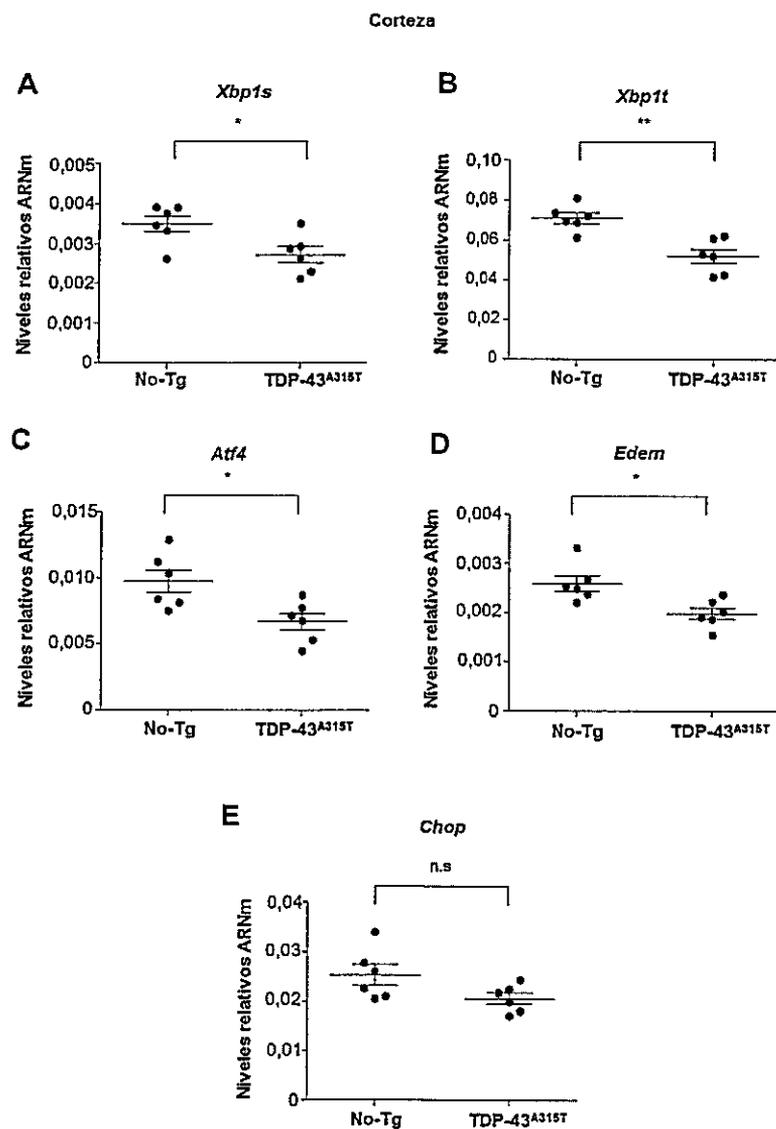


Figura 14. Medición de la expresión basal de marcadores de la UPR a nivel transcripcional en extractos de corteza de ratones TDP-43<sup>A315T</sup> sintomáticos. Ensayo de RT-qPCR para los marcadores *Xbp1s* (A), *Xbp1t* (B), *Atf4* (C), *Edem* (D) y *Chop* (E) a partir de extractos de médula espinal de animales No-Tg (n = 6) y TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 6) en estadio sintomático terminal. Se utilizaron tejidos de machos y hembras para cada genotipo. (n.s. p > 0,05 prueba t-student no pareada).

Médula espinal

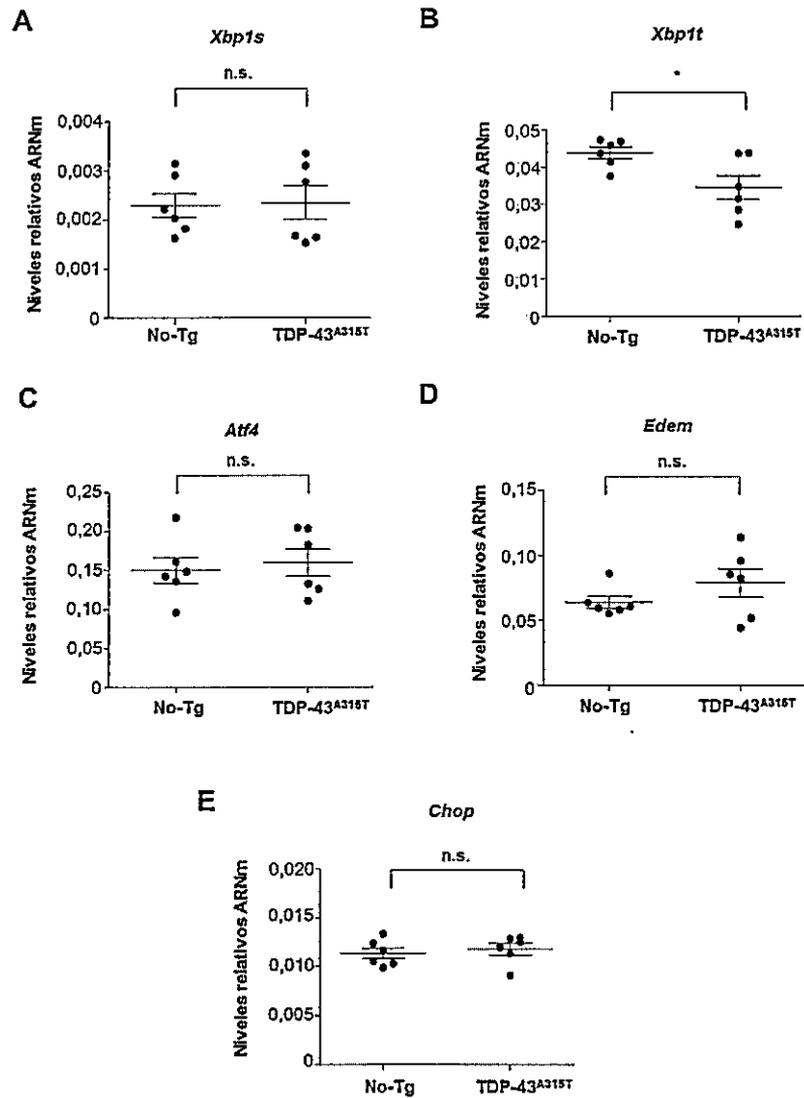
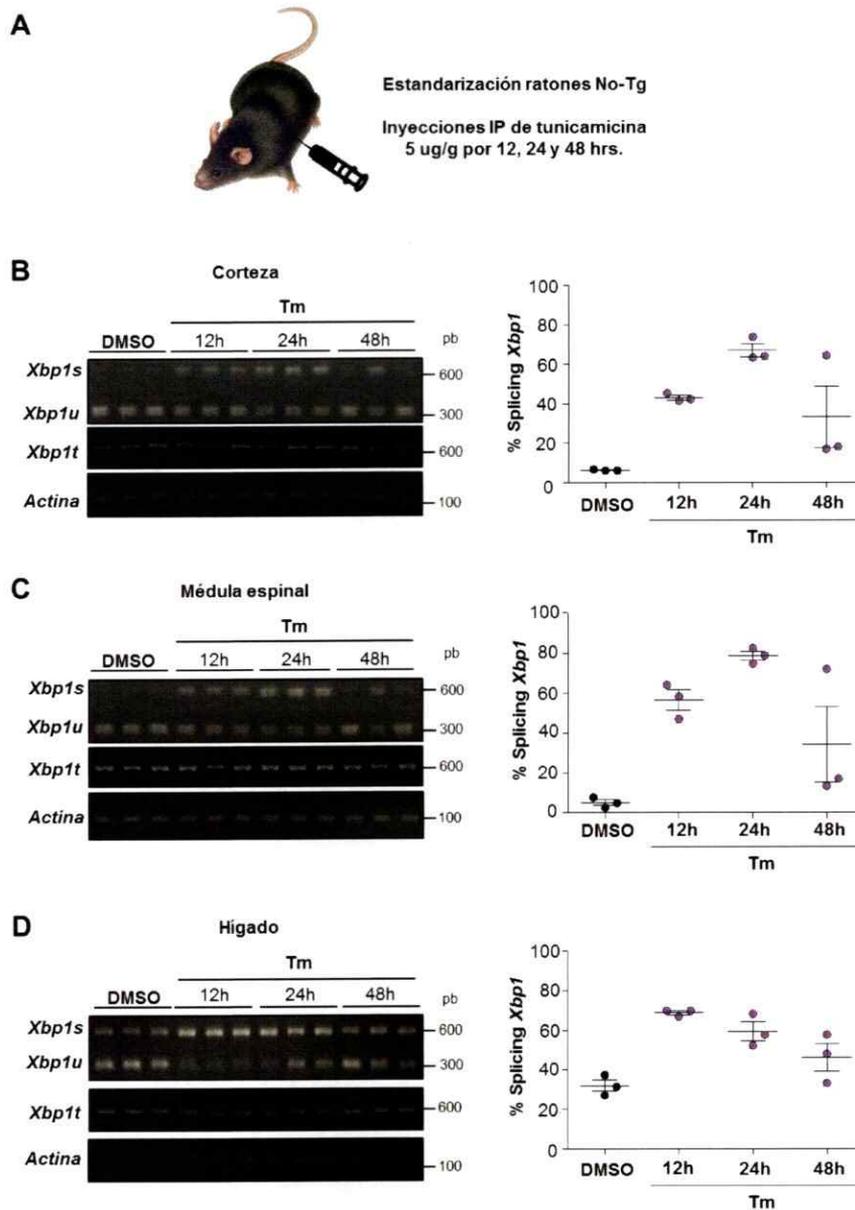


Figura 15. Medición de la expresión basal de marcadores de la UPR a nivel transcripcional en extractos de médula espinal de ratones TDP-43<sup>A315T</sup> sintomáticos. Ensayo de RT-qPCR para los marcadores *Xbp1s* (A), *Xbp1t* (B), *Atf4* (C), *Edem* (D) y *Chop* (E) a partir de extractos de médula espinal de animales No-Tg (n = 6) y TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 6) en estadio sintomático terminal. Se utilizaron tejidos de machos y hembras para cada genotipo. (n.s. p > 0,05 prueba t-student no pareada).

tunicamicina (Tm) a una concentración de 5 µg/g en ratones No-Tg (Figura 16A). La tunicamicina es un compuesto que inhibe la N-glicosilación de las proteínas y su administración conduce a una condición de estrés de RE y como consecuencia a la activación de la UPR debido a la acumulación de proteínas mal plegadas en este organelo (Osowski y Urano, 2011). Se probaron distintos tiempos de tratamiento con la droga (12, 24 y 48 h), además de controles de inyección con DMSO por 48 h (Figura 16A). Se evaluó la expresión a nivel transcripcional del factor *Xbp1s*, a través de un ensayo de procesamiento o *splicing* del ARNm que codifica para este factor (ver Materiales y Métodos). Este ensayo es un método semicuantitativo que permitió detectar la banda de PCR que corresponde a *Xbp1s* (procesado o *spliced*) en 600 pb y a *Xbp1u* (no procesado o *unspliced*) en 300 pb (Figuras 16B, 16C y 16D). Se observó que 24 h post inyección con tunicamicina se generó un mayor porcentaje de *splicing* de *Xbp1* en la corteza y la médula espinal de los ratones No-Tg, en comparación a las condiciones 12 h y 48 h post tratamiento (Figuras 16B y 16C). Se evaluó el porcentaje de *splicing* del ARN de *Xbp1* en hígado como experimento control para asegurar que la tunicamicina produjo el efecto esperado (Figura 16D).

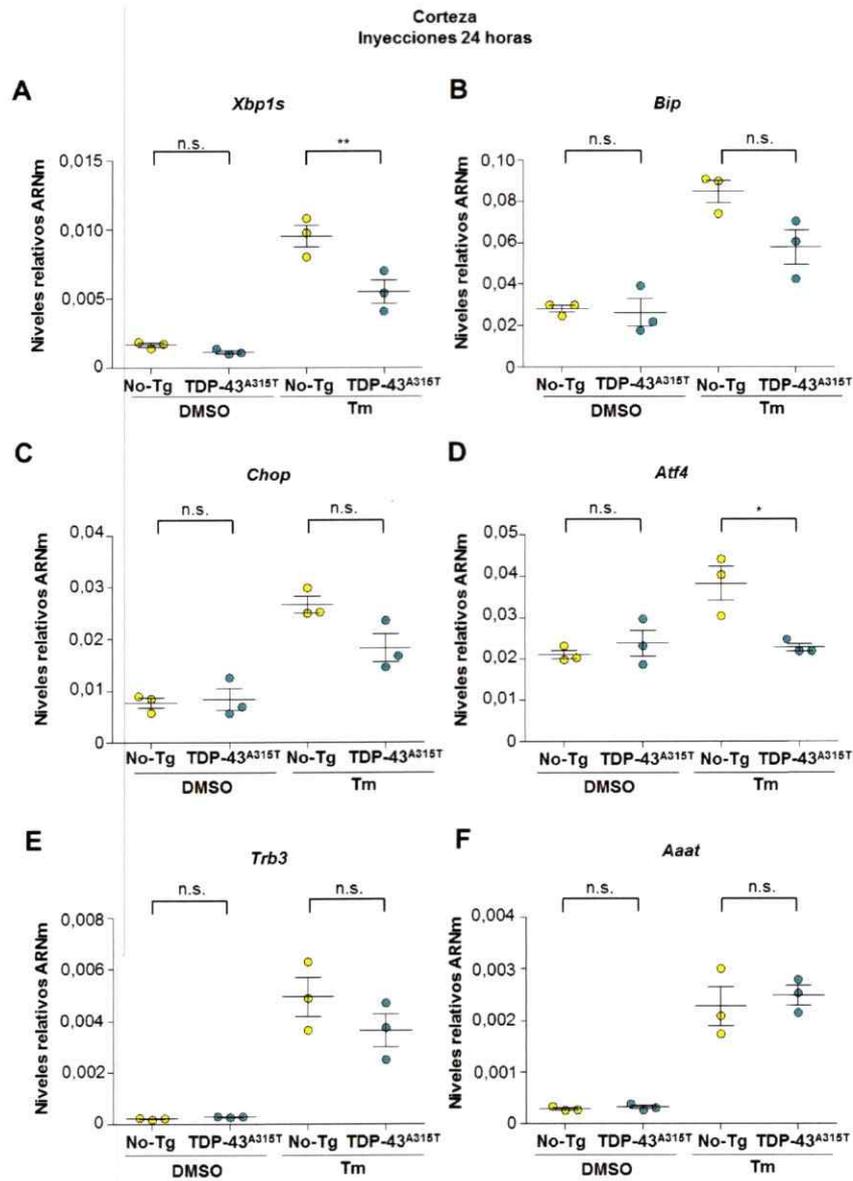
Debido a los resultados obtenidos en la estandarización de inyecciones intraperitoneales con tunicamicina, se evaluó la respuesta a una condición de estrés de RE en los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> inyectando la droga por 24 h. Se utilizaron machos de 70 días de vida, lo cual representa una etapa sintomática temprana, y controles No-Tg de la misma edad. En cada grupo, se inyectaron animales con tunicamicina y otros con DMSO como control de tratamiento. Se evaluaron los niveles transcripcionales de diversos marcadores de la UPR mediante RT-qPCR, como son



**Figura 16. Estandarización de la inyección intraperitoneal de la droga tunicamicina en ratones No-Tg.** (A) Esquema que muestra el diseño experimental de la estandarización de la inyección intraperitoneal de tunicamicina (Tm) a una concentración de 5  $\mu\text{g/g}$  con distintos tiempos de tratamiento (12, 24 y 48 h,  $n = 3$  de cada uno), más controles tratados con DMSO por 48 h ( $n = 3$ ). Se realizó un análisis del procesamiento (*splicing*) del ARNm de *Xbp1* a través de la amplificación de los transcritos totales de *Xbp1* por RT-PCR, seguido por la digestión del producto con la enzima PstI (ver materiales y métodos) en extractos de (B) corteza, (C) médula espinal e (D) hígado. La banda de 600 pb corresponde a los niveles de transcrito de *Xbp1s* (spliced o procesado) y la de 300 pb a los de *Xbp1u* (unspliced o no procesado) y se cuantificó la señal de estas bandas para obtener el porcentaje de *splicing* de *Xbp1*.

