

UCH-FC
Biotecnología
B251
C1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por Srta. Leslie Ann Bargsted Elgueda

“CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MODELO MURINO TRANSGÉNICO DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA: TDP43^{A315T}”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Claudio Hetz Flores
Director Seminario de Título

Dra. Soledad Matus Montero
Co-Directora Seminario de Título



Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Miguel Allende Connolly
Presidente Comisión

Dr. Elías Utreras Puratich
Evaluador

Santiago, 6 de noviembre de 2013



BIOGRAFÍA



Desde los tiempos de infancia me gustaba entender cómo funcionaban las diversas cosas que componen el entorno o qué origen tenían, manifestaba un profundo interés por el desarrollo del conocimiento y la genialidad que podían demostrar algunos personajes célebres a través de la historia. Me maravillaban las creaciones artísticas de pintores famosos, creaciones literarias maestras y razonamientos filosóficos y científicos. Sin embargo, me di cuenta en el transcurso de mi formación en el colegio que la ciencia iba a ser mi camino; pude notar que es un área que me fascina y me sorprende cada día, además siento que tengo la capacidad de desarrollarme en ella con éxito. Decidí entrar a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular porque la biología y la genética siempre me llamaron mucho la atención, sobre todo en la Educación Media, donde para mí había una gran caja negra entre lo "genético" y lo "visible". El lograr entrar a la Universidad de Chile y tener el privilegio de aprender de eminencias, adquirir conocimientos que me ayudaron a poder abrir la mente y poder ver el mundo y la vida desde una perspectiva distinta, es un tesoro que para mí es invaluable. Hoy 6 noviembre del año 2013, con 24 años de edad, puedo decir que me siento feliz haber concluido esta etapa como estudiante universitaria de una carrera científica, y de empezar nuevos desafíos dentro del mundo real de la investigación, en el cual tengo la oportunidad de estar inserta en trabajos de alta relevancia y de poder ser útil en la misión de dilucidar alguna de las miles de preguntas que surgen en esta maravillosa rama de estudio.

“Los imposibles de hoy serán posibles mañana”

Konstantin Tsiolkovski (Físico soviético, 1857-1935)

A mi madre, a quien le debo todo...

AGRADECIMIENTOS

En el cierre de este ciclo tan importante en mi vida académica e inicio de vida profesional, quisiera agradecer a muchas personas que fueron claves en mi proceso de formación. Primero a mi madre, Cristina, a quien admiro mucho por los valores inculcados, por ser un gran ejemplo a seguir, por ser mi mejor consejera y por ser un apoyo fundamental siempre. También mi hermano Andrew, por siempre tener esa palabra reflexiva que me ha hecho ver las cosas de otra perspectiva. Y a mi prima Pamela junto con mis sobrinos Ignacio, Benjamín y Martina, por la felicidad desbordante que siempre me entregan.

A mis amigas del colegio Celeste, Anita, Ivana y Carla, por vivir tantas cosas juntas desde pequeñas; y por la compañía y las risas que siguen intactas a pesar de los años. A mis compañeros y amigos "Biotek": Pablo, Ashley, Jaxaira, María José, Dominique y Javier; sin olvidar nunca a los que ya no lo son: Carolina, Camilo, José, Cristian, Johnny y Natalia, por sacarme una carcajada en momentos dentro y fuera de la Universidad y por todas las anécdotas alegres que sin duda quedarán en la memoria. En especial, agradecimientos a Sandra, Daniela y Eduardo, por convertirse en amigos de verdad, por la linda confianza creada, por la compañía del día a día y estar siempre ahí en todas las circunstancias en que los necesité.

A Claudio Hetz, por la increíble oportunidad que me brindó de poder trabajar bajo su tutela, pudiendo realizar ciencia de primer nivel. Quiero agradecerle todo el apoyo y confianza que depositó en mí, y por ser un tutor que se preocupó de estar muy presente en este importante proceso formativo, en el cual se tomó el tiempo de guiarme y aconsejarme.

A Soledad Matus, por haber sido una excelente co-tutora, enormemente preocupada por el desarrollo y éxito de mi trabajo, por la gran paciencia que tuvo desde el inicio al enseñarme hasta el más mínimo detalle, por la confianza que pudimos afianzar en el tiempo y por el compromiso constante que demostró siempre.