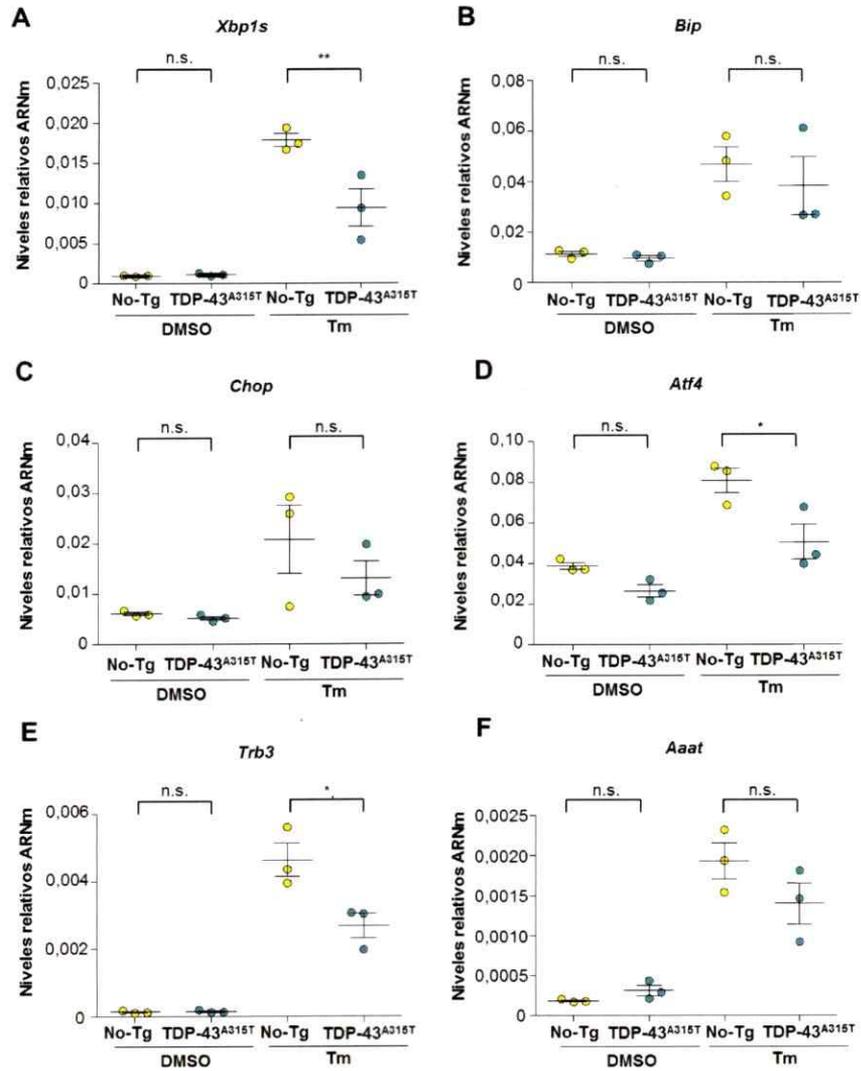
*Xbp1s*, *Bip*, *Chop* y *Atf4* en extractos de la corteza (Figuras 17A, 17B, 17C y 17D) y la médula espinal (Figuras 18A, 18B, 18C y 18D). Interesantemente, se observó una menor inducción de los marcadores *Xbp1s* y *Atf4* en la corteza (Figuras 17A y 17D) y la médula espinal (Figuras 18A y 18D) de los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> inyectados con tunicamicina respecto a la activación mostrada por los controles No-Tg. Además, se obtuvo una tendencia de esta misma observación en los marcadores *Bip* y *Chop* en la corteza (Figuras 17B y 17C). Por otro lado, se evaluaron los niveles de expresión de *Trb3* y *Aaat* en la corteza y la médula espinal (Figuras 17E, 17F, 18E, 18F), dos blancos específicos del factor de transcripción *Atf4*. *Trb3* es un gen que se induce por estrés de RE y ha sido involucrado en muerte celular (Ohoka et al., 2005). *Aaat* es un gen que codifica para una proteína transmembrana de RE y tiene función como transportador de aminoácidos (Harding et al., 2003). Se observó una menor inducción en *Trb3* en extractos de médula espinal (Figura 18E) y la misma tendencia en corteza (Figura 17E), nuevamente en los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> inyectados con tunicamicina en comparación con sus hermanos controles. En cuanto a *Aaat*, no se observaron diferencias en la corteza de los animales inyectados con tunicamicina entre ambos genotipos (Figura 17F), y se detectó una tendencia de menor inducción en la médula espinal de los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> inyectados con tunicamicina (Figura 18F).

Como control de este experimento, se midieron los niveles transcripcionales de *Xbp1s*, *Bip* y *Atf4* en extractos de hígado del grupo de animales inyectados (Figura 19), debido a que el modelo TDP-43<sup>A315T</sup> no expresa la proteína mutante en este tejido (Wegorzewska et al., 2009). Como se esperaba, el hígado de ratones



**Figura 17.** Análisis de la expresión de marcadores de la UPR en extractos de corteza de animales TDP-43<sup>A315T</sup> inyectados intraperitonealmente con tunicamicina. Se realizaron inyecciones intraperitoneales en machos TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 3) y controles No-Tg (n = 3) de 70 días con Tm (5 µg/g) y la misma cantidad de animales con DMSO. Luego de 24 h se sacrificaron los animales y se evaluaron los niveles de transcrito de (A) *Xbp1s*, (B) *Bip*, (C) *Chop*, *Atf4* (D), *Trb3* (E) y *Aa1* (F) en extractos de corteza de estos animales inyectados. (\*\* 0,001 < p < 0,01; \* 0,01 < p < 0,05; n.s. p > 0,05 ANOVA de una vía con post-prueba de Bonferroni).

Médula espinal  
Inyecciones 24 horas



**Figura 18.** Análisis de la expresión de marcadores de la UPR en extractos de médula espinal de animales TDP-43<sup>A315T</sup> inyectados intraperitonealmente con tunicamicina. Se realizaron inyecciones intraperitoneales en machos TDP-43<sup>A315T</sup> (n = 3) y controles No-Tg (n = 3) de 70 días con Tm (5 µg/g) y la misma cantidad de animales con DMSO. Luego de 24 h se sacrificaron los animales y se evaluaron los niveles de transcrito de (A) *Xbp1s*, (B) *Bip*, (C) *Chop*, *Atf4* (D), *Trb3* (E) y *Aaaf* (F) en extractos de corteza de estos animales inyectados. (\*\* 0,001 < p < 0,01; \* 0,01 < p < 0,05; n.s. p > 0,05 ANOVA de una vía con post-prueba de Bonferroni).

Hígado  
Inyecciones 24 horas

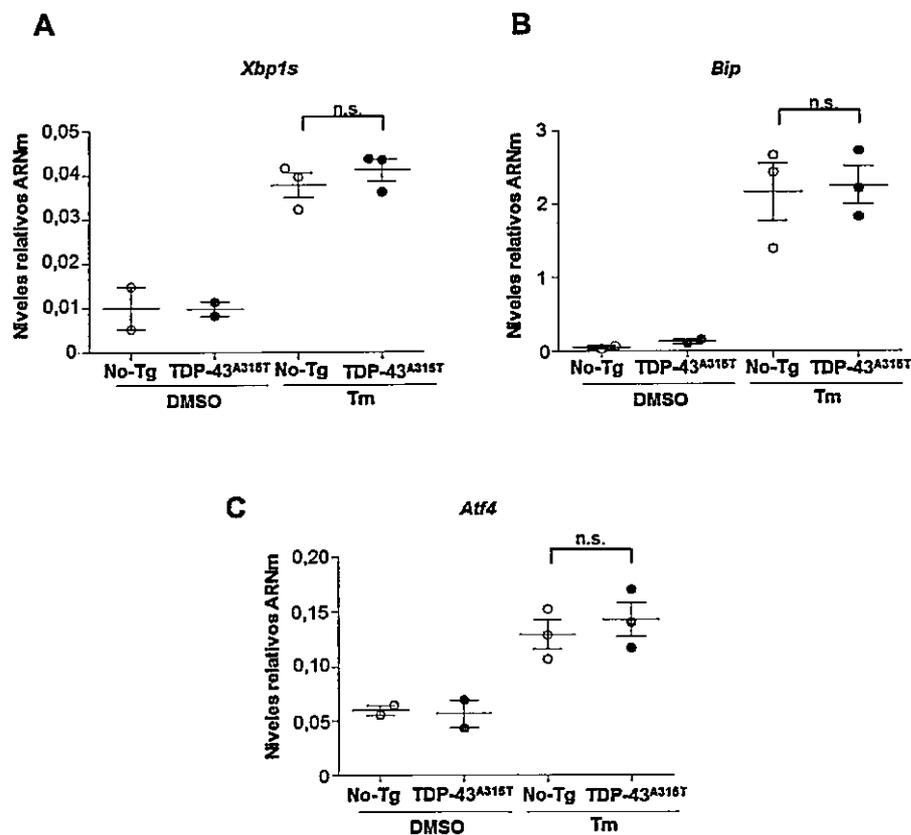
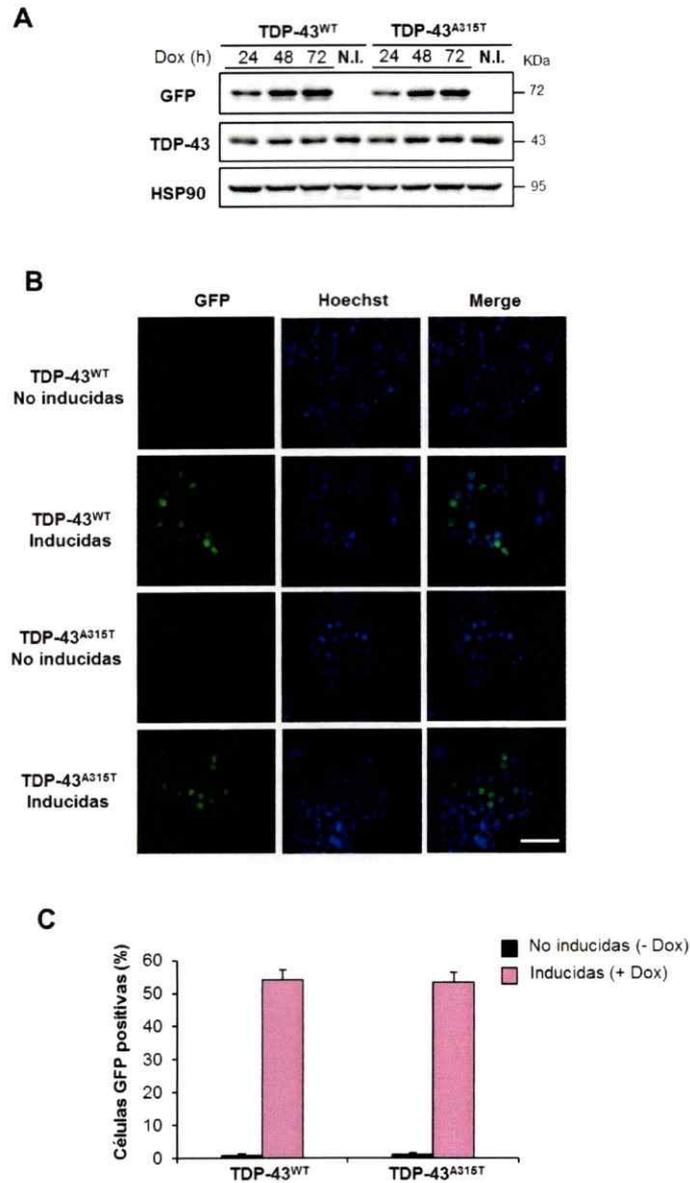


Figura 19. Análisis de la expresión de marcadores de la UPR en extractos de hígado de animales TDP-43<sup>A315T</sup> inyectados Intraperitonealmente con tunicamicina. Se evaluaron los niveles de transcrito de (A) *Xbp1s*, (B) *Bip*, (C) *Chop* en extractos de hígado de los animales inyectados de acuerdo al diseño experimental descrito en la figura 17 y 18 (n = 2 en los grupos tratados con DMSO y n = 3 en los grupos tratados con Tm). (n.s. p > 0,05 prueba t-Student no pareada).

TDP-43<sup>A315T</sup> y No-Tg responden de igual manera a la condición de estrés de RE producida por la inyección con tunicamicina, debido a que ninguno de los genes evaluados en los animales transgénicos varió sus niveles con respecto a sus controles (Figuras 19A, 19B, 19C). Estos resultados revelan que los animales TDP-43<sup>A315T</sup> presentan una respuesta atenuada a la condición de estrés de RE en el sistema nervioso.

#### **6.5. Evaluación de la capacidad de respuesta de un modelo *in vitro* de TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> frente a una condición de estrés de RE.**

Dados los resultados obtenidos en los ratones transgénicos TDP-43<sup>A315T</sup> descritos en la sección anterior, se quiso indagar en un contexto celular de la proteinopatía de TDP-43 cómo es la respuesta a una condición de estrés de RE. Se generaron líneas estables de células NSC34 que expresan de forma inducible la proteína TDP-43 humana en su forma *wild type* (WT) y con la mutación A315T, ambas variantes fusionadas a GFP (ver Materiales y Métodos). La inducción de la expresión de las construcciones genéticas se generó a partir de un tratamiento con la droga doxiciclina a una concentración de 100 ng/mL (ver Materiales y Métodos). Como estandarización de las líneas celulares, se incubaron las células con doxiciclina por distintos tiempos (24, 48 y 72 h) para evaluar las condiciones óptimas de inducción. Se observó que a las 72 h de inducción con esta droga hubo mayor expresión de la TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup>, analizando los niveles proteicos de GFP por técnica de Western Blot, utilizando un anticuerpo anti-GFP (Figura 20A). Este resultado se pudo corroborar por microscopía de fluorescencia (Figura 20B). Se determinó, a partir de la utilización de microscopía automatizada a gran escala, que



**Figura 20. Caracterización de las líneas estables inducibles NSC34 que expresan la forma humana de TDP-43 WT y con la mutación A315T. (A)** Ensayo de Western Blot que muestra la expresión de TDP-43 fusionada al reportero GFP en ambas líneas estables (TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup>), detectada con un anticuerpo anti-GFP. Se realizó el análisis en distintos tiempos de incubación con la droga doxiciclina 100 ng/mL (24, 48 y 72 h) y se agregaron controles no inducidos en ambas líneas (N.I.). Se utilizó el anticuerpo anti-TDP-43 para detectar la proteína endógena y anti-HSP90 como control de carga. **(B)** Imágenes que muestran por microscopía de fluorescencia la expresión del reportero GFP en las líneas NSC34 TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> luego de una inducción de 72 h con doxiciclina (Barra = 25  $\mu$ m) **(C)** Cuantificación de células GFP positivas por medio de microscopía automatizada a gran escala en las líneas NSC34 TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup>, luego de 72 h de tratamiento con doxiciclina (n = 4).