A mis compañeros del Laboratorio de Estrés Celular y Biomedicina por ser un grupo humano espectacular, ya que además de ser personas muy capaces y preparadas, siempre tienen una buena disposición de compartir sus conocimientos y ofrecer su ayuda. Agradecer a Melissa Calegaro, por su gran paciencia y tiempo dedicado en ayudarme a aprender técnicas de biología molecular en mis inicios en el laboratorio; a Mauricio Torres por su invaluable apoyo, confiar en mis capacidades y por direccionar mi trabajo generando en mí un pensamiento crítico previo al diseño de un experimento; a Vicente Valenzuela por mostrarme el monitoreo de animales con la prueba de Rotarod y por enseñarme técnicas de histología; a Yerko Fuentealba y Natalia Muñoz por la buenísima disposición que siempre tuvieron en prestarme ayuda en cualquier cosa que necesitara; a Silke Escobar por su trascendental apoyo en el manejo y cuidado de animales, y porque junto a Claudia Molina, Daniela Concha, Víctor Hugo Corona, Sandra Espinoza y Miguel González se generó un gran compañerismo. También agradecer a Diego Rojas y a Gabriela Martínez por su importante ayuda en el último ciclo de mi tesis, enfocándome en cómo desarrollar y presentar un problema científico, y además a Claudia Durán por su gran aporte en orientarme en los análisis estadísticos pertinentes a cada experimento. Por último, menciones especiales a Valentina Castillo, con quien creamos una gran amistad; agradecerle infinitamente su apoyo incondicional, su confianza total y la ayuda desinteresada que siempre ha tenido conmigo y que valoro mucho.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	x
1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT	4
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	6
2.1. Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	8
2.2. TDP43 y su relación con la esclerosis lateral amiotrófica	10
2.3. Modelos animales de ganancia y pérdida de función de TDP43.....	17
2.4. Estrés del retículo endoplasmático (RE) y la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR).....	21
2.5. Antecedentes que relacionan las proteinopatías de TDP43 con la UPR	25
3. HIPÓTESIS.....	29
4. OBJETIVOS	29
4.1. Objetivo General	29
4.2. Objetivos Específicos.....	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1. Mantenimiento de colonias de ratones TDP43 ^{A315T} y genotipificación.....	30
5.2. Monitoreo animales, pruebas motoras y conductuales	32
5.2.1. Mediciones de peso corporal	32
5.2.2. Prueba motora de rotarod	33
5.2.3. Prueba motora de <i>hanging</i>	33
5.2.4. Prueba motora de la grilla invertida	33
5.2.5. Prueba cognitiva de condicionamiento del miedo.....	34
5.3. Análisis histológico de muestras de tejido de corteza frontal	35
5.3.1. Perfusión de animales y cortes de tejido	35
5.3.2. Inmunofluorescencia de tejido	35

5.4.	Análisis bioquímico de muestras de tejido de corteza frontal y médula espinal.....	36
5.4.1.	Extracción de proteínas	36
5.4.2.	SDS-PAGE y western blot	37
5.4.3.	Extracción de ARN y generación de ADN complementario.....	38
5.4.4.	PCR convencional y digestión con enzima PstI.....	38
5.4.5.	PCR en tiempo real.....	39
5.5.	Análisis Estadístico	39
6.	RESULTADOS	40
6.1.	Presentación e identificación del modelo murino transgénico TDP43 ^{A315T}	40
6.2.	Caracterización del fenotipo patológico motor del modelo murino transgénico TDP43 ^{A315T}	44
6.2.1.	Caracterización por parámetro de caída de peso corporal.....	44
6.2.2.	Caracterización por pruebas motoras	48
6.3.	Evaluación del comportamiento asociado al estado cognitivo en etapa sintomática del modelo TDP43 ^{A315T}	56
6.4.	Análisis histológico del estado de la corteza frontal del modelo TDP43 ^{A315T}	60
6.5.	Análisis bioquímico para la comparación de los niveles de expresión de TDP43 entre animales machos y hembras.	60
6.6.	Análisis bioquímico para ver la presencia de especies de alto peso molecular positivas para TDP43 en corteza frontal y médula espinal del modelo TDP43 ^{A315T}	63
6.7.	Evaluación de la expresión de marcadores de la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) en tejido de corteza frontal y médula espinal del modelo TDP43 ^{A315T}	63
7.	DISCUSIÓN.....	70
7.1.	Caracterización de la progresión a nivel de peso corporal y motor de la patología del modelo TDP43 ^{A315T}	72
7.2.	Exploración del fenotipo cognitivo y sensorial del modelo TDP43 ^{A315T}	76
7.3.	Análisis de la patología en corteza frontal y médula espinal de ratones TDP43 ^{A315T} ..	79
7.4.	Relación de la patología de los ratones TDP43 ^{A315T} con la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR).....	82
7.5.	Proyecciones.....	85
8.	CONCLUSIONES.....	86
9.	REFERENCIAS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de la estructura general de la proteína TAR DNA-binding protein 43 (TDP43).	13
Figura 2	Funciones normales de TDP43.	16
Figura 3	Vías de señalización de la respuesta de proteínas mal plegadas.	24
Figura 4	Esquema del proceso de cruce para amplificar la colonia TDP43 ^{A315T} .	31
Figura 5	Presentación del modelo murino transgénico TDP43 ^{A315T} .	42
Figura 6	Sobrevida del modelo murino TDP43 ^{A315T} .	43
Figura 7	Caracterización del fenotipo del modelo TDP43 ^{A315T} bajo el parámetro de medición de peso.	46
Figura 8	Medición de la severidad de la enfermedad a través de las curvas de progresión de peso individuales del modelo TDP43 ^{A315T} .	47
Figura 9	Caracterización del fenotipo motor del modelo TDP43 ^{A315T} por medio de la prueba de rotarod.	50
Figura 10	Descripción de la prueba motora de <i>hanging</i> .	51
Figura 11	Caracterización del fenotipo motor del modelo TDP43 ^{A315T} por medio de la prueba de <i>hanging</i> .	52
Figura 12	Cálculo del inicio y duración de la enfermedad por medio del parámetro de la prueba de <i>hanging</i> en ratones TDP43 ^{A315T} .	54
Figura 13	Caracterización del fenotipo motor del modelo murino TDP43 ^{A315T} mediante la prueba de la grilla invertida.	55
Figura 14	Descripción de la prueba cognitiva de condicionamiento del miedo.	58

Figura 15	Análisis del fenotipo cognitivo del modelo TDP43 ^{A315T} por medio de la prueba de condicionamiento del miedo.	59
Figura 16	Sobreexpresión de la proteína TDP43 en corteza frontal del modelo murino TDP43 ^{A315T} .	61
Figura 17	Comparación de niveles de expresión de la proteína TDP43 entre machos y hembras TDP43 ^{NoTg} y TDP43 ^{A315T} en extractos de corteza frontal.	62
Figura 18	Detección de la proteína TDP43 en muestras de corteza frontal de ratones TDP43 ^{NoTg} y TDP43 ^{A315T} en presencia y ausencia de un agente reductor.	64
Figura 19	Detección de la proteína TDP43 en muestras de médula espinal de ratones TDP43 ^{NoTg} y TDP43 ^{A315T} en presencia y ausencia de un agente reductor.	65
Figura 20	Análisis del procesamiento del ARNm de xbp-1 en extractos de corteza del modelo TDP43 ^{A315T} .	67
Figura 21	Análisis del procesamiento del ARNm de xbp-1 en extractos de médula espinal del modelo TDP43 ^{A315T} .	68
Figura 22	Niveles de expresión de la foldasa ERp57 en extractos de corteza de ratones TDP43 ^{NoTg} y TDP43 ^{A315T} .	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Genes asociados a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	11
Tabla 2	Modelos de ganancia de función de TDP43.	19
Tabla 3	Modelos de pérdida de función de TDP43.	20
Tabla 4	Razón de nacimientos de la colonia de animales TDP43 ^{A315T} .	42
Tabla 5	Parámetros cuantitativos obtenidos de la caracterización sistemática del modelo TDP43 ^{A315T} por mediciones de peso corporal y prueba motora de <i>hanging</i> .	75



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- 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
- BCL-xL** - B-Cell Lymphoma-Extra Large
- Bim/BCL2L11** - BIM, Bcl-2-like protein 11
- BIP** - Binding Inmunoglobulin 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** - Demencia Lobar Frontotemporal
- DLFT-TDP** - Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones positivas para TDP43
- DLFT-U** - Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones positivas para Ubiquitina
- dNTP** - Deoxinucleósido Trifosfato
- DOC** - Desoxicolato
- DTT** - Ditiotreitól
- ECL** - Enhanced Chemiluminescence
- EDTA** - Ácido Etilendiaminotetraacético

eIF2 α - eukaryotic Initiation Factor 2 α
ELA - Esclerosis Lateral Amiotrónica
ERAD - Endoplasmic Reticulum-associated degradation
ERp57 - Endoplasmic Reticulum Protein 57/Grp58
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
hTDP43 - human TAR DNA Binding Protein 43
IRE1 - Inositol Requiring Kinase 1
JNK - c-Jun-N terminal Kinase
KO - Knockout
LTR - Long Terminal Repeat
MEF - Mouse Embryonic Fibroblast
NoTg - No Transgénico
NSC34 - Neuroblastoma-Spinal Cord 34
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
RIPA - Radio Immunoprecipitation Assay
RNA - Ribonucleic Acid
RPM - Revoluciones Per Minuto
RRM - RNA-Recognition Motif
RT - Reverse Transcription
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
Tat - Trans-Activator of Transcription
TDP43 - TAR DNA Binding Protein 43
TE - Tris-Cl - EDTA
TEMED - Tetrametiletilenodiamina
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
XBP1-s - X-Box binding protein-1 spliced
XBP1-t - X-Box binding protein-1 total
XBP1-u - X-Box binding protein-1 unspliced

1. RESUMEN

TAR DNA Binding Protein 43 (TDP43) es una proteína nuclear que cumple diversas funciones celulares importantes relacionadas con la regulación del ARN. Sin embargo, desde hace sólo unos pocos años se ha descrito a esta proteína en una condición desregulada en tejidos *post-mortem* de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y demencia lobar fronto-temporal (DLFT), tanto de tipo familiar como esporádico. Se documentó que TDP43 corresponde al principal constituyente de las inclusiones ubiquitinadas localizadas en las células que componen la corteza cerebral frontal y la médula espinal en el caso de los pacientes con ELA, y de las inclusiones presentes en las neuronas que componen la corteza frontal y el hipocampo en el caso de los pacientes con DLFT. En esta tesis se caracterizó el primer modelo murino publicado que sobreexpresa la forma humana de TDP43 en el sistema nervioso central (SNC) con la mutación A315T, que es una de las tantas identificadas en pacientes con ELA familiar. Se comprobó que estos ratones sufren una patología neurodegenerativa debido a la observación de un descenso progresivo en su peso corporal, disminución gradual de sus capacidades motoras y alteraciones en el comportamiento frente a estímulos ambientales en su etapa sintomática. En estos ratones transgénicos (TDP43^{A315T}) existe una diferencia en la sobrevivencia con respecto al género ya que las hembras transgénicas viven más que los machos transgénicos. Relacionado a esto, las hembras evidencian los síntomas más tarde que los machos, pero la duración y severidad de la enfermedad es la misma en ambos grupos. Esta diferencia fenotípica entre géneros no tiene que ver con la expresión de la proteína TDP43. Por otro lado, se detectó la presencia de especies de