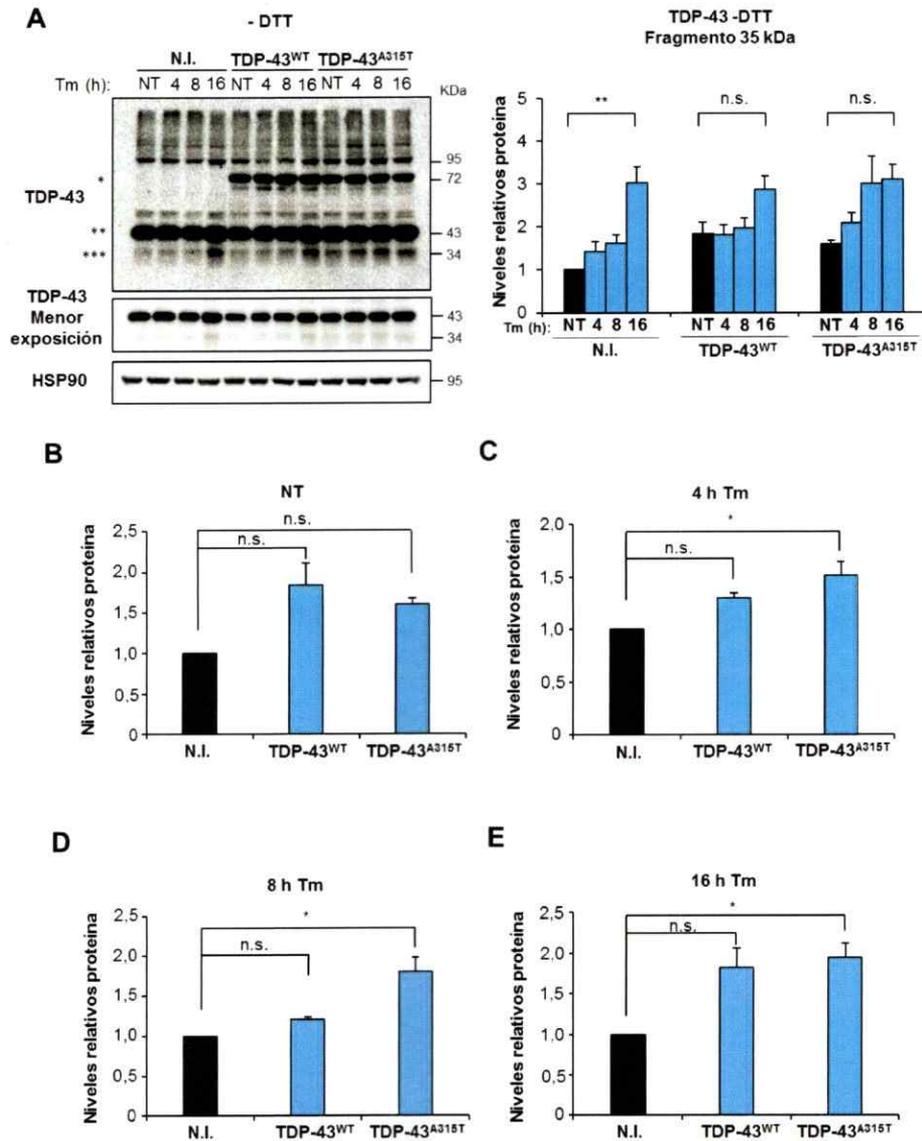
luego de 72 h de inducción con doxiciclina se obtiene un aproximadamente un 55% de células GFP positivas en ambas líneas celulares (Figura 20C).

Una vez caracterizadas las líneas TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> se procedió a establecer un protocolo experimental de generación de estrés de RE mediante un tratamiento con tunicamicina. Se indujeron ambas líneas celulares con doxiciclina (100 ng/mL) por 72 h y luego se realizó una cinética de tratamiento con tunicamicina (500 ng/mL) por 4, 8 y 16 h, además de condiciones no tratadas. Como control, Se realizó esta misma cinética con una línea celular sin inducir con doxiciclina. Como primera aproximación, se quiso saber si la inducción del estrés de RE podría afectar la agregación de TDP-43. Para esto se analizaron extractos de proteína de estas células tratadas a través de la técnica de Western Blot utilizando un anticuerpo que reconoce la forma humana y murina de TDP-43 (Figuras 21 y 22). Se analizaron los extractos proteicos de las células en condiciones no reductoras y reductoras (Figuras 21 y 22). No se observaron grandes diferencias en el patrón de los agregados de TDP-43 en las muestras sin DTT. Sin embargo, en estas mismas muestras fue posible detectar claras diferencias en la fragmentación de TDP-43, lo cual fue observado por el aumento de los niveles en la banda de 35 KDa (Figura 21A). La fragmentación de TDP-43 y otras modificaciones post-traduccionales como hiperfosforilación y ubiquitinación han sido asociadas a condiciones de toxicidad en el contexto anómalo de la proteinopatía de TDP-43 (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006).

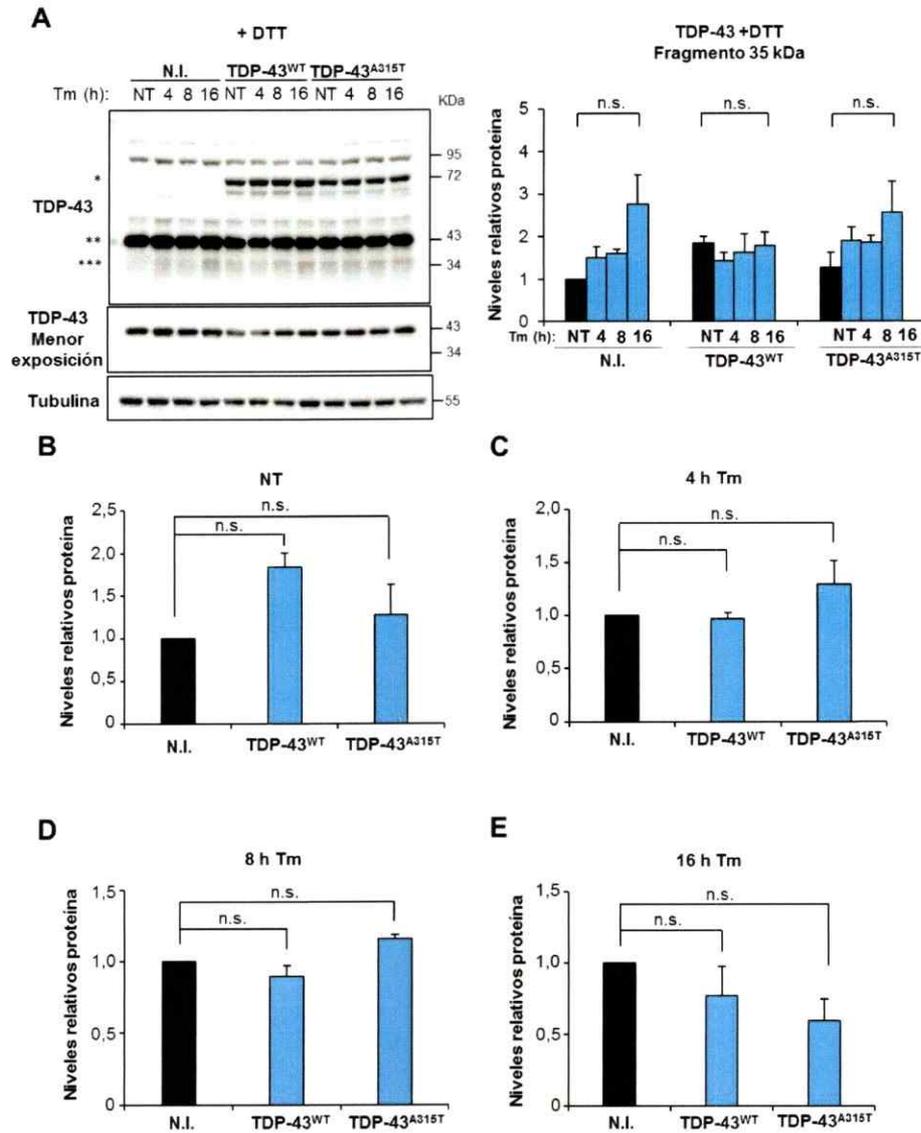
Se cuantificó la señal del fragmento de 35 KDa de TDP-43 en las cinéticas generadas en las 3 condiciones experimentales (no inducidas, TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-

43<sup>A315T</sup>). Se observó en las células no inducidas con doxiciclina un aumento de la fragmentación de TDP-43 a las 16 h de tratamiento con tunicamicina, analizando las muestras de proteínas en condiciones no reductoras (-DTT) (Figura 21A). Se detectó la misma tendencia en este patrón de fragmentación en las células TDP-43<sup>WT</sup> respecto a la cinética de tunicamicina, pero un poco más atenuada ya que las diferencias en la cuantificación entre la condición basal y a las 16 h de tratamiento con tunicamicina no alcanzaron a ser significativas (Figura 21A). Interesantemente, se observó una fragmentación de TDP-43 endógena en condiciones basales y de tratamiento con tunicamicina por 4 y 8 h, cuando se expresa la TDP-43 con la mutación A315T (Figura 21A). Se compararon las cuantificaciones de los fragmentos de 35 KDa de las células que expresan TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> con el control no inducido (N.I.), separando por el tiempo de tratamiento con el estresor (Figuras 21B, 21C, 21D, 21E). Con este análisis fue posible detectar un aumento en la fragmentación de TDP-43 endógena en las células que expresan la mutante tratadas por 4, 8 y 16 h con tunicamicina, y una tendencia al alza en la condición no tratada (NT) (Figuras 21B, 21C, 21D, 21E). Con respecto a la expresión de TDP-43<sup>WT</sup>, se vio que hay tendencias de aumento en la fragmentación, pero nada significativo. Por lo tanto, con este resultado se puede concluir que la expresión de TDP-43<sup>A315T</sup> induce basalmente la fragmentación de TDP-43 endógena.

Por otro lado, no se observaron cambios claros en el patrón de fragmentación de TDP-43 en las muestras de proteínas preparadas con DTT (Figura 22A). Tampoco se observaron diferencias significativas entre las 3 condiciones experimentales, al comparar por separado los niveles del fragmento de TDP-43 en



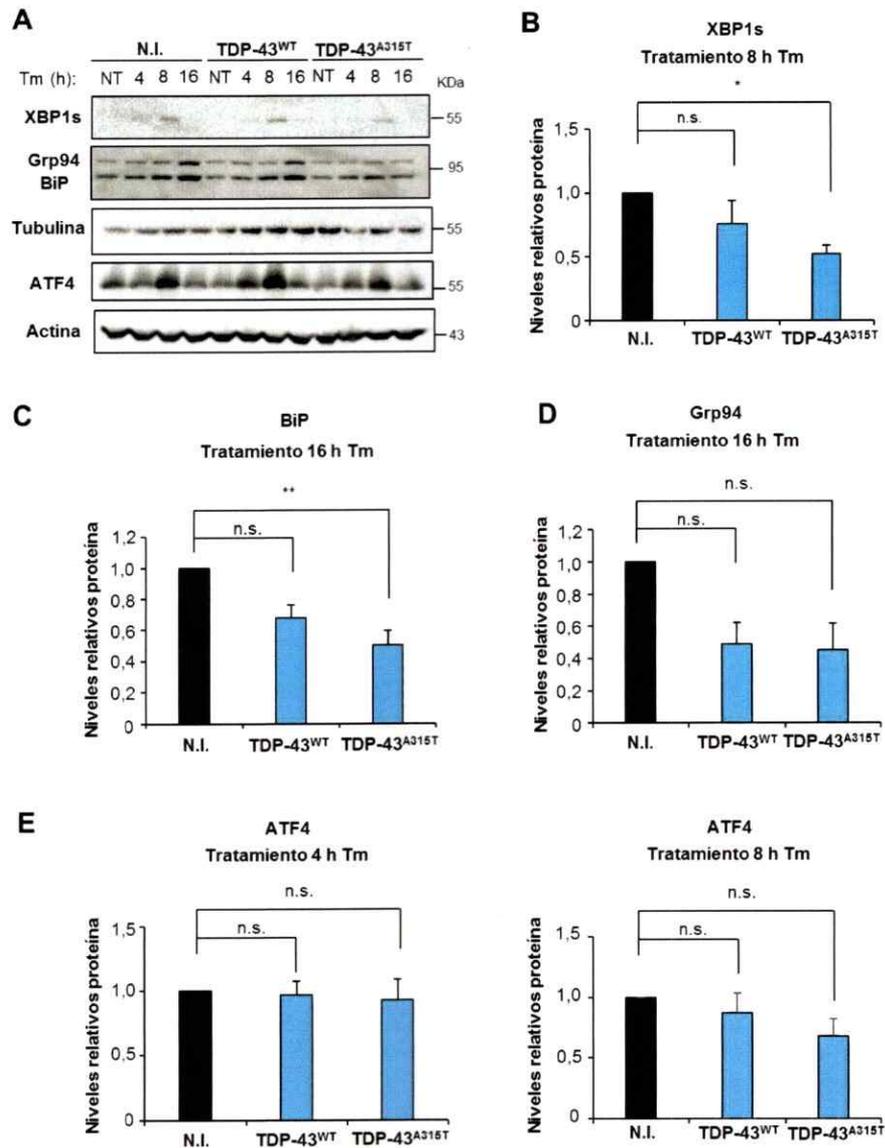
**Figura 21. Análisis bioquímico de la fragmentación de TDP-43 en las líneas estables NSC34 TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> en condiciones de estrés de RE, con muestras proteicas en condiciones no reductoras (-DTT).** (A) Se realizó un ensayo de Western Blot con extractos de proteína de las líneas NSC34 TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> inducidas 72 horas con doxiciclina 100 ng/mL, más control de una línea sin doxiciclina (no inducida, N.I.). Luego de este tratamiento se realizó una cinética de tunicamicina (Tm) 500 ng/mL a distintos tiempos (4, 8 y 16 h) y un control no tratado (NT). Se cuantificó la señal del fragmento de 35 KDa y se comparó dentro la misma condición experimental. También se comparó esta señal en los distintos tiempos de tratamiento con tunicamicina, pero comparando las distintas condiciones experimentales (no inducidas, TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup>). Tomando como control la condición no inducida (N.I.), se evaluaron las diferencias en el (A) contexto basal y a las (C) 4, (D) 8 y (E) 16 h de tratamiento con tunicamicina. (\* = expresión de TDP-43<sup>WT/A315T</sup> fusionada a GFP; \*\* = TDP-43 endógena; \*\*\* = fragmento de 35 KDa de TDP-43) (\*\* 0,001 < p < 0,01; n.s. p > 0,05 ANOVA de una vía con post-prueba de Bonferroni).



**Figura 22. Análisis bioquímico de la fragmentación de TDP-43 en las líneas estables NSC34 TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> en condiciones de estrés de RE, con muestras proteicas en condiciones reductoras (+DTT).** (A) Se realizó un ensayo de Western Blot con extractos de proteína de las líneas NSC34 TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> inducidas 72 horas con doxiciclina 100 ng/mL, más control de una línea sin doxiciclina (no inducida, N.I.). Luego de este tratamiento se realizó una cinética de tunicamicina (Tm) 500 ng/mL a distintos tiempos (4, 8 y 16 h) y un control no tratado (NT). Se cuantificó la señal del fragmento de 35 KDa y se comparó dentro la misma condición experimental. También se comparó esta señal en los distintos tiempos de tratamiento con tunicamicina, pero comparando las distintas condiciones experimentales (no inducidas, TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup>). Tomando como control la condición no inducida (N.I.), se evaluaron las diferencias en el (A) contexto basal y a las (C) 4, (D) 8 y (E) 16 h de tratamiento con tunicamicina. (\* = expresión de TDP-43<sup>WT/A315T</sup> fusionada a GFP; \*\* = TDP-43 endógena; \*\*\* = fragmento de 35 KDa de TDP-43) (\*\* 0,001 < p < 0,01; n.s. p > 0,05 ANOVA de una vía con post-prueba de Bonferroni).

los distintos tiempos de tratamiento con tunicamicina (Figura 22B, 22C, 22D, 22E). Esto podría deberse a diferencias en la exposición de epítopo o problemas en la etapa de transferencia de la técnica de Western Blot.

Para evaluar la capacidad de respuesta a una condición de estrés de RE en este modelo *in vitro*, se midió la expresión de marcadores de la UPR en estas mismas líneas celulares tratadas con tunicamicina por distintos tiempos (4, 8 y 16 h) y el control no tratado (NT). Se analizó la expresión de las proteínas XBP1, BiP, Grp94 y ATF4 en las células no inducidas con doxiciclina (N.I.), TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> por la técnica de Western Blot (Figura 23). Las comparaciones en la cuantificación de las señales se realizaron en los tiempos de tratamiento en que se observó activación en cada caso (Figuras 23B, 23C, 23D). Se detectó una disminución significativa de la expresión de XBP1 en las células TDP-43<sup>A315T</sup> a las 8 h de tratamiento con tunicamicina comparando con las células no inducidas (N.I.) (Figuras 23A, 23B). También se observó este fenómeno en los niveles de BiP (Figuras 23A, 23C) y una tendencia en Grp94 (Figuras 23A, 23D), ambos a las 16 h de tratamiento. En el caso del análisis de expresión de ATF4, se cuantificó a las 4 y 8 h de tratamiento con tunicamicina, que fueron los tiempos en los cuales se observó un aumento en los niveles (Figuras 23A, 23E). No se observaron cambios en los niveles de ATF4 a las 4 h de tratamiento en las células TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> con respecto a las N.I., pero se observó una leve tendencia a la baja en las células TDP-43<sup>A315T</sup> a las 8 h de tratamiento con tunicamicina.