alto peso molecular en extractos proteicos de corteza frontal de estos animales TDP43^{A315T} en etapa sintomática tardía, sin embargo estas especies no fueron detectadas en extractos proteicos de médula espinal, dando cuenta que se generan agregados de TDP43 en la corteza frontal de estos animales y no en la médula espinal cuando la enfermedad ya está en su etapa terminal. Se detectó un aumento en los niveles de ARN de *xbp1-s* provenientes de extractos de corteza de los animales transgénicos con respecto a los niveles basales de los no transgénicos (TDP43^{Notg}), pero no se observó diferencia en los niveles transcripcionales de *xbp1-s* en extractos de la médula espinal. Estos resultados indican que podría existir activación de la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR, sigla en inglés) en las células que componen la corteza y no en las que componen la médula espinal, lo que se correlaciona con la presencia de agregados de TDP43 en la corteza motora de los ratones TDP43^{A315T} y la ausencia de ellos en su médula espinal. También se evaluaron los niveles de ARN y proteína de la foldasa ERp57, blanco de la activación de la UPR, en extractos de corteza de animales TDP43^{A315T} en etapa sintomática terminal. Inesperadamente se obtuvo una disminución en los niveles de ARN de *erp57* con respecto a los basales y ninguna diferencia a nivel proteico, lo cual podría sugerir que esta activación de la UPR detectada en extractos de tejidos nerviosos de animales sintomáticos tardíos puede ser un remanente de una respuesta activada en etapas anteriores o una condición crónica de ésta misma.

En resumen, el estudio realizado en esta tesis se enfoca en conocer en profundidad el modelo TDP43^{A315T} y en realizar una aproximación acerca de la condición de estrés de RE que se estaría generando en los tejidos nerviosos afectados, lo cual constituye una novedad en este modelo animal. En base a los

resultados, la generación de agregados u oligómeros de TDP43 podría estar gatillando una activación de la UPR, pero no es claro el estadio en que se estaría dando este fenómeno. La investigación realizada tiene una gran proyección en cuanto al hallazgo de nuevos caracteres de la patología de ELA/DLFT relacionada con TDP43 y también a la búsqueda de posibles blancos terapéuticos en estudios *in vivo*.

2. ABSTRACT

TDP43 (TAR DNA Binding Protein 43) is a nuclear protein which has several important cellular functions related to the regulation of the RNA. However, since only few years ago, this protein has been described in a deregulated condition in *post-mortem* tissues from patients with neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar dementia (FTLD), both familiar as sporadic types. It has been documented that TDP43 corresponds to the main constituent of ubiquitinated inclusions located in cells that comprise the frontal cortex and spinal cord in the case of patients with ALS and it is the protein present in the inclusions located in the neurons of the frontal cortex and the hippocampus in the case of FTLD patients. In this thesis we characterized the first mouse model reported that over-expresses the human form of TDP43 in the central nervous system with the mutation A315T, which is one of several identified in patients with familial ALS. We found that these mice suffer a neurodegenerative disorder due to the observation of a progressive decrease in body weight, a gradually decrease their motor skills and an impaired performance against environmental stimuli in their symptomatic stage. In these transgenic mice (TDP43^{A315T}) there is a difference in survival with respect to gender because of transgenic females live longer than transgenic males. Related to this, female mice show the symptoms later than the male mice, but the duration and severity of the disease is the same in both groups. This phenotypic difference between genders has nothing to do with the TDP43 protein expression. Moreover, we detected the presence of high molecular weight species in frontal cortex protein extracts from these symptomatic stage animals TDP43^{A315T}, however these species were not detected in protein extracts of spinal cord, evidencing that TDP43 aggregates are generated in the

frontal cortex of these animals and not in the spinal cord when the disease is in its terminal stage. We detected an increase in RNA levels *xbp1-s* from cortex extracts of transgenic animals compare to baseline levels of non-transgenic mice (TDP43^{NoTg}), but no difference was observed in transcriptional levels in *xbp1-s* spinal cord extracts. These results indicate that may exist an activation of the unfolded protein response (UPR) in cells comprising the cortex and there is not in the cells comprising the spinal cord of the TDP43^{A315T} mice, which correlates with the presence of aggregates in the motor cortex and the absence of them in the spinal cord. Also, we evaluated the RNA and protein levels of the foldase ERp57, which is a target of the UPR activation. Unexpectedly it resulted in a decrease in RNA levels of *erp57* respect to the baseline and no difference in the protein levels, which might suggest that this activation of the UPR detected in cerebral tissue extracts of late symptomatic animals may be a remnant of an activated response in older stages or a chronic condition of the response.

In summary, the study conducted in this thesis focuses on in-depth knowledge TDP43^{A315T} model and make an approach about the condition of ER stress that would be generated in the nervous tissues affected, which is a novelty in this animal model. Based on the results, TDP43 aggregates or oligomers generated could be triggering UPR activation, but it is not clear which state would be giving this phenomenon. The research has great prospects in terms of finding new characters of the pathology of ALS/FTLD related TDP43 and also the search for potential therapeutic targets *in vivo* studies.

3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las enfermedades neurodegenerativas más comunes en los seres humanos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la demencia lobar frontotemporal (DLFT), comparten la característica común de presentar inclusiones proteicas en las células nerviosas de los pacientes, las cuales pueden ser de naturaleza intra o extracelular (Kopito y Ron, 2000; Taylor et al., 2002). Esta condición 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 (Irenaka et al., 2012), inhibición proteosomal (Kim et al., 2011; Imler et al., 2012) y estrés oxidativo (Kovacic et al., 2012).

El caso particular de la ELA, que es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta a las motoneuronas, no tiene una etiología conocida. 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 relacionó con casos de ELA (Rosen et al., 1993; revisado en Boillée et al., 2006). Las mutaciones en este gen además de producir alteraciones en las propiedades y funciones de la enzima, promueve la generación de inclusiones citoplasmáticas principalmente en las motoneuronas del asta ventral de la médula espinal (Rosen et al., 1993). Esta vulnerabilidad selectiva probablemente surgiría de la combinación de varios mecanismos como disfunción mitocondrial, daño oxidativo, excitotoxicidad,

inflamación y mal plegamiento de proteínas (revisado en Cozzolino et al., 2012). Este último punto ha tenido una particular atención en cuanto a las investigaciones relacionadas al campo de las alteraciones en el retículo endoplasmático (RE) y la activación de la vía de la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR, sigla en inglés), donde la relación con la proteinopatía de SOD1 ha sido bien caracterizada (Atkin et al., 2008; Nagata et al., 2007; Nishitoh et al., 2008).

En el año 2006, se publica 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 (TDP43) formando parte de inclusiones citoplasmáticas y nucleares presentes en tejido *post mortem* de pacientes con ELA y demencia lobar fronto-temporal con inclusiones positivas para ubiquitina (DLFT-U). De los tejidos analizados la mayoría mostró presencia de inclusiones de TDP43 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 DLFT-U estaban presentes en la corteza y el hipocampo. Lo interesante de esto 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, es un descubrimiento que tiene una gran importancia a nivel clínico debido a que fue posible conocer la proteinopatía presente en la mayoría de los casos de ELA y DLFT-U, abriendo incluso nuevos campos de investigación dedicados a dilucidar posibles conexiones entre estas dos enfermedades.

Hasta la fecha se han registrado muy pocos estudios que relacionen las proteinopatías de TDP43 con el estrés de RE y/o la activación de la UPR. La conexión entre ambos conceptos no es clara, por lo que es un área totalmente abierta a ser

explorada. En este campo, los estudios *in vivo* serán muy relevantes a la hora de buscar algún tipo de evidencia de las respuestas del sistema frente a la desregulación fisiológica generada por la anomalía de TDP43 en el SNC.

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 este mal llegan a sufrir cuadros de parálisis de los músculos voluntarios, acompañados de una exaltación de los reflejos tendinosos (Mulder et al., 1982). 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 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 (Ince et al., 2000). También es muy común en ELA la activación y proliferación de astrocitos y microglías. 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 et al., 1994).

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. Dentro de las formas familiares, la mutación dada por la expansión anormal de repeticiones de hexanucleótidos en el gen C9ORF72, constituye el factor de mayor incidencia (40% dentro de este grupo) (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, calambres y fasciculaciones) y neuronas corticales motoras (espasticidad y reflejos patológicos) en ausencia de síntomas sensoriales (McGuire et al., 1996; Mitsumoto et al., 1998). Las causas fisiológicas tampoco están aún bien definidas; las investigaciones han identificado múltiples perturbaciones de la función celular en las motoneuronas, tono excitatorio excesivo, mal plegamiento de proteínas, producción de energía deteriorada, metabolismo del calcio anormal, transporte axonal alterado y activación de proteasas y nucleasas (Cleveland et al., 2001; Rowland et al., 1992).

A pesar de la falta de información acerca de la etiología de la enfermedad, se han identificado varios genes cuya alteración podría estar relacionada con ella y además proteínas que se han visto desreguladas en el contexto patológico a nivel celular (Tabla 1). Por esto mismo, la ELA es un tópico que actualmente se encuentra en un alto desarrollo a nivel de investigación científica debido a que constituye una enfermedad que no tiene una terapia efectiva en la actualidad, y también porque se le

han implicado múltiples factores de riesgo que podrían estar influyendo en la aparición y transcurso de la enfermedad, abriendo cada vez nuevas interrogantes.

2.2. TDP43 y su relación con la esclerosis lateral amiotrófica

TDP43 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 fronto-temporal con inclusiones ubiquitinadas (ahora conocidas como DLFT-TDP) (Neumann et al., 2006). 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 DLFT-TDP. Por otro lado, se ha encontrado a TDP43 en condiciones patológicas también formando parte de inclusiones ubiquitinadas e hiperfosforiladas en formas familiares de estos tipos de enfermedades neurodegenerativas con mutaciones en otros genes y en las de carácter esporádico (revisado en Neumann, 2009). Por lo tanto, TDP43 adquiere una gran relevancia en cuanto a su rol en el desarrollo de fenotipos patológicos de ELA y DLFT, lo cual está evidenciado por los más de 600 estudios publicados sobre el tema.

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/Proteína	Nombre	Causante	Categoría	Tipo de ELA	Referencia
SOD1	Cu/Zn superoxide dismutase 1	ALS 1	Estrés Oxidativo	Familiar y Esporádico	Rosen et al., 1993; Sato et al., 2004; Hu et al., 2012
ALS2	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) homolog (human). Alsin	ALS 2	Regeneración, tropismo y muerte motoneuronal	Familiar	Hentati et al., 1994; Hadano et al., 2001; Kress et al., 2005
SETX	Senataxin	ALS 4	Procesamiento de DNA/RNA alterado	Familiar y Esporádico	Chen et al., 2004; Zhao et al., 2009; Hirano et al., 2010
SPAST	Hereditary spastic paraparesis	ALS 5	Defectos en neurofilamentos y microtúbulos	Esporádico	McDermott et al., 2003; Meyer et al., 2005
FUS	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	ALS 6	Muerte celular	Familiar	Kwiatkowski et al., 2009; Yan et al., 2010; Belzil et al., 2011; Nagayama et al., 2012
VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B	ALS 8	Transporte axonal y tráfico vesicular alterado	Familiar	Nishimura et al., 2004; Kirby et al., 2007; Chen et al., 2010
ANG	Angiogenin	ALS 9	Procesamiento de DNA/RNA alterado	Familiar y Esporádico	Greenway et al., 2004; Padhi et al., 2012
TARDBP(TDP43)	TAR DNA binding protein	ALS 10	Procesamiento de DNA/RNA alterado	Familiar y Esporádico	Neumann et al., 2006; Dickson et al., 2007; Kabashi et al., 2008; Rutherford et al., 2008
OPTN	Optineurin	ALS 12	Muerte celular	Familiar y Esporádico	Maruyama et al., 2010; Belzil et al., 2010; van Blitterswijk et al., 2012
C9ORF72	chromosome 9 open reading frame 72	ALS-FTD 2	Función no conocida	Familiar y Esporádico	Gijssels et al., 2010; DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011