**Figura 23. Evaluación de marcadores de la UPR a nivel proteico en las líneas estables inducibles NSC34 TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup>.** Se realizó la misma cinética con la droga tunicamicina (Tm) en las líneas TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> inducidas previamente con doxiciclina por 72 horas y una línea no inducida (N.I.) como control. **(A)** Detección de distintos marcadores de UPR a nivel proteico por técnica de Western Blot (XBP1, BiP, Grp94 y ATF4). Se cuantificaron las señales que representan los niveles de expresión en las horas de tratamiento con Tm en que se observa activación. En el caso de XBP1 (n = 4) **(B)** se cuantificó a las 8 horas de estimulación, de BiP (n = 3) **(C)** y Grp94 (n = 3) **(D)** a las 16 horas de estimulación, y de ATF4 (n = 3) **(E)** a las 4 y 8 horas de estimulación. (\*\* 0,001 < p < 0,01; \* 0,01 < p < 0,05; n.s. p > 0,05 ANOVA de una vía con post-prueba de Bonferroni).

Estas últimas observaciones, en concordancia en los datos obtenidos en los animales TDP-43<sup>A315T</sup>, abren la pregunta acerca de una posible alteración en el RE en el contexto de la proteinopatía de TDP-43. Por esto, se realizó una observación a grandes rasgos del estado del RE en las células TDP-43<sup>WT</sup>, TDP-43<sup>A315T</sup> y no inducidas mediante una inmunofluorescencia (Figuras 24, 25). Para marcar el RE se utilizó un anticuerpo anti-ERp72, una chaperona que se expresa en el lumen de este organelo. Se estableció la condición experimental con la inducción de 72 h con doxiciclina (100 ng/mL) seguido de un tratamiento con tunicamicina (500 ng/mL) por 16 h, con sus respectivos controles no inducidos y no tratados (Figuras 24, 25). En el caso de las líneas inducidas con doxiciclina se pudo detectar tanto a la TDP-43<sup>WT</sup> como la TDP-43<sup>A315T</sup> con la señal de GFP, y en general con una localización nuclear. Con el tratamiento con tunicamicina se observó que los niveles de ERp72 aumentan en ambas líneas, sin embargo, no se detectaron diferencias sustanciales en la morfología del RE comparando con los controles no inducidos con doxiciclina (Figuras 24, 25).

Finalmente, dado que TDP-43 regula la expresión génica en el núcleo, se analizó si esta proteína podría reprimir de forma directa la transcripción de genes relacionados con la UPR. Para esto se co-transfectaron de forma transiente células NSC34 con plásmidos que codifican para las variantes de TDP-43 (WT y A315T), XBP1s y un constructo reportero de UPR que contiene una secuencia conservada llamada UPRE (de la sigla en inglés *Unfolded Protein Response Element*) acoplada a actividad luciferasa (Figura 26). UPRE es una secuencia consenso presente en varios genes de respuesta a estrés de RE, y se ha identificado como un elemento de

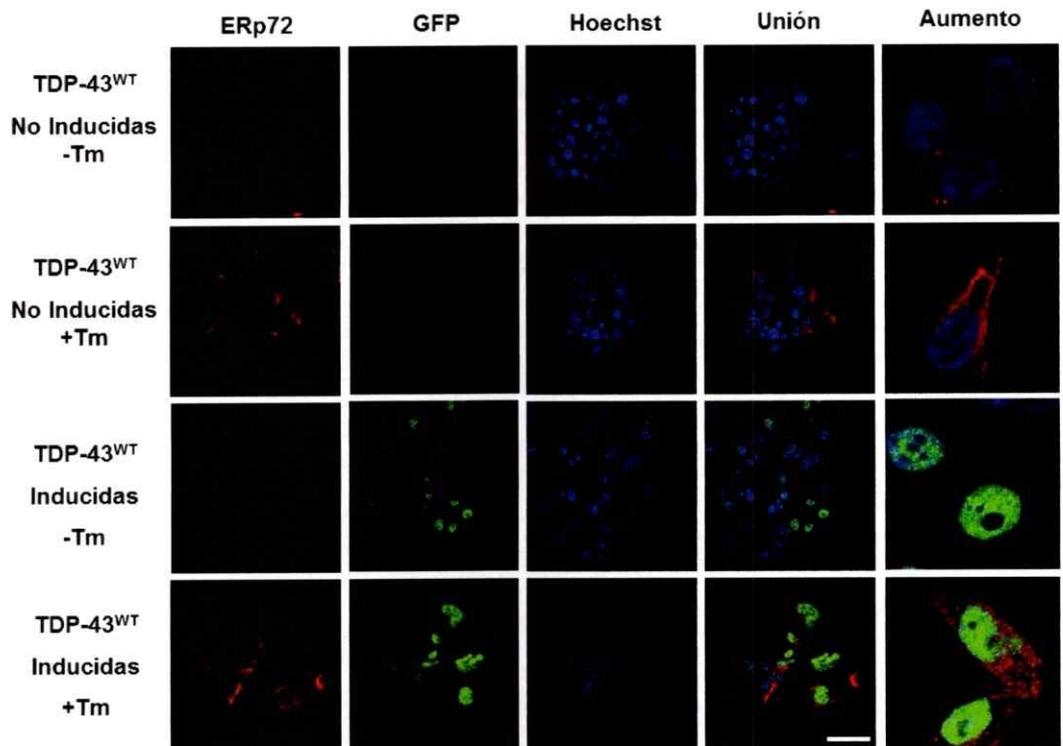
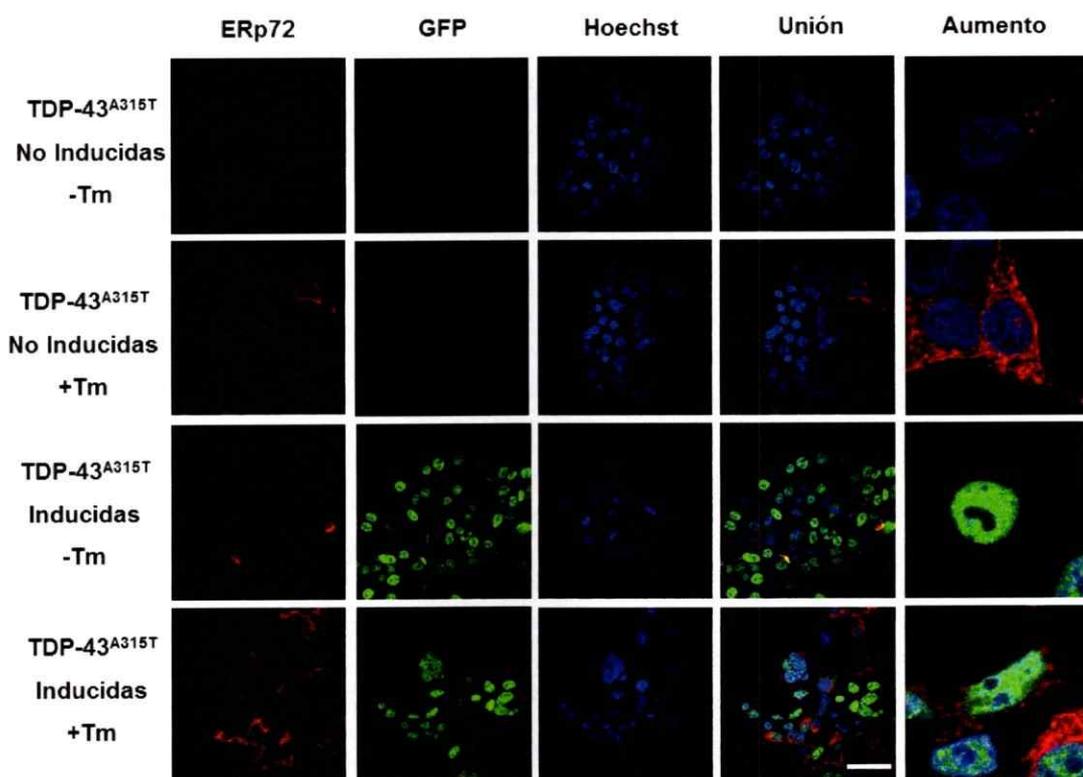
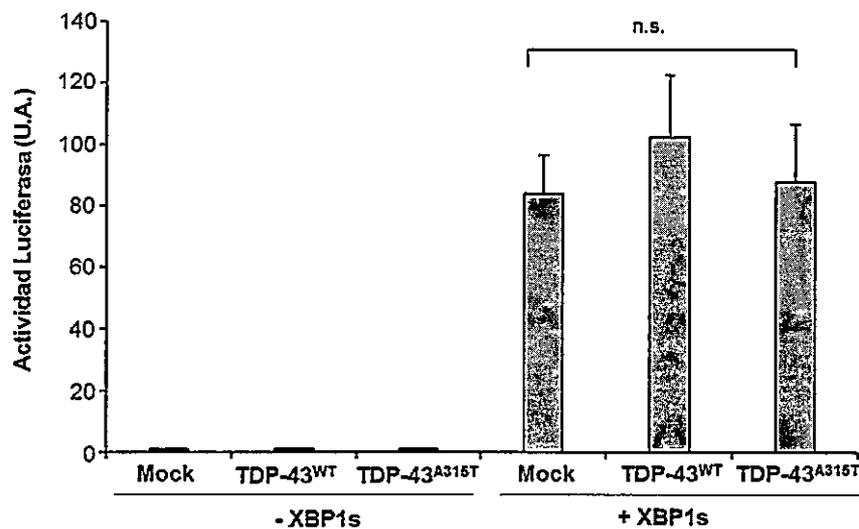


Figura 24. Análisis de la morfología del RE en células que expresan la TDP-43 en su forma WT bajo una condición de estrés de RE. Inmunofluorescencia de la línea NSC34 que expresa la forma WT de la proteína TDP-43 fusionada a GFP (TDP-43<sup>WT</sup>). Estas células fueron inducidas con doxiciclina 72 h, y posteriormente tratadas 16 h con tunicamicina (Tm). Como control se utilizaron células no inducidas, y en ambas condiciones también se observaron células sin tratar con Tm. Se utilizó un anticuerpo anti-ERp72 como un marcador de RE. (Barra = 50  $\mu$ M).



**Figura 25. Análisis de la morfología del RE en células que expresan la TDP-43 en su forma mutante (A315T) bajo una condición de estrés de RE.** Inmunofluorescencia de la línea NSC34 que expresa la forma mutante de la proteína TDP-43 fusionada a GFP (TDP-43<sup>A315T</sup>). Estas células fueron inducidas con doxiciclina 72 h, y posteriormente tratadas 16 h con tunicamicina (Tm). Como control se utilizaron células no inducidas, y en ambas condiciones también se observaron células sin tratar con Tm. Se utilizó un anticuerpo anti-ERp72 como un marcador de RE. (Barra = 50  $\mu$ M).

respuesta a esta condición (Samali et al., 2010). Usando este sistema se quiso evaluar si TDP-43 podría afectar la actividad transcripcional de XBP1. Se observó que ni TDP-43<sup>WT</sup> ni TDP-43<sup>A315T</sup> generan un efecto en la actividad luciferasa comparado con el control en que se co-transfectó XBP1s con el vector vacío (Figura 26). Con este resultado es posible concluir que TDP-43 no reprime directamente la función del factor de transcripción XBP1, por lo tanto, la disminución que se observa en los marcadores de la UPR en los modelos *in vivo* e *in vitro* podría deberse a una desregulación río arriba de la expresión de sus genes blanco.



**Figura 26.** Evaluación de la función del factor XBP1 en presencia de TDP-43 en su forma WT y mutante (A315T) por medio de un ensayo de luciferasa. Se co-transfectaron células NSC34 con vectores que expresan las variantes de TDP-43 (WT y mutante), XBP1 y una secuencia conservada UPRÉ acoplada al reportero de luciferasa. Luego de 48 h se midió la actividad de luciferasa como se describe en Materiales y Métodos (n = 3). (n.s.  $p > 0,05$  ANOVA de una vía con post-prueba de Bonferroni).

## 7. DISCUSIÓN

El estudio de los mecanismos patológicos asociados a TDP-43 ha adquirido gran relevancia en los últimos años. Esta importancia radica en que TDP-43 corresponde al principal constituyente de las inclusiones anormales presentes en los pacientes con ELA y DFT de carácter familiar y esporádico (Neumann, 2009; Neumann et al., 2006). TDP-43 es una proteína nuclear que cumple varias funciones fisiológicas importantes relacionadas con la regulación del ARN, principalmente en los procesos de transcripción y procesamiento. Originalmente TDP-43 fue identificada como un represor transcripcional que se une a la secuencia TAR del VIH-1 integrado al genoma huésped, impidiendo la expresión de las proteínas víricas. Con el tiempo se fueron describiendo los otros roles celulares relevantes para TDP-43 en los que estaría involucrado, como por ejemplo, en la estabilidad y translocación del ARN, y el procesamiento de los micro-ARN (Ou et al., 1995).

En el contexto patológico, TDP-43 se encuentra anormalmente hiperfosforilada, ubiquitinada y fragmentada, con una localización celular anómala y formando agregados sarcosilo-insolubles (Lee et al., 2012; Neumann et al., 2006). A pesar de que dentro de las formas familiares de ELA la mutación en el gen *TARDBP* sólo representa un 5% de los casos, las inclusiones positivas de TDP-43 están presentes en el 97% de los casos de ELA y en un 45% de los casos de FTD (Ling et al., 2013; Lomen-Hoerth et al., 2003; Murphy et al., 2007). Por lo tanto, la proteína TDP-43 adquiere una relevancia particularmente interesante en la investigación de la etiología de estas enfermedades.

Los mecanismos por los cuales TDP-43 contribuye al proceso neurodegenerativo no están bien comprendidos, aunque algunos estudios la correlacionan con la disrupción de algunos procesos fisiológicos (Buratti y Baralle, 2012; Cohen et al., 2011). En la literatura es posible ver que la patología de la ELA ha sido relacionada con la activación de la UPR en tejido *post mortem* de pacientes (Hetz et al., 2009; Ilieva et al., 2007) y también en modelos de estudio animales y celulares ligados a la patología de SOD1 (Atkin et al., 2006; Hetz et al., 2009; Kiskinis et al., 2014; Naujock et al., 2016; Saxena et al., 2009), de FUS (Farg et al., 2012) y de C9ORF72 (Dafinca et al., 2016; Zhang et al., 2014). Sin embargo, hasta el momento, la relación de la proteinopatía de TDP-43 con la activación de la UPR no ha sido cabalmente descrita. Para indagar en este tópico, en este trabajo se utilizaron modelos animales y celulares de la proteinopatía de TDP-43 para evaluar la capacidad de respuesta de los modelos frente a una condición de estrés de RE.

#### **7.1. Caracterización de la progresión a nivel de peso corporal y motor de la patología del modelo murino TDP43<sup>A315T</sup>**

Para esta investigación se utilizó un modelo murino transgénico que sobreexpresa una forma humana mutante de la proteína TDP-43 en el sistema nervioso central, con un marcador “flag” en su extremo N-terminal. La mutación que posee el transgén corresponde a una de tipo puntual (A315T) localizada en el dominio rico en glicinas que está presente en el extremo C-terminal de la proteína. Esta mutación es una de las identificadas en pacientes que padecen ELA de tipo familiar, y éste es el primer modelo de ratón transgénico que expresa una forma mutada de TDP-43 (Wegorzewska et al., 2009). La publicación en que se describe el modelo no entregó

detalles acerca de la progresión de la patología que desarrolla el animal, por lo tanto, es necesario realizar una caracterización sistemática del modelo murino para su utilización en estudios de la proteinopatía de TDP-43 y sus mecanismos. El primer objetivo de este trabajo fue realizar esta caracterización y determinar distintos parámetros que son importantes a la hora de utilizar un modelo *in vivo* que sea representativo para investigar enfermedades humanas.