TDP43 en condiciones normales corresponde a una proteína netamente nuclear y su función está relacionada con la regulación a nivel transcripcional y con la participación en procesos de corte y empalme del ARN (Fig. 2A). Su nombre *TAR DNA binding protein* hace alusión a una secuencia de ADN llamada TAR, que se encontró asociada a TDP43 cuando fue aislada por primera vez en el año 1995. TAR es una secuencia propia del virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) y el hallazgo se suscitó en medio de la búsqueda de nuevos inactivadores transcripcionales del virus. La expresión de genes provirales del VIH-1 es regulada por muchos factores celulares del hospedero, los cuales se unen a secuencias presentes dentro de la región de repetición terminal larga (LTR, del inglés *long terminal repeat*) de su genoma (Pereira et al., 2000). En este sistema regulatorio se ha demostrado que TDP43 inhibe el ensamblaje de factores transcripcionales básicos que interactúan con el elemento TATA de la región LTR del VIH-1, tanto en ausencia como en presencia de la proteína Tat (Ou et al., 1995). Tat corresponde a una proteína del VIH-1 que presenta una función transactivadora que favorece la expresión de sus genes víricos por medio de la maquinaria del hospedero (Debaisieux et al., 2012).

El número "43" presente en el nombre de la proteína hace referencia a su peso molecular aproximado (~43 KDa) (Ou et al., 1995); y el gen que la codifica (TARDBP) está presente en el cromosoma 1 y está compuesto por 6 exones, los cuales son procesados alternativamente para la entrega de diversas isoformas (Wang et al., 2004). TARDBP es un gen altamente conservado durante la evolución y se han encontrado homólogos de la TDP43 humana en todas las especies eucariotas superiores, incluyendo organismos distantes tales como *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, y *Caenorhabditis elegans*. (Wang et al., 2004; Ayala et al., 2005). El

alto grado de conservación de secuencia en organismos no relacionados, da señales de que TDP43 tiene un papel fundamental en la evolución (Buratti y Baralle, 2008).

Evidencias provenientes de líneas de investigación convergentes sugieren que TDP43 regula el ARN en una variedad de formas. Su dominio RRM1 es crucial para su unión al ARN de hebra simple (Ayala et al., 2005; Ou et al., 1995) (Fig. 1), y estudios hechos utilizando la técnica de secuenciación de alto rendimiento de ARN aislado mediante inmunoprecipitación revelan que TDP43 se une a una vasta proporción del transcriptoma (más de 6000 especies de ARN), y le ha observado preferentemente localizada en los intrones, regiones no traducidas en 3' (UTRs, sigla en inglés) y ARN no codificantes (Tollervey et al., 2011). El grupo de los ARN blancos ha incluido también a transcritos largos y transcritos relacionados con la actividad sináptica o el desarrollo neuronal (Wang et al., 2004; Polymenidou et al., 2011).

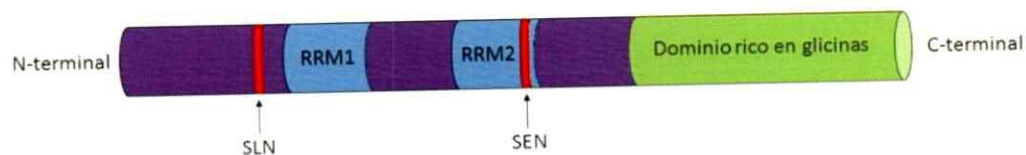


Figura 1. Esquema de la estructura general de la proteína TAR DNA-binding protein 43 (TDP43). Esta proteína contiene dos motivos de reconocimiento de ARN: RRM1 Y RRM2 (RRM del inglés RNA-recognition motif), una señal de localización nuclear bipartita (SLN) y una señal de exportación nuclear (SEN). Además 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.

Consistente con su función como una proteína de unión a ARN, TDP43 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 TDP43 con esta familia de ribonucleoproteínas dependen de su dominio rico en glicinas ubicado en su extremo C-terminal. Por otro lado, la localización de TDP43 en gránulos de ARN dentro de procesos neuronales también sugiere que está involucrada en el tráfico del ARN (Elvira et al., 2005) (Fig. 2C). Además, diversos estresores celulares provocan la redistribución de TDP43 desde el núcleo al citoplasma residiendo dentro de gránulos de estrés, lo cual hace presumir un rol en el tráfico y estabilización del ARN (Elvira et al., 2005; Dewey et al., 2011) (Fig. 2F). Por otro lado se cree que TDP43 regula 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 (Fig. 2D) (Casafont et al., 2009; Buratti et al., 2010; Fukuda et al., 2007). TDP43 también interactúa con ADN de hebra simple, proceso que promueve la inhibición de la transcripción a través de mecanismos desconocidos (Fig. 2E) (Kuo et al., 2009; Abhyankar et al., 2007). Finalmente, TDP43 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 demencia lobar frontotemporal (Ling et al., 2010).