En primer lugar, se confirmó la sobre-expresión de la proteína TDP-43 en corteza y médula espinal del ratón transgénico TDP-43<sup>A315T</sup> comparando con los niveles del ratón No-Tg por técnicas de Western Blot e histología. Por otro lado, a partir del seguimiento de toda la vida del ratón TDP-43<sup>A315T</sup>, se pudo observar que el animal experimenta una patología que le provoca una disminución notoria en el peso corporal, además de dificultades para desplazarse que aparecen de manera sutil en etapas tardías. Sin embargo, a diferencia de otros modelos de ELA, no se detectó parálisis en ningún momento de la progresión de la patología del modelo. En el año 2013 se publicó un trabajo que daba cuenta que el modelo TDP-43<sup>A315T</sup> desarrollaba una patología intestinal provocada por la degeneración del plexo mientérico que inerva este tejido, y que la muerte prematura del ratón se debía en gran medida por esta condición más que por una patología asociada a ELA (Esmaeili et al., 2013). Por esta razón, también es trascendental realizar una caracterización mucho más detallada del modelo para evaluar su idoneidad en el campo de estudio.

En el análisis se observó una diferencia significativa entre la supervivencia de machos y hembras transgénicas (TDP-43<sup>A315T</sup>); mostrando los machos un promedio de  $88 \pm 2$  días y las hembras uno de  $132 \pm 9$  días. Los investigadores que generaron

el modelo transgénico obtuvieron una media de 153 días (Wegorzewska et al., 2009), pero con un tamaño muestral considerablemente menor y sin resaltar ninguna sobrevida diferencial por género. En esta tesis, no se observaron diferencias en los niveles proteicos de TDP-43 en extractos de corteza entre machos y hembras TDP-43<sup>A315T</sup> y tampoco se observaron diferencias entre extractos de machos y hembras No-Tg, descartando así diferencias basales en la expresión debido al género. Por lo tanto, esta observación podría ser atribuida a factores de diferente índole, como por ejemplo de carácter hormonal. En relación a este tema, se han hecho varios estudios epidemiológicos en poblaciones de pacientes en que se ha mostrado una menor incidencia de ELA en mujeres que en hombres, y se ha propuesto que esto puede deberse a un posible efecto protector de las hormonas reproductivas femeninas (De Jong et al., 2013), dándole de esta forma un carácter multifactorial a la patología de la ELA.

Para la caracterización de la progresión de la patología del modelo TDP-43<sup>A315T</sup> se realizaron mediciones de rutina de peso corporal y habilidades motoras con prueba de *Hanging* desde los 37 días de vida hasta el día de su sacrificio. Con ambos parámetros se pudo visualizar de forma clara el avance de la enfermedad del ratón TDP-43<sup>A315T</sup>, evidenciado por la caída progresiva de sus valores en el tiempo en contraposición a sus controles No-Tg. También con estos parámetros fue posible determinar un *onset* y al mismo tiempo calcular una duración de la enfermedad. En base a estas determinaciones se observó que las hembras TDP-43<sup>A315T</sup> evidencian los síntomas más tarde que los machos, y que además no hay variaciones en la duración de la enfermedad por género. Los *onset* y la duración de la enfermedad en

grupos de machos y hembras TDP-43<sup>A315T</sup> correlacionaron bien entre los determinados por seguimiento de peso corporal y por habilidades motoras. Sin embargo, el *onset* de las hembras presentó mayor dispersión (Tabla 4). Este mismo fenómeno de variabilidad se observó en la sobrevida. Estos datos no dejan de ser interesantes, ya que proporcionan aún más información acerca de la diferencia fenotípica a partir del género que no estaban descritas previamente en este modelo murino. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos se puede decir que el desarrollo de la enfermedad es igual entre machos y hembras TDP-43<sup>A315T</sup> y sólo varía el inicio de ella.

**Tabla 4. Parámetros cuantitativos obtenidos de la caracterización sistemática del modelo TDP-43<sup>A315T</sup> por mediciones de peso corporal y prueba motora de *Hanging*. Se determinaron los parámetros de inicio de la enfermedad y su duración para los ratones transgénicos (TDP-43<sup>A315T</sup>) separando en grupos de machos y hembras.**

Criterio	Peso		<i>Hanging</i>	
	Machos (n= 16)	Hembras (n= 9)	Machos (n= 6)	Hembras (n= 4)
Inicio de la enfermedad (edad en días)	72 ± 3	112 ± 9	74 ± 3	129 ± 16
Duración (días)	9 ± 1	12 ± 3	12 ± 2	13 ± 4

## 7.2. Análisis bioquímico e histológico del tejido nervioso del modelo murino TDP-43<sup>A315T</sup> en estadio sintomático terminal.

Dado que los tejidos afectados en los pacientes con ELA y DFT comprenden la médula espinal y la corteza cerebral, se analizaron estos tejidos en los ratones

TDP-43<sup>A315T</sup> en etapa sintomática terminal, es decir cuando los animales mostraron un claro deterioro fisiológico (baja de peso crítica y dificultad motora evidente). Debido a que no se encontró una expresión diferencial de TDP-43 entre machos y hembras No-Tg, y también TDP-43<sup>A315T</sup>, estos estudios se realizaron con muestras de ambos sexos.

Desde el punto de vista bioquímico, se analizaron extractos de corteza y médula espinal en condiciones reductoras y no reductoras. Fue posible detectar especies de alto peso molecular positivas para TDP-43 en ambos tejidos, sin embargo, éstos fueron detectados por distintos métodos que eran los de Western Blot y Filter Trap. La técnica de Filter Trap consiste en filtrar una muestra proteica por una membrana de acetato de celulosa con poros mayores a 0,22  $\mu\text{M}$  (ver Materiales y Métodos); por lo tanto, las proteínas que quedan atrapadas en la membrana representan a especies de un tamaño considerable. En el caso de las muestras de corteza de los animales TDP-43<sup>A315T</sup>, se detectaron agregados de TDP-43 por la técnica de Western Blot y no por la de Filter Trap, y viceversa en las muestras de médula espinal. Además, por medio de la técnica de Filter Trap se pudo apreciar que las especies proteicas positivas para de TDP-43 en médula espinal, además están ubiquitinadas. La presencia de agregados o inclusiones ubiquitinadas da señales de anomalías en la eliminación de formas proteicas mal plegadas (Scotter et al., 2014). Interesantemente, a través de ambas aproximaciones bioquímicas, se observó que estas especies de alto peso molecular aparecían cuando las muestras no estaban tratadas con el agente reductor DTT, por lo cual se puede especular que están formados por uniones disulfuro. El hecho de que los conglomerados proteicos hayan

aparecido de forma diferencial en las distintas metodologías utilizadas, lleva a deducir que existen distintos tipos y tamaños de especies agregadas de TDP-43 en los tejidos afectados del ratón. Con respecto a lo observado en las muestras de médula espinal, dado que sí pudieron ser detectados por la técnica de Filter Trap, es posible que en la técnica de Western Blot los agregados grandes de TDP-43 no hayan logrado entrar en el gel de acrilamida-bis-acrilamida en la etapa de electroforesis y no hayan podido resolverse. Por otro lado, a partir de una aproximación histológica, fue posible detectar inclusiones positivas para ubiquitina en la capa 5 de la corteza y en el asta ventral de la médula espinal lumbar de animales TDP-43<sup>A315T</sup>. Estos datos generan un aporte en el campo, ya que el trabajo que publicó el modelo no pudo demostrar la presencia de agregados de TDP-43 en este modelo murino, aunque sí la presencia de inclusiones ubiquitinadas por técnicas histológicas y degeneración axonal en fibras nerviosas de la médula espinal (Wegorzewska et al., 2009).

Dado que se observaron agregados de TDP-43 e inclusiones ubiquitinadas en los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> sintomáticos terminales, se evaluaron los niveles de ARNm de los marcadores de UPR *Xbp1s*, *Xbp1t*, *Atf4*, *Edem*, *Chop* también en extractos de corteza y médula espinal de estos animales por medio de la técnica de RT-qPCR. Inesperadamente, se detectó una disminución significativa de los niveles de la mayoría de estos marcadores en la corteza de los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> y ningún cambio en la mayor parte de ellos en médula espinal comparando con los respectivos controles No-Tg. Estos resultados, son distintos a lo que se ha reportado en otros modelos de ALS, en los cuales se ha mostrado la activación de blancos de

la UPR (Atkin et al., 2006; Dafinca et al., 2016; Farg et al., 2012; Saxena et al., 2009; Zhang et al., 2014). Estos estudios han generado una evidencia sólida acerca de la relevancia del rol funcional de la UPR en los mecanismos patogénicos de la ELA. Sin embargo, en el caso de la patología asociada a TDP-43, los estudios que se han realizado con respecto a la activación de la UPR hasta la fecha, son escasos y contradictorios. Por ejemplo, se ha visto que transfectando TDP-43 mutada en líneas celulares se genera activación de marcadores de estrés de RE como CHOP, XBP1 y ATF6 (Walker et al., 2013). Sin embargo, en un estudio *in vivo* se ha observado lo contrario, ya que se muestra que el factor de transcripción XBP1 disminuye significativamente en ratas transgénicas para TDP-43 mutante (Tong et al., 2012). Por lo tanto, no es obvio el efecto asociado a una respuesta a estrés de RE que se estaría generando en el contexto de la patología y desregulación de TDP-43. Los resultados obtenidos en esta tesis con respecto al análisis realizado en los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> sintomáticos, generan un aporte para la poca información que se ha desarrollado hasta la fecha. Además, permiten formular nuevas preguntas acerca de la capacidad adaptativa por parte del sistema biológico frente a una condición que involucre desbalances en la proteostasis de la célula.

### **7.3. Evaluación de la capacidad de respuesta del modelo murino TDP-43<sup>A315T</sup> frente a una condición de estrés de RE.**

Los resultados observados en los extractos de tejido nervioso de los ratones TDP-43<sup>A315T</sup> abren un gran interés y plantean la siguiente pregunta, ¿Es posible que este modelo de proteinopatía de TDP-43 genere algún tipo de alteración para

responder a un contexto de estrés de RE? Para dilucidar esta interrogante, se estableció un diseño experimental donde se indujo la condición de estrés de RE a través de inyecciones intraperitoneales de tunicamicina (5 µg/g) en el modelo animal. Como se mencionó en secciones anteriores, la tunicamicina es un compuesto que inhibe la N-glicosilación de las proteínas y su administración genera un efecto de activación de la UPR debido a la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (Osowski y Urano, 2011): A partir de la estandarización realizada en ratones No-Tg con el mismo background del modelo de estudio (C57/BL6), se determinó que el tiempo de tratamiento con la droga sería de 24 h, debido a que se obtuvo mayor porcentaje de *splicing* de *Xbp1* en esa condición.

Como grupo experimental, se utilizaron machos TDP-43<sup>A315T</sup> y controles No-Tg de 70 días de vida, es decir, en una etapa sintomática temprana (ver Tabla 4). Por genotipo, se inyectaron 3 ratones con DMSO y 3 con tunicamicina, y se evaluó la expresión de distintos marcadores de la UPR (*Xbp1s*, *Bip*, *Chop* y *Atf4*) en corteza cerebral, médula espinal e hígado por RT-qPCR. Los resultados obtenidos en esta aproximación experimental otorgan una relevancia muy valiosa a este trabajo. Con ellos, se demuestra que los animales TDP-43<sup>A315T</sup> presentan una respuesta significativamente menor frente a una condición farmacológica de estrés de RE. El hecho de que se observara una disminución en la expresión de *Trb3* y no en *Aaaf*, ambos blancos de ATF4 activados por otras vías además de la UPR, lleva a especular que la presencia de la TDP-43 con la mutación A315T afectaría directamente o indirectamente a la activación de genes relacionados con una respuesta adaptativa de la célula para contrarrestar una condición estrés de RE. Esta

afirmación se basa en que *Trb3* es un gen que se induce por estrés de RE y se ha asociado a muerte celular (Ohoka et al., 2005), y por otro lado *Aaat* es un gen que codifica para una proteína transmembrana de RE y tiene función como transportador de aminoácidos (Harding et al., 2003).

Para controlar este experimento, se midieron los niveles de *Xbp1*, *Bip* y *Atf4* en el hígado de este mismo grupo de ratones inyectados, dado que el ratón TDP-43<sup>A315T</sup> no expresa el transgén en este tejido (Wegorzewska et al., 2009). No se detectaron diferencias en los niveles de ninguno de estos marcadores por genotipo, dentro de las muestras de ratones tratados con tunicamicina. Por lo cual, se puede desprender que los resultados que se observaron en corteza y médula espinal tienen un significado biológico y no se debieron a variaciones en las inyecciones. Estos resultados permiten concluir que la presencia de TDP-43 en los tejidos nerviosos del ratón inhibe la respuesta a la condición de estrés. Con esto se podría especular que la TDP-43<sup>A315T</sup> podría estar reprimiendo la expresión de los blancos de la UPR, generando una desregulación a nivel de los sensores de estrés presentes en el RE (IRE1 $\alpha$ , PERK y ATF6) o bien afectando la fisiología del RE de manera general. Este fenómeno observado podría relacionarse con una alteración en la función neuronal en el largo plazo.

#### **7.4. Evaluación de la capacidad de respuesta de un modelo *in vitro* de TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> frente a una condición de estrés de RE.**

Para contar con un modelo *in vitro* que permita estudiar el mecanismo del fenómeno observado en los ratones TDP-43<sup>A315T</sup>, se generaron líneas estables de células NSC34 que expresan de forma inducible la forma silvestre de TDP-43 (TDP-43<sup>WT</sup>) y su forma mutante (TDP-43<sup>A315T</sup>). Ambas proteínas, TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup>, se encuentran fusionadas a GFP. No se observó agregación proteica de TDP-43 en estados basales o bajo condiciones de estrés de RE en estas líneas celulares, probablemente debido a que los niveles de expresión de TDP-43 no son suficientes para que se genere ese fenómeno. Sin embargo, se observó fragmentación de TDP-43 endógena bajo la condición experimental de estrés de RE, lo cual constituye un evento documentado en contextos patológicos (Suzuki et al., 2011). Lo relevante de los resultados obtenidos en esta tesis es la observación de que la presencia de la TDP-43 mutante es causal de fragmentación de la TDP-43 endógena. Esto se demostró porque el mecanismo de fragmentación ocurrió en condiciones basales y con tiempos cortos de tratamiento con el estresor de RE.

La fragmentación de TDP-43 y otras modificaciones post-traduccionales como hiperfosforilación y ubiquitinación han sido asociadas a la agregación anormal de la proteína (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Por lo tanto, la formación de estos fragmentos carboxilo-terminal (C-terminal) constituyen un rasgo típico de la patología y podrían estar incidiendo en ella. Interesantemente, se ha documentado que el clivaje de TDP-43 es promovido por la activación de caspasas en condiciones de estrés de RE en NSC34 y cultivo primario de neuronas (Suzuki et al., 2011). La

activación de caspasas está ligada a la vía intrínseca de la apoptosis (Kurokawa y Kornbluth, 2009; McIlwain et al., 2013) y ha sido observada en modelos murinos de ELA (Inoue et al., 2003; Li et al., 2000; Martin, 1999; Wootz et al., 2004) y en neuronas de pacientes con DFT (Su et al., 2000). Sin embargo, este trabajo que liga la fragmentación de TDP-43 con la vía de caspasas (Suzuki et al., 2011), sugiere que este proceso de clivaje podría estar atenuando la toxicidad que induce TDP-43 en el contexto de la proteinopatía, debido a que cuando se reprimió la actividad de caspasas se observó mayor toxicidad y muerte celular (Suzuki et al., 2011). Por lo tanto, esto lleva a especular que la fragmentación de TDP-43 si bien es un signo típico de la proteinopatía, puede ser que se relacione con un mecanismo de respuesta de la célula para aliviar la toxicidad en un contexto de desregulación, y eso podría estar reflejado en la fragmentación basal que se observa en las células que expresan TDP-43<sup>A315T</sup>. El experimento realizado en este trabajo con la cinética de tunicamicina comprueba que este fenómeno está estrechamente ligado a la condición de estrés de RE.

Se evaluaron los niveles de marcadores de la UPR (XBP1, Grp94, BiP y ATF4) por técnica de Western Blot en condiciones de inducción de estrés de RE en distintos tiempos. Se cuantificaron las señales de los marcadores en el tiempo en que se observó activación y las comparaciones se realizaron con respecto al control de la línea sin inducir con doxiciclina. Los datos obtenidos resultaron ser interesantes en el sentido de que hubo una concordancia a lo observado en la aproximación *in vivo*. En las líneas celulares se observó una disminución significativa en los niveles de XBP1 y BiP, y una clara tendencia en Grp94 cuando se expresa la TDP-43

mutante. También se observó esta tendencia en ATF4, pero sólo a las 8 h de tratamiento con tunicamicina. Además, cuando la TDP-43<sup>WT</sup> fue expresada se observaron tendencias a la baja en todos los marcadores, aunque ninguna diferencia fue significativa. Esto lleva a concluir que hay un efecto en la respuesta a la condición de estrés de RE cuando se expresa la proteína TDP-43, y esto se hace aún más evidente cuando está mutada. Pareciera ser, como se planteó anteriormente al comentar el experimento *in vivo*, que en el contexto de la proteinopatía de TDP-43 el sistema biológico no puede responder cabalmente y eso podría ser un reflejo de la alteración de la fisiología de la célula.

Con las aproximaciones experimentales realizadas en el modelo animal y las líneas celulares se pudo apreciar la alteración en más de una vía de la UPR. En base a esto, es válida la pregunta acerca de que exista una eventual anomalía en el RE en el contexto de la patología de TDP-43. Se analizó la morfología reticular en las líneas celulares que expresan de forma inducible TDP-43<sup>WT</sup> y TDP-43<sup>A315T</sup> en condiciones de estrés de RE y basales. Para esto, se realizó una inmunofluorescencia para la detección de ERp72, un marcador reticular. ERp72 es una foldasa y chaperona miembro de la familia de las PDIs que es abundante en el lumen del RE y participa en el plegamiento de proteínas dentro de este organelo (Andreu et al., 2012; Mazzarella et al., 1990). Bajo condiciones de estrés de RE, se observó un aumento en los niveles de ERp72 en ambas líneas celulares, sin embargo, no hay cambios aparentes en la morfología del RE comparando las células que expresan las variantes de TDP-43 con las células sin inducir con doxiciclina. Es difícil aseverar a simple vista si existe algún tipo de variación en la estructura de un organelo, por lo

tanto, es posible que para este caso se necesite algún análisis más detallado con reconstrucción de imágenes tomadas en el eje Z o indagar con la ayuda de la tecnología de microscopía electrónica.

Por último, a través de un ensayo de luciferasa se quiso analizar si la presencia de TDP-43<sup>WT</sup> o TDP-43<sup>A315T</sup> podría reprimir la función del factor de transcripción XBP1. Esto se realizó por medio de transfección transiente de plasmidios que codifican para las variantes de TDP-43, XBP1s y un reportero UPR-luciferasa. No se detectaron cambios de actividad luciferasa en las células que expresaban TDP-43<sup>WT</sup> o TDP-43<sup>A315T</sup> con respecto al control con el vector vacío. Por lo tanto, es posible que la disminución de los niveles de expresión de los blancos de UPR que se han observado en este trabajo en el contexto de la proteinopatía de TDP-43 no sea debido a desregulaciones directas en sus procesos de transcripción, sino más bien a procesos río arriba de a la expresión de los genes, como por ejemplo, a nivel de los sensores de la UPR (IRE1 $\alpha$ , PERK y ATF6). Para dilucidar esto, se podría realizar un ensayo de luciferasa como el que se presentó en esta tesis, pero evaluando la respuesta al tratar a las células con tunicamicina en vez de transfectar directamente el factor de transcripción XBP1s. Además, se debería explorar lo que está ocurriendo con la activación de los sensores de la UPR, lo cual es posible realizar con la técnica de Western Blot y utilizando anticuerpos que reconocen las formas fosforiladas de IRE1 $\alpha$ , PERK o el clivaje de ATF6.

Los datos obtenidos en esta tesis son novedosos dentro del campo de estudio. Es por esto que es necesario estudiar más componentes de las vías de señalización que estén participando en el contexto de la patología, y así poder

entender qué está ocurriendo en el sistema y generar un modelo. Un buen antecedente que podría ayudar a dilucidar el mecanismo patológico es un trabajo que muestra que TDP-43 perturba las interacciones entre RE y mitocondria, condición que ha sido asociada a la disrupción de la interacción de VAPB-P (proteína del RE) con PTPIP51 (proteína mitocondrial) (Stoica et al., 2014). Lo interesante es que mutaciones en el gen de VAPB están asociadas a casos raros de ELA<sup>f</sup>, y por otro lado, la proteína está involucrada directamente en la activación de la UPR (Kanekura et al., 2006). Se ha demostrado que sobre-expresando VAPB se induce la UPR y que con una mutación asociada a ELA en el gen que la codifica, la UPR se reprime; asociando esta condición patológica a la neurodegeneración (Kanekura et al., 2006). Si en un contexto celular anómalo, TDP-43 está interfiriendo en la función de VAPB, es posible que de esta manera la UPR se estuviera reprimiendo. Por lo tanto, se destaca que dos genes involucrados en la ELA estén impactando negativamente la función de la UPR, lo cual sugiere la existencia de mecanismos generales presentes en este fenómeno.

Una disminución en la capacidad adaptativa de la célula frente a una condición de estrés de RE puede ser una causante en fallas en su proteostasis, y esto a su vez podría generar anomalías generales en el funcionamiento de la motoneurona (Hetz et al., 2015). Se ha documentado que problemas en el plegamiento de ciertas proteínas además de generar problemas relacionados con la acumulación de agregados insolubles (Hetz et al., 2015; Hetz y Mollereau, 2014), pueden afectar en la correcta formación de ciertas proteínas sinápticas (Woehlbier et al., 2016). Por otro lado, los desbalances sostenidos en la homeostasis proteica

pueden llevar a un daño crónico en la célula, condición que activaría las vías apoptóticas y daría inicio a un proceso de neurodegeneración irreversible (Hetz et al., 2015). También, es válido especular que una disminución de la respuesta a estrés de RE en el contexto de la patología de TDP-43 pueda ser un tipo de mecanismo que lleva a cabo la célula para evitar la expresión de genes apoptóticos en etapas tempranas de la enfermedad. Sin duda, la información que se generó en este trabajo abre muchas preguntas acerca de los mecanismos que estarían influyendo en la proteinopatía de TDP-43 y otorga algunas pistas, por medio de aproximaciones *in vivo* e *in vitro*, de que la UPR tiene un rol en la enfermedad o que al menos se ve afectada en el proceso.

## 8. PROYECCIONES

Las aproximaciones experimentales desarrolladas en esta tesis permitieron generar resultados novedosos acerca del rol de la UPR en la proteinopatía de TDP-43, lo cual no había sido bien descrito hasta la fecha. Los datos obtenidos abren nuevas preguntas acerca de los mecanismos involucrados en la represión de la UPR en el contexto patológico y la participación de TDP-43 en este fenómeno. Sería interesante evaluar la capacidad de respuesta de los sensores de estrés de RE que generan la activación de la UPR (IRE1 $\alpha$ , PERK y ATF6), y observar qué ocurre a nivel de ultraestructura de RE, mitocondria y Golgi en el contexto de la proteinopatía.

A pesar de que este trabajo se enfocó en indagar sobre la capacidad de respuesta a una condición de estrés de RE sólo en la proteinopatía de TDP-43, sería un gran aporte probar los mismos experimentos en otros modelos de ELA como los de SOD1 mutante y repeticiones de hexanucleótidos de *C9ORF72*. Si llegara a comprobarse que esto es un rasgo general de la ELA y DFT, podría generarse una buena forma de diagnosticar las enfermedades. Por ejemplo, se podría medir la capacidad de respuesta en muestras de sangre de pacientes, realizando experimentos similares a lo que se desarrolló en esta tesis con las pruebas de tunicamicina y la evaluación de los niveles de expresión de marcadores de la UPR.

## 9. CONCLUSIONES

- A partir de una caracterización sistemática es posible aseverar que el modelo murino transgénico TDP-43<sup>A315T</sup> desarrolla una patología reflejada en su pérdida progresiva de peso corporal y disminución gradual de sus capacidades motoras.
- El modelo murino transgénico TDP-43<sup>A315T</sup> no desarrolla parálisis completa probablemente debido a que muere tempranamente por problemas gastrointestinales.
- Las hembras transgénicas TDP-43<sup>A315T</sup> poseen una sobrevivencia mayor que los machos con este mismo genotipo, característica que no tiene que ver con los niveles de expresión de TDP-43 tanto en condiciones basales como de la sobreexpresión. Es posible que exista un componente hormonal que influya en este fenotipo.
- Las hembras transgénicas TDP-43<sup>A315T</sup> inician la enfermedad más tarde que los machos, pero la duración de ésta no varía por género.
- El modelo murino TDP-43<sup>A315T</sup> genera agregados positivos para TDP-43 y ubiquitina en estadio sintomático terminal, lo cual es posible detectar por distintos métodos bioquímicos e histológicos.
- Con una aproximación experimental *in vitro* se puede decir que la condición de estrés de RE y la presencia de TDP-43 mutante induce la fragmentación de la TDP-43 endógena.

- Existe una disminución basal de los niveles de algunos marcadores de UPR en la corteza de los animales TDP-43<sup>A315T</sup> en estadio sintomático terminal.
- A partir de experimentos realizados con el modelo murino TDP-43<sup>A315T</sup> y líneas celulares en condiciones de estrés de RE, se puede decir que en el contexto de la proteinopatía de TDP-43 el sistema no alcanza los niveles fisiológicos de activación de varios factores de transcripción y blancos de la UPR.

## 10. REFERENCIAS

- Abhyankar, M. M., Urekar, C., Reddi, P. P. (2007). A novel CpG-free vertebrate insulator silences the testis-specific SP-10 gene in somatic tissues: Role for TDP-43 in insulator function. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36143–36154.
- Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y., Dynlacht, B. D. (2007). XBP1 Controls Diverse Cell Type- and Condition-Specific Transcriptional Regulatory Networks. *Molecular Cell*, 27(1), 53–66.
- Amarilio, R., Ramachandran, S., Sabanay, H., & Lev, S. (2005). Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5934–5944.
- Ameri, K., & Harris, A. L. (2008). Activating transcription factor 4. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(1), 14–21.
- Andreu, C. I., Woehlbier, U., Torres, M., Hetz, C. (2012). Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: From disease mechanisms to biomedical applications. *FEBS Letters*, 586(18), 2826–2834.
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., 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.
- Atkin, J. D., Farg, M. A., Turner, B. J., Tomas, D., Lysaght, J. A., Nunan, J., Rembach, A., Nagley, P., Beart, P. M., Cheema, S. S., Horne, M. K. (2006). Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 30152–30165.
- Barmada, S. J., Skibinski, G., Korb, E., Rao, E. J., Wu, J. Y., Finkbeiner, S. (2010). Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, 30(2), 639–649.
- Belzil, V. V., Daoud, H., Desjarlais, A., Bouchard, J.-P., Dupré, N., Camu, W., Dion, P. A., Rouleau, G. A. (2016). Analysis of *OPTN* as a causative gene for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*, 32(3), 555.e13–555.e14.

- Belzil, V. V., Daoud, H., St-Onge, J., Desjarlais, A., Bouchard, J.-P., Dupre, N., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P.-F., Meininger, V., Camu, W., Dion, P. A., Rouleau, G. A. (2011). Identification of novel FUS mutations in sporadic cases of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 12(September 2010), 113–117.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., Meininger, V. (1994). A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 330(9), 585–591.
- Bilican, B., Serio, A., Barmada, S. J., Nishimura, A. L., Sullivan, G. J., Carrasco, M., Phatnani, H. P., Puddifoot, C. A., Story, D., Fletcher, J., Park, I.-H., Friedman, B. A., Daley, G. Q., Wyllie, D. J. A., Hardingham, G. E., Wilmut, I., Finkbeiner, S., Maniatis, T., Shaw, C. E., Chandran, S. (2012). Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5803–5808.
- Blais, J. D., Addison, C. L., Edge, R., Falls, T., Zhao, H., Wary, K., Koumenis, C., Harding, H. P., Ron, D., Holcik, M., Bell, J. C. (2006). Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9517–9532.
- Boeve, B. F., & Graff-Radford, N. R. (2012). Cognitive and behavioral features of c9FTD/ALS. *Alzheimer's Research & Therapy*, 4(4), 29.
- Boillée, S., Vande Velde, C., Cleveland, D. (2006). ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron*. 52(1), 39-59.
- Buratti, E., Baralle, F. E. (2012). TDP-43: Gumming up neurons through protein-protein and protein-RNA interactions. *Trends in Biochemical Sciences*. 37(6), 237-247.
- Buratti, E., Brindisi, A., Giombi, M., Tisminetzky, S., Ayala, Y. M., Baralle, F. E. (2005). TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: An important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37572–37584.
- Buratti, E., De Conti, L., Stuani, C., Romano, M., Baralle, M., Baralle, F. (2010). Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *FEBS Journal*, 277(10), 2268–2281.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92–96.
- Cao, S. S., & Kaufman, R. J. (2012). Unfolded protein response. *Curr Biol*, 22(16), R622–R626.

- Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O., Berciano, M. T., Lafarga, M. (2009). TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons. *Journal of Structural Biology*, 167(3), 235–241.
- Chen, H., Qian, K., Du, Z., Cao, J., Petersen, A., Liu, H., Blackburn L. W. 4th, Huang, C. L., Errigo, A., Yin, Y., Lu, J., Ayala, M., Zhang, S. C. (2014). Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell*, 14(6), 796–809.
- Chen, H.-J., Anagnostou, G., Chai, A., Withers, J., Morris, A., Adhikaree, J., Pennetta, G., de Bellerocche, J. S. (2010). Characterization of the properties of a novel mutation in VAPB in familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 40266–40281.
- Chen, X., Shen, J., Prywes, R. (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 13045–13052.
- Chiang, P.-M., Ling, J., Jeong, Y. H., Price, D. L., Aja, S. M., Wong, P. C. (2010). Deletion of TDP-43 down-regulates Tbc1d1, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(37), 16320–16324.
- Cleveland, D. W., Rothstein, J. D. (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(11), 806–819.
- Cohen, T. J., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q. (2011). TDP-43 functions and pathogenic mechanisms implicated in TDP-43 proteinopathies. *Trends in Molecular Medicine*, 17(11), 659–667.
- Dafinca, R., Scaber, J., Ababneh, N., Lalic, T., Weir, G., Christian, H., Vowles, J., Douglas, A. G. L., Fletcher-Jones, A., Browne, C., Nakanishi, M., Turner, M. R., Wade-Martins, R., Cowley, S. A., Talbot, K. (2016). C9orf72 Hexanucleotide Expansions are Associated with Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Stress Granule Formation in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Stem Cells*, In Press.
- Damiano, M., Starkov, A. A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Beal, M. F., Manfredi, G. (2006). Neural mitochondrial Ca<sup>2+</sup> capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *Journal of Neurochemistry*, 96(5), 1349–1361.
- Das, I., Krzyzosiak, A., Schneider, K., Wrabetz, L., Antonio, M. D., Barry, N., Sigurdardottir, A., Bertolotti, A. (2015). Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science*, 348(6231), 229–232.
- De Jong, S., Huisman, M., Sutedja, N., Van Der Kooij, A., De Visser, M., Schelhaas,

- J., van der Schouw, Y., Veldink, J., Van Den Berg, L. (2013). Endogenous female reproductive hormones and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 260(2), 507–512.
- De vos, K. J., Mórotz, G. M., Stoica, R., Tudor, E. L., Lau, K. F., Ackerley, S., Warley, A., Christopher E. Shaw, C. E., Miller, C. C. J. (2012). VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. *Human Molecular Genetics*, 21(6), 1299–1311.
- Dejesus-hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.-Y. R., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., Wszolek, Z. K., Feldman, H., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Miller, B. L., Dickson, D. W., Boylan, K. B., Graff-radford, N. R., Rademakers, R. (2011). Article Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245–256.
- Dewey, C. M., Cenik, B., Sephton, C. F., Dries, D. R., Mayer, P., Good, S. K., A. Johnson, B.A., Herz, J., Yu, G. (2011). TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Molecular and Cellular Biology*, 31(5), 1098–1108.
- Dickson, D. W., Josephs, K. A., Amador-Ortiz, C. (2007). TDP-43 in differential diagnosis of motor neuron disorders. *Acta Neuropathologica*, 114(1), 71–79.
- Doble, A. (1996). The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*, 47(6 Suppl 4), S233-S241.
- Eacker, S. M., Dawson, T. M., Dawson, V. L. (2009). Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(12), 837–841.
- Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V., Tong, X.-K., Serrano, A., Fan, X., del Rayo Sánchez-Carbente M., Servant, F., Bell, A. W., Boismenu, D., Lacaille, J. C., McPherson, P. S., DesGroseillers, L., Sossin, W. S. (2006). Characterization of an RNA Granule from Developing Brain. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(4), 635–651.
- Esmaeili, M. A., Panahi, M., Yadav, S., Hennings, L., Kiaei, M. (2013). Premature death of TDP-43 (A315T) transgenic mice due to gastrointestinal complications prior to development of full neurological symptoms of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Experimental Pathology*, 94(1), 56–64.
- Farg, M. A., Soo, K. Y., Walker, A. K., Pham, H., Orian, J., Horne, M. K., Warraich, S. T., Williams K. L., Blair, I. P., Atkin, J. D. (2012). Mutant FUS induces endoplasmic reticulum stress in amyotrophic lateral sclerosis and interacts with protein disulfide-isomerase. *Neurobiology of Aging*, 33(12), 2855–2868.
- Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M., Shaw, P. J. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews*

*Neurology*, 7(11), 616–630.