La oleada inicial de los estudios de TDP43 en ELA y DLFT-TDP que describe la patología y anormalidad de esta proteína fueron hechos en tejido humano. En una rápida sucesión, estas proteinopatías también fueron documentadas en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y trastornos caracterizados por cuerpos de Lewy con inclusiones de α -sinucleína (Uryu et al., 2008; Nakashima-Yasuda et al., 2007). El grado de la patología en estas otras enfermedades

está limitado en términos de la cantidad y distribución de TDP43 en comparación con los casos de ELA primarios y DLFT-TDP.

En condiciones patológicas TDP43 presenta características anómalas como localización en el citoplasma, pérdida de su expresión nuclear normal, modificaciones post-traduccionales como hiperfosforilación y ubiquitinación, y la generación de un fragmento proteico en el extremo C-terminal (Neumann et al., 2006). Estos procesos han sido asociados 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 TDP43, la principal pregunta a dilucidar es si la disfunción de esta proteína origina 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 TDP43 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 TDP43. Dentro de su papel como regulador del procesamiento del ARN, se ha destacado la acción de TDP43 sobre blancos relacionados con la actividad sináptica, evidenciada por la vulnerabilidad neuronal observada frente a la alteración de la función de esta proteína (Polymenidou et al., 2011). Por otro lado, la participación de TDP43 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).

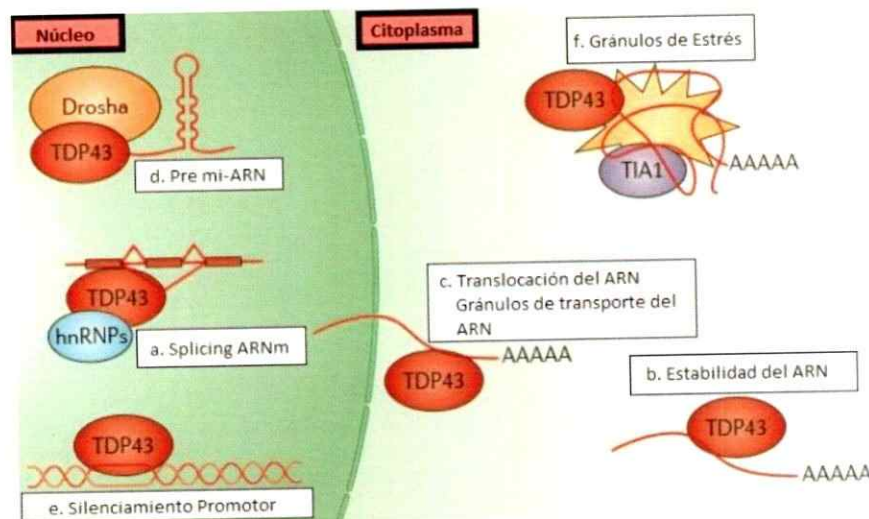


Figura 2. Funciones normales de TDP43. TDP43 exhibe múltiples funciones biológicas normales, relacionadas mayormente con vías de regulación del ARN. (A) TDP43 es un componente de las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs), las cuales regulan el procesamiento de las especies de pre-ARNm. (B) TDP43 también se une a secuencias de ARNm, particularmente dentro de la región no traducida 3' (3' UTR, sigla en inglés), y afecta la estabilidad y la rotación del ARNm. (C) Se cree que TDP43 desempeña un papel en el tráfico del ARNm y que experimenta un rápida translocación núcleo-citoplasma y se localiza dentro de gránulos de ARN dendríticos. (D) TDP43 es además un componente del complejo Drosha, el cual funciona en el procesamiento primario de los micro-ARN. (E) TDP43 puede actuar como un represor transcripcional a través de la unión a las secuencias promotoras del ADN de hebra simple. (F) TDP43 también colocaliza con gránulos de estrés que se cree que secuestran y protegen al ARNm bajo condiciones de estrés. Modificado de Lee et al., 2011.

2.3. Modelos animales de ganancia y pérdida de función de TDP43

Para entender los mecanismos patogénicos de TDP43 en el contexto de ELA y otros desórdenes neurodegenerativos, es importante clarificar primero sus roles fisiológicos en el sistema nervioso. Para encausar este propósito, se han desarrollado modelos de ganancia de función generando animales transgénicos que sobreexpresan TDP43 en su forma silvestre o con una mutación asociada a ELA. Éstas últimas son mayoritariamente son del tipo dominante *missense* y están presentes en el dominio rico en glicina, dato que podría sugerir que la alteración en este dominio es suficiente para inducir neurodegeneración (Gitcho et al., 2008; Kabashi et al., 2008; Rutherford et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Yokoseki et al., 2008) (Fig. 1). Sin embargo, muchos casos clínicos de ELA esporádico y DLFT con patología de TDP43 no están asociados a estas mutaciones, indicando de esta manera la importancia de la generación de modelos animales, para que permitan entender la influencia de los distintos contextos de la proteína en la patología.

En el año 2009 se publicó el primer modelo murino que sobreexpresa la forma mutante de TDP43 humana A315T en el SNC (Wegorzewska et al., 2009). La expresión de este transgén está bajo el promotor de la proteína prion de ratón (PrPm) y contiene un marcador *flag* en su extremo N-terminal. Se observó en este modelo la presencia de inclusiones de ubiquitina en la capa 5 de la corteza cerebral y en el asta ventral de la médula espinal por inmunohistoquímica. Además se detectó por inmunofluorescencia pérdida de localización nuclear de TDP43 en algunas neuronas con inclusiones ubiquitinadas, y estas inclusiones no resultaron ser positivas para TDP43.