- Freilbaum, B. D., Chitta, R. K., High, A. A., Taylor, J. P. (2010). Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *Journal of Proteome Research*, 9(2), 1104–1120.
- Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O'Malley, B. W., Kato, S. (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol*, 9(5), 604–611.
- Gijssels, I., Engelborghs, S., Maes, G., Cuijt, I., Peeters, K., Mattheijssens, M., Joris, G., Cras, P., Martin, J. J., De Deyn, P. P., Kumar-Singh, S., Van Broeckhoven, C., Cruts, M. (2010). Identification of 2 loci at chromosomes 9 and 14 in a multiplex family with frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology*, 67(5), 606–616.
- Gkogkas, C., Middleton, S., Kremer, A. M., Wardrope, C., Hannah, M., Gillingwater, T. H., Skehel, P. (2008). VAPB interacts with and modulates the activity of ATF6. *Human Molecular Genetics*, 17(11), 1517–1526.
- Gorlach, A., Klappa, P., Kietzmann, T. (2006). The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal*, 8(9-10), 1391–1418.
- Greenway, M. J., Alexander, M. D., Ennis, S., Traynor, B. J., Corr, B., Frost, E., Green, A., Hardiman, O. (2004). A novel candidate region for ALS on chromosome 14q11.2. *Neurology*, 63(10), 1936–1938.
- Grosskreutz, J., Van Den Bosch, L., Keller, B. U. (2010). Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium*, 47(2):165-174.
- 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(18), 1772–1775.
- Hadano, S., Hand, C. K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R. S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y., Singaraja, R., Figlewicz, D. A., Kwiatkowski, T., Hosler, B. A., Sagie, T., Skaug, J., Nasir, J., Brown, R. H. Jr, Scherer, S. W., Rouleau, G. A., Hayden, M. R., Ikeda, J. E. (2001). A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nature Genetics*, 29(2), 166–173.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M., Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*, 11(3), 619–633.

- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1999). Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), 3787–3799.
- Heath-Engel, H. M., Chang, N. C., Shore, G. C. (2008). The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene*, 27(50), 6419–6433.
- Hentati, A., Bejaoui, K., Pericak-Vance, M. A., Hentati, F., Speer, M. C., Hung, W. Y., Figlewicz, D. A., Haines, J., Rimmler, J., Ben Hamida, C. (1994). Linkage of recessive familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 2q33-q35. *Nature Genetics*, 7(3), 425–428.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Hetz, C., Chevet, E., Harding, H. P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*, 12(9), 703–719.
- Hetz, C., Chevet, E., Oakes, S. A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol*, 17(8), 1088.
- Hetz, C., Mollereau, B. (2014). Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 15(4), 233–249.
- Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A. M., Brown, R. H., Glimcher, L. H. (2009). XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes and Development*, 23(19), 2294–2306.
- Hirano, M., Quinzii, C. M., Mitsumoto, H., Hays, A. P., Roberts, J. K., Richard, P., Rowland, L. P. (2011). Senataxin mutations and amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 12(3), 223–227.
- Honjo, Y., Kaneko, S., Ito, H., Horibe, T., Nagashima, M., Nakamura, M., Fujita, K., Takahashi, R., Kusaka, H., Kawakami, K. (2011). Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 12(6), 444-450.
- Hu, J., Chen, K., Ni, B., Li, L., Chen, G., Shi, S. (2012). A novel SOD1 mutation in amyotrophic lateral sclerosis with a distinct clinical phenotype. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 13(1), 149–154.
- Igaz, L. M., Kwong, L. K., Lee, E. B., Chen-Plotkin, A., Swanson, E., Unger, T., Malunda, J., Xu, Y., Winton, M. J., Winton, M. J., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M.-Y. (2011). Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 726–738.
- Ikenaka, K., Katsuno, M., Kawai, K., Ishigaki, S., Tanaka, F., Sobue, G. (2012).

- Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 1225–1238.
- Ilieva, E. V., Ayala, V., Jové, M., Dalfó, E., Cacabelos, D., Povedano, M., Bellmunt, M. J., Ferrer, I., Pamplona, R., Portero-Otín, M. (2007). Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 130(Pt 12), 3111–3123.
- Inoue, H., Tsukita, K., Iwasato, T., Suzuki, Y., Tomioka, M., Tateno, M., Nagao, M., Kawata, A., Saido, T. C., Miura, M., Misawa, H., Itohara, S., Takahashi, R. (2003). The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. *EMBO Journal*, 22(24), 6665–6674.
- Irmiler, M., Gentier, R. J. G., Dennissen, F. J. A., Schulz, H., Bolle, I., Höltter, S. M., Kallnik, M., Cheng, J. J., Klingenspor, M., Rozman, J., Ehrhardt, N., Hermes, D. J., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Hrabě de Angelis, M., Meyer, H. E., Hopkins, D. A., Van Leeuwen, F. W., Beckers, J. (2012). Long-term proteasomal inhibition in transgenic mice by UBB(+1) expression results in dysfunction of central respiration control reminiscent of brainstem neuropathology in Alzheimer patients. *Acta Neuropathologica*, 124(2), 187–197.
- Jiang, H. Q., Ren, M., Jiang, H. Z., Wang, J., Zhang, J., Yin, X., Wang, S. Y., Qi, Y., Wang, X. D., Feng, H. L. (2014). Guanabenz delays the onset of disease symptoms, extends lifespan, improves motor performance and attenuates motor neuron loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience*, 277, 132–138.
- Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B. J., Vande Velde, C., Bouchard, J. P., Lacomblez, L., Pochigavaeva, K., Salachas, F., Pradat, P. F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N., Rouleau, G. A. (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 40(5), 572–574.
- Kanekura, K., Nishimoto, I., Aiso, S., Matsuoka, M. (2006). Characterization of amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB/ALS8). *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 30223–30233.
- Kikuchi, H., Almer, G., Yamashita, S., Guégan, C., Nagai, M., Xu, Z., Sosunov, A. A., McKhann, G. M. 2nd, Przedborski, S. (2006). Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15), 6025–6030.
- Kim, I., Shu, C. W., Xu, W., Shiau, C. W., Grant, D., Vasile, S., Cosford, N. D., Reed, J. C. (2009). Chemical biology investigation of cell death pathways activated by endoplasmic reticulum stress reveals cytoprotective modulators of ASK1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(3), 1593–1603.
- Kim, Y. M., Jang, W. H., Quezado, M. M., Oh, Y., Chung, K. C., Junn, E., Mouradian, M. G. (2007). The role of endoplasmic reticulum stress in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 101(2), 307–317.

- M. M. (2011). Proteasome inhibition induces alpha-synuclein SUMOylation and aggregate formation. *J Neurol Sci*, 307(1-2), 157–161.
- Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L. A., Boulting, G. L., Moccia, R., Wainger, B. J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., Mellin, C., Merkle, F. T., Davis-Dusenbery, B. N., Ziller, M., Oakley, D., Ichida, J., Di Costanzo, S., Atwater, N., Maeder, M. L., Goodwin, M. J., Nemes, J., Handsaker, R. E., Paull, D., Noggle, S., McCarroll, S. A., Joung, J. K., Woolf, C. J., Brown, R. H., Eggan, K. (2014). Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell*, 14(6), 781–795.
- Kong, J., Xu, Z. (1998). Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the. *J Neurosci*, 18(9), 3241–3250.
- Kopito, R. R., Ron, D. (2000). Conformational disease. *Nat Cell Biol*, 2(11), E207–E209.
- Kouyama, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R. J., Kominami, E., Momoi, T. (2006). ER stress (PERK/eIF2[alpha] phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ*, 14(2), 230–239.
- Kovacic, P., Somanathan, R. (2012). Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. *Curr Neuropharmacol*, 10(4), 289–302.
- Kraemer, B. C., Schuck, T., Wheeler, J. M., Robinson, L. C., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., Schellenberg, G. D. (2010). Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta Neuropathologica*, 119(4), 409–419.
- Kress, J. A., Kühnlein, P., Winter, P., Ludolph, A. C., Kassubek, J., Müller, U., Sperfeld, A. D. (2005). Novel mutation in the ALS2 gene in juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 58(5), 800–803.
- Kuo, P. H., Doudeva, L. G., Wang, Y. T., Shen, C. K. J., Yuan, H. S. (2009). Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic Acids Research*, 37(6), 1799–1808.
- Kurokawa, M., Kornbluth, S. (2009). Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell*, 138(5), 838–854
- Kwiatkowski, T. J., Bosco, D. A., LeClerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E. J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G. A., Hosler, B. A., Cortelli, P., de Jong, P. J., Yoshinaga, Y., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P. C., Horvitz, H. R., Landers, J. E., Brown, R. H. (2009). Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*, 323(5918), 1205–1208.
- Larroquette, F., Seto, L., Gaub, P. L., Kamal, B., Wallis, D., Larivière, R., Vallée, J.,

- Robitaille, R., Tsuda, H. (2015). Vapb/Amyotrophic lateral sclerosis 8 knock-in mice display slowly progressive motor behavior defects accompanying ER stress and autophagic response. *Human Molecular Genetics*, 24(22), 6515–6529.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology*, 23(21), 7448–7459.
- Lee, E. B., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J. Q. (2012). Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(1), 38–50.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., Kaufman, R. J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes and Development*, 16(4), 452–466.
- Levine, B., Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 132(1), 27–42
- Li, M., Ona, V. O., Guégan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L. J., Olszewski, A. J., Stieg, P. E., Lee, J. P., Przedborski, S., Friedlander, R. M. (2000). Functional Role of Caspase-1 and Caspase-3 in an ALS Transgenic Mouse Model. *Science*, 288(5464), 335–339.
- Li, W., Lee, M., Henderson, L., Tyagi, R., Bachani, M., Steiner, J., Campanac, E., Hoffman, D. A., von Geldern, G., Johnson, K., Maric, D., Morris, H. D., Lentz, M., Pak, K., Mammen, A., Ostrow, L., Rothstein, J., Nath, A. (2015). Human endogenous retrovirus-K contributes to motor neuron disease. *Science Translational Medicine*, 7(307), 307ra153.
- Lillo, P., Matamala, J. M., Valenzuela, D., Verdugo, R., Castillo, J. L., Ibáñez, A., & Slachevsky, A. (2014). Overlapping features of frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Revista Médica de Chile*, 142(7), 867–879.
- Lin, J. H., Li, H., Zhang, Y., Ron, D., Walter, P. (2009). Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS ONE*, 4(1), e4170.
- Ling, S. C., Polymenidou, M., Cleveland, D. W. (2013). Converging mechanisms in als and FTD: Disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*, 79(3), 416–438.
- Ling, S.-C., Albuquerque, C. P., Han, J. S., Lagier-Tourenne, C., Tokunaga, S., Zhou, H., Cleveland, D. W. (2010). ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (30), 13318–13323.
- Lomen-Hoerth, C., Murphy, J., Langmore, S., Kramer, J. H., Olney, R. K., Miller, B. (2003). Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology*, 60(7), 1094–1097.
- Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R.,

- Nagata, K., Harding, H. P., Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes and Development*, 18(24), 3066–3077.
- Martin, L. J. (1999). Neuronal Death in Amyotrophic Lateral Sclerosis Is Apoptosis: Possible Contribution of a Programmed Cell Death Mechanism. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58(5), 459–471.
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., Komure, O., Matsuura, S., Kobatake, K., Morimoto, N., Abe, K., Suzuki, N., Aoki, M., Kawata, A., Hirai, T., Kato, T., Ogasawara, K., Hirano, A., Takumi, T., Kusaka, H., Hagiwara, K., Kaji, R., Kawakami, H. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 465(7295), 223–226.
- Maselli, R. A., Wollman, R. L., Leung, C., Distad, B., Palombi, S., Richman, D. P., Salazar-Grueso, E. F., Roos, R. P. (1993). Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 16(11), 1193–1203.
- Matus, S., Lopez, E., Valenzuela, V., Nassif, M., Hetz, C. (2013). Functional Contribution of the Transcription Factor ATF4 to the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE*, 8(7), 1–12.
- Matus, S., Valenzuela, V., Medinas, D. B., Hetz, C. (2013). ER dysfunction and protein folding stress in ALS. *International Journal of Cell Biology*, 674751.
- Mazzarella, R. A., Srinivasan, M., Haugejorden, S. M., Green, M. (1990). ERp72, an abundant luminal endoplasmic reticulum protein, contains three copies of the active site sequences of protein disulfide isomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 265(2), 1094–1101.
- McDermott, C. J., Roberts, D., Tomkins, J., Bushby, K. M., Shaw, P. J. (2003). Spastin and paraplegin gene analysis in selected cases of motor neurone disease (MND). Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders : Official Publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases, 4(2), 96–99.
- McGuire, V., Longstreth, W. T., Koepsell, T. D., van Belle, G. (1996). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in three counties in western Washington state. *Neurology*, 47(2), 571–573.
- McIlwain, D. R., Berger, T., Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656.
- Meyer, T., Schwan, A., Dullinger, J. S., Brocke, J., Hoffmann, K. T., Nolte, C. H., Hopt, A., Kopp, U., Andersen, P., Epplen, J. T., Linke, P. (2005). Early-onset ALS with long-term survival associated with spastin gene mutation. *Neurology*, 65(1), 141–143.
- Miller, R. G., Mitchell, J. D., Lyon, M., Moore, D. H. (2007). Riluzole for amyotrophic

- lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1), CD001447.
- Mitchell, J. D., Borasio, G. D. (2000). Amyotrophic lateral sclerosis. *Most*, 369, 2031–2041.
- Mitchell, J. D., Callagher, P., Gardham, J., Mitchell, C., Dixon, M., Addison-Jones, R., Bennett, W., O'Brien, M. R. (2010). Timelines in the diagnostic evaluation of people with suspected amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND) – a 20-year review: Can we do better? *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 11(6), 537–541.
- Mórotz, G. M., De Vos, K. J., Vagnoni, A., Ackerley, S., Shaw, C. E., Miller, C. C. J. (2012). Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant VAPBP56s perturbs calcium homeostasis to disrupt axonal transport of mitochondria. *Human Molecular Genetics*, 21(9), 1979–1988.
- Murphy, J. M., Henry, R. G., Langmore, S., Kramer, J. H., Miller, B. L., Lomen-Hoerth, C. (2007). Continuum of frontal lobe impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology*, 64(4), 530–534.
- Nagayama, S., Minato-Hashiba, N., Nakata, M., Kaito, M., Nakanishi, M., Tanaka, K., Arai, M., Akiyama, H., Matsui, M. (2012). Novel FUS mutation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis and corticobasal degeneration. *J Clin Neurosci.*, 19(12), 1738-1739.
- Nakashima-Yasuda, H., Uryu, K., Robinson, J., Xie, S. X., Hurtig, H., Duda, J. E., Arnold, S. E., Siderowf, A., Grossman, M., Leverenz, J. B., Woltjer, R., Lopez, O. L., Hamilton, R., Tsuang, D. W., Galasko, D., Masliah, E., Kaye, J., Clark, C. M., Montine, T. J., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. (2007). Co-morbidity of TDP-43 proteinopathy in Lewy body related diseases. *Acta Neuropathologica*, 114(3), 221–229.
- Nardo, G., Pozzi, S., Pignataro, M., Lauranzano, E., Spano, G., Garbelli, S., Mantovani, S., Marinou, K., Papetti, L., Monteforte, M., Torri, V., Paris, L., Bazzoni, G., Lunetta, C., Corbo, M., Mora, G., Bendotti, C., Bonetto, V. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis multiprotein biomarkers in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One*, 6(10), e25545.
- Naujock, M., Stanslowsky, N., Bufler, S., Naumann, M., Reinhardt, P., Sternecker, J., Kefalakes, E., Kassebaum, C., Bursch, F., Lojewski, X., Storch, A., Frickenhaus, M., Boeckers, T. M., Putz, S., Demestre, M., Liebau, S., Klingenstein, M., Ludolph, A. C., Dengler, R., Kim, K. S., Hermann, A., Wegner, F., Petri, S. (2016). 4-Aminopyridine Induced Activity Rescues Hypoexcitable Motor Neurons from ALS Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells*, 34(6), 1563–1575.
- Neumann, M. (2009). Molecular neuropathology of TDP-43 proteinopathies. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(1), 232-246.

- 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., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M.-Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796), 130–133.
- Nishimura, A. L., Mitne-Neto, M., Silva, H. C. A., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J. R., Gillingwater, T., Webb, J., Skehel, P., Zatz, M. (2016). A Mutation in the Vesicle-Trafficking Protein VAPB Causes Late-Onset Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The American Journal of Human Genetics*, 75(5), 822–831.
- Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., Ichijo, H. (2008). ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes and Development*, 22(11), 1451–1464.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J. A., Urano, F., Imaizumi, K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 26(24), 9220–9231.
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *The EMBO Journal*, 24(6), 1243–1255.
- Osowski, C. M., Urano, F. (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods in Enzymology*, 490, 71-92.
- Ou, S. H., Wu, F., Harrich, D., García-Martínez, L. F., Gaynor, R. B. (1995). Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *Journal of Virology*, 69(6), 3584–3596.
- Padhi, A. K., Kumar, H., Vasaikar, S. V., Jayaram, B., Gomes, J. (2012). Mechanisms of loss of functions of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, 7(2).
- Pasinelli, P., Brown, R. H. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(9), 710–723.
- Pennetta, G., Hiesinger, P. R., Fabian-Fine, R., Meinertzhagen, I. A., & Bellen, H. J. (2016). Drosophila VAP-33A Directs Bouton Formation at Neuromuscular Junctions in a Dosage-Dependent Manner. *Neuron*, 35(2), 291–306.
- Polymeridou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K. R., Huelga, S. C., Moran, J., Liang, T. Y., Ling, S. C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., Kordasiewicz, H., Sedaghat, Y., Donohue, J. P., Shiue, L., Bennett, C. F., Yeo, G. W., Cleveland, D. W.

- (2011). Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci*, 14(4), 459–468.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., Hughes, P. D., Michalak, E. M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., Strasser, A. (2007). ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell*, 129(7), 1337–1349.
- Qu, Q., Li, D., Louis, K. R., Li, X., Yang, H., Sun, Q., Crandall, S. R., Tsang, S., Zhou, J., Cox, C. L., Cheng, J., Wang, F. (2014). High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1. *Nature Communications*, 5, 3449.
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A. M., Kaganovich, A., Scholz, S. W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D. W., Hernandez, D. G., Johnson, J. O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R. J., Orrell, R. W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I. E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J. B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M. A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V. M., Kaivorinne, A. L., Hölttä-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chiò, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., ITALSGEN Consortium, Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, J. D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E. E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S. D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N. M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H. R., Tienari, P. J., Traynor, B. J. (2011). A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), 257–268.
- Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H., Gordon, J. W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(3), 689–693.
- Ron, D., Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7), 519–529.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., Mulder, D. W., Smyth, C., Laing, N. G., Soriano, E., Pericak-Vance, M. A., Haines, J., Rouleau, G. A., Gusella, J. S., Horvitz, H. R., Brown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59–62.
- Rouschop, K. M. A., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J. W., Lambin, P., van der Kogel, A. J., Koritzinsky, M., Wouters, B. G. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the

- autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(1), 127–141.
- Rozas, P., Bargsted, L., Martínez, F., Hetz, C., Medinas, D. B. (2016). The ER proteostasis network in ALS: Determining the differential motoneuron vulnerability. *Neuroscience Letters*. In Press.
- Rutherford, N. J., Zhang, Y.-J., Baker, M., Gass, J. M., Finch, N. A., Xu, Y.-F., Stewart, H., Kelley, B. J., Kuntz, K., Crook, R. J., Sreedharan, J., Vance, C., Sorenson, E., Lippa, C., Bigio, E. H., Geschwind, D. H., Knopman, D. S., Mitsumoto, H., Petersen, R. C., Cashman, N. R., Hutton, M., Shaw, C. E., Boylan, K. B., Boeve, B., Graff-Radford, N. R., Wszolek, Z. K., Caselli, R. J., Dickson, D. W., Mackenzie, I. R., Petrucelli, L., Rademakers, R. (2008). Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genetics*, 4(9), e1000193.
- Samali, A., FitzGerald, U., Deegan, S., Gupta, S. (2010). Methods for Monitoring Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 1–11.
- Sato, T., Yamamoto, Y., Nakanishi, T., Fukada, K., Sugai, F., Zhou, Z., Okunoa, T., Naganoa, S., Hiratac, S., Shimizub, A., Sakoda, S. (2016). Identification of two novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene with familial amyotrophic lateral sclerosis: mass spectrometric and genomic analyses. *Journal of the Neurological Sciences*, 218(1), 79–83.
- Saxena, S., Cabuy, E., Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nature Neuroscience*, 12(5), 627–636.
- Scotter, E. L., Vance, C., Nishimura, A. L., Lee, Y.-B., Chen, H.-J., Urwin, H., Sardone, V., Mitchell, J. C., Rogelj, B., Rubinsztein, D. C., Shaw, C. E. (2014). Differential roles of the ubiquitin proteasome system and autophagy in the clearance of soluble and aggregated TDP-43 species. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 6), 1263–1278.
- Sephton, C. F., Good, S. K., Atkin, S., Dewey, C. M., Mayer, P., Herz, J., Yu, G. (2010). TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 6826–6834.
- Shan, X., Chiang, P.-M., Price, D. L., Wong, P. C. (2010). Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(37), 16325–16330.
- Skehel, P. A., Martin, K. C., Kandel, E. R., Bartsch, D. (1995). A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science*, 269(5230), 1580–1583.

- Soussan, L., Burakov, D., Daniels, M. P., Toister-Achituv, M., Porat, A., Yarden, Y., Elazar, Z. (1999). Erg30, a Vap-33-Related Protein, Functions in Protein Transport Mediated by Copi Vesicles. *The Journal of Cell Biology*, 146(2), 301–312.
- Sproviero, W., La Bella, V., Mazzei, R., Valentino, P., Rodolico, C., Simone, I. L., Logroscino, G., Ungaro, C., Magariello, A., Patitucci, A., Tedeschi, G., Spataro, R., Condino, F., Bono, F., Citrigno, L., Monsurrò, M. R., Muglia, M., Gambardella, A., Quattrone, A., Conforti, F. L. (2012). FUS mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Clinical and genetic analysis. *Neurobiology of Aging*, 33(4).
- Stallings, N. R., Puttaparthi, K., Luther, C. M., Burns, D. K., Elliott, J. L. (2010). Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiology of Disease*, 40(2), 404–414.
- Stoica, R., De Vos, K. J., Paillusson, S., Mueller, S., Sancho, R. M., Lau, K.-F., Vizcay-Barrena, G., Lin, W. L., Xu, Y. F., Lewis, J., Dickson, D. W., Petrucelli, L., Mitchell, J. C., Shaw, C. E., Miller, C. C. J. (2014). ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nature Communications*, 5, 3996.
- Su, J. H., Nichol, K. E., Sitch, T., Sheu, P., Chubb, C., Miller, B. L., Tomaselli, K. J., Kim, R. C., Cotman, C. W. (2000). DNA Damage and Activated Caspase-3 Expression in Neurons and Astrocytes: Evidence for Apoptosis in Frontotemporal Dementia. *Experimental Neurology*, 163(1), 9–19.
- Suzuki, H., Lee, K., Matsuoka, M. (2011). TDP-43-induced death is associated with altered regulation of BIM and Bcl-xL and attenuated by caspase-mediated TDP-43 cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13171–13183.
- Suzuki, H., Matsuoka, M. (2012). TDP-43 toxicity is mediated by the unfolded protein response-unrelated induction of C/EBP homologous protein expression. *Journal of Neuroscience Research*, 90(3), 641–647.
- Tabas, I., Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*, 13(3), 184–190.
- Taylor, J. P., Hardy, J., Fischbeck, K. H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5575), 1991–1995.
- Tobisawa, S., Hozumi, Y., Arawaka, S., Koyama, S., Wada, M., Nagai, M., Aoki, M., Itoyama, Y., Goto, K., Kato, T. (2003). Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(2), 496–503.
- Tong, J., Huang, C., Bi, F., Wu, Q., Huang, B., Zhou, H. (2012). XBP1 depletion precedes ubiquitin aggregation and Golgi fragmentation in TDP-43 transgenic rats. *Journal of Neurochemistry*, 123(3), 406–416.

- Tsai, K.-J., Yang, C.-H., Fang, Y.-H., Cho, K.-H., Chien, W.-L., Wang, W.-T., Wu, T. -W., Lin, C. -P., Fu, W. -M., Shen, C.-K. J. (2010). Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTLD-U. *The Journal of Experimental Medicine*, 207 (8), 1661–1673.
- Turner, M. R., Bowser, R., Bruijn, L., Dupuis, L., Ludolph, A., McGrath, M., Manfredi, G., Maragakis, N., Miller, R. G., Pullman, S. L., Rutkove, S. B., Shaw, P. J., Shefner, J., Fischbeck, K. H. (2013). Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.*, 14 (Suppl 1), 19-32.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., Ron, D. (2000). Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science*, 287(5453), 664–666.
- Uryu, K., Nakashima-Yasuda, H., Forman, M. S., Kwong, L. K., Clark, C. M., Grossman, M., Miller, B. L., Kretschmar, H. A., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Neumann, M. (2008). Concomitant TAR-DNA-binding protein 43 pathology is present in Alzheimer disease and corticobasal degeneration but not in other tauopathies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(6), 555–564.
- Van Blitterswijk, M., Van Vught, P. W. J., Van Es, M. A., Schelhaas, H. J., Van der Kooi, A. J., De Visser, M., Veldink, J. H., Van den Berg, L. H. (2012). Novel optineurin mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiology of Aging*, 33(5), 1016.e1-7.
- Vembar, S. S., Brodsky, J. L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(12), 944–957.
- Walker, A. K., Soo, K. Y., Sundaramoorthy, V., Parakh, S., Ma, Y., Farg, M. A., Wallace, R. H., Crouch, P. J., Turner, B. J., Horne, M. K., Atkin, J. D. (2013). ALS-associated TDP-43 induces endoplasmic reticulum stress, which drives cytoplasmic TDP-43 accumulation and stress granule formation. *PLoS ONE*, 8(11), 1–12.
- Wate, R., Ito, H., Zhang, J. H., Ohnishi, S., Nakano, S., Kusaka, H. (2005). Expression of an endoplasmic reticulum-resident chaperone, glucose-regulated stress protein 78, in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 110(6), 557–562.
- Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N. J., Miller, T. M., Baloh, R. H. (2009). TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18809–14.
- Wils, H., Kleinberger, G., Janssens, J., Pereson, S., Joris, G., Cuijt, I., Smits, V., Ceuterick-de Groote, C., Van Broeckhoven, C., Kumar-Singh, S. (2010). TDP-43

transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3858–3863.

- Woehlbier, U., Colombo, A., Saaranen, M. J., Pérez, V., Ojeda, J., Bustos, F. J., Andreu, C. I., Torres, M., Valenzuela, V., Medinas, D. B., Rozas, P., Vidal, R. L., Lopez-Gonzalez, R., Salameh, J., Fernandez-Collemani, S., Muñoz, N., Matus, S., Armisen, R., Sagredo, A., Palma, K., Irrazabal, T., Almeida, S., Gonzalez-Perez, P., Campero, M., Gao, F. B., Henny, P., van Zundert, B., Ruddock, L. W., Concha, M. L., Henriquez, J. P., Brown, R. H., Hetz, C. (2016). ALS-linked protein disulfide isomerase variants cause motor dysfunction. *The EMBO Journal*, 35(8), 845–865.
- Woehlbier, U., Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPRosome: A matter of life and death. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), 329–337
- Wootz, H., Hansson, I., Korhonen, L., Näpänkangas, U., Lindholm, D. (2004). Caspase-12 cleavage and increased oxidative stress during motoneuron degeneration in transgenic mouse model of ALS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(1), 281–286.
- Wu, L. S., Cheng, W. C., Shen, C. K. J. (2012). Targeted depletion of TDP-43 expression in the spinal cord motor neurons leads to the development of amyotrophic lateral sclerosis-like phenotypes in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27335–27344.
- Wu, L.-S., Cheng, W.-C., Hou, S.-C., Yan, Y.-T., Jiang, S.-T., & Shen, C.-K. J. (2010). TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis*, 48(1), 56–62.
- Xu, Y.-F., Zhang, Y. J., Lin, W. L., Cao, X., Stetler, C., Dickson, D. W., Lewis, J., Petrucelli, L. (2011). Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Mol Neurodegener*, 6(1), 73.
- Xu, Y.-F., Gendron, T. F., Zhang, Y.-J., Lin, W.-L., D'Alton, S., Sheng, H., Castanedes-Casey, M., Tong, J., Knight, J., Yu, X., Rademakers, R., Boylan, K., Hutton, M., McGowan, E., Dickson, D. W., Lewis, J., Petrucelli, L. (2010). Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*, 30(32), 10851–10859.
- Yan, J., Deng, H.-X., Siddique, N., Fecto, F., Chen, W., Yang, Y., Liu, E., Donkervoort, S., Zheng, J. G., Shi, Y., Ahmeti, K. B., Brooks, B., Engel, W. K., Siddique, T. (2010). Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia. *Neurology*, 75(9), 807–814.
- Zago, S., Poletti, B., Morelli, C., Doretti, A., Silani, V. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia (ALS-FTD). *Archives Italiennes de Biologie*, 149(1), 39–56.

- Zhang, Y.-J., Jansen-West, K., Xu, Y.-F., Gendron, T. F., Bieniek, K. F., Lin, W.-L., Sasaguri, H., Caulfield, T., Hubbard, J., Daugherty, L., Chew, J., Belzil, V. V., Prudencio, M., Stankowski, J. N., Castanedes-Casey, M., Whitelaw, E., Ash, P. E., DeTure, M., Rademakers, R., Boylan, K. B., Dickson, D. W., Petrucelli, L. (2014). Aggregation-prone c9FTD/ALS poly(GA) RAN-translated proteins cause neurotoxicity by inducing ER stress. *Acta Neuropathologica*, 128(4), 505–524.
- Zhao, Z., Chen, W., Wu, Z., Wang, N., Zhao, G., Chen, W., Murong, S. (2009). A novel mutation in the senataxin gene identified in a Chinese patient with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 10(2), 118–122.
- Zhou, H., Huang, C., Chen, H., Wang, D., Landel, C. P., Xia, P. Y., Bowser, R., Liu, Y. J., Xia, X. G. (2010). Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. *PLoS Genetics*, 6(3), e1000887.