Posterior a la generación de este modelo, se han publicado otros de ratón (Stallings et al., 2010; Xu et al., 2011; Swarup et al., 2011) y de rata (Zhou et al., 2010) con una ganancia de función de TDP43 dada por la sobreexpresión de la proteína mutada (con las mutaciones A315T, M337V, G348C) en el SNC (Tabla 2). En general en ellos se observan fenotipos patológicos severos que incluyen problemas motores, una neurodegeneración cortical y de la médula espinal, la presencia de inclusiones ubiquitinadas, anomalías en localización de TDP43 y la presencia de fragmentos de bajo peso molecular. Como se explicitó anteriormente, también se han generado modelos de ganancia de función que sobreexpresan la forma silvestre o WT de TDP43 (Stallings et al., 2010; Xu et al., 2010; Wils et al., 2010; Shan et al., 2010) en los cuales también se desarrollan estos efectos patológicos (Tabla 2).

Por otro lado, se han generado algunos modelos de pérdida de función de TDP43 también con el objetivo de entender el rol fisiológico de la proteína y relacionarlo con la condición patológica (Tabla 3). Los primeros modelos de deficiencia de TDP43 que se generaron (Wu et al., 2010; Sephton et al., 2009; Kraemer et al., 2010) fueron de tipo constitutivo (de tipos *knock out* y por *gene trap*), pero no lograron la viabilidad. Poco tiempo después, se desarrolló un modelo condicional de deficiencia de TDP43 que en el adulto lleva a un fenotipo de desorden metabólico y muerte prematura (Chiang et al., 2010). Sólo recientemente se publicó la generación de un modelo murino de deficiencia en la expresión de TDP43 condicional y dirigida sólo a la médula espinal (Wu et al., 2012) donde se observaron fenotipos relacionados con ELA (curvatura de cordón espinal, baja de peso, empeoramiento en desempeño motor), pero con una severidad mucho menor a los modelos de ganancia de función (Tabla 2), una progresión más lenta después del inicio de la enfermedad y sin mostrar documentación de muerte en los plazos monitoreados.

Tabla 2. Modelos de ganancia de función de TDP43. Resumen de modelos murinos que sobreexpresan TDP43 (mutante o WT) registrados hasta la fecha.

Animal	Transgén	Promotor	Fenotipo	Histopatología	Referencia
Ratón	flag-TDP43A315T humano	prion murino (PrPm)	Entre los 0 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	TDP43WT 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	TDP43A315T humano	prion murino (PrPm)	5 fundadores muertos entre 14 y 73 días, otros pueden reproducirse pero mueren entre 52-75 días o no tienen fenotipo. En la línea 23 se observa un declive en la fuerza de agarre y en la longitud del paso	TDP43 nuclear difuso en neuronas y glías. Colocalización de ubiquitina <i>punteada</i> e inclusiones de TDP43 fosforilados en citoplasma y núcleo de neuronas del asta ventral y tronco encefálico	Stallings et al., 2010
Ratón	TDP43WT humano	prion murino (PrPm)	Los hemicigotos 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 sobrevida 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 motoneuronas de la médula con inclusiones nucleares de TDP fosforilados (en citoplasma raramente detectados)	Xu et al., 2010
Ratón	TDP43M337V humano	prion murino (PrPm)	Los hemicigotos 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 fosforilados (en citoplasma raramente detectados)	Xu et al., 2011
Ratón	TDP43WT humano	Thy1.2 murino	Los hemicigotos muestran caída de extremidades posteriores a los 14 meses de vida y a los 15 empeoramiento de desempeño en rotarod. Los hemicigotos 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	TDP43WT 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 colocalizan con FUS/TLS y SC35. Tinción de ubiquitina difusa en citoplasma	Shan et al., 2010
Ratón	TDP43WT murino	Ca2+/calmodulin-dependentkinasell (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. Sobrevida promedio de 495 días	Acumulación de TDP43 en citoplasma y colocalización 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	TDP43WT Tet-off humano (inducido a los 28 días)	CaMKIIa-ITA*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 colocalizan con ubiquitina. En neuronas que expresan la TDP43 humana se observa un decremento en la expresión de TDP43 murina	Igaz et al., 2011
Rata	TDP43WT 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	TDP43M337V Tet-off humano	CAG-ITA*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 TDP43. Resumen de modelos murinos con deficiencia de TDP43 registrados hasta la fecha.

Tipo de Deficiencia	Deficiencia de TDP43	Fenotipo	Referencia
Constitutiva	delección 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	delección exón 2	Fenotipo metabólico y muerte prematura en ratones adultos	Chiang et al., 2010
Condicional	delección 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

2.4. Estrés del retículo endoplasmático (RE) y la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR)

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo 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 una condición celular denominada "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 (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 su capacidad de producir proteínas correctamente plegadas para disminuir la acumulación y la carga de proteínas mal plegadas y disfuncionales dentro del RE (Revisado en 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 et al., 2008).

Existen proteínas transmembranas alojadas en el 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 α por su ubicuidad, PERK (del inglés *PKR-like ER kinase*) y ATF6 (del inglés *activating transcription factor 6*) (Fig. 3) (revisado en Ron y Walter, 2007). Estas proteínas transducen la información acerca del estado de plegamiento 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 (revisado en Hetz, 2012).

IRE1 α 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; Lee et al, 2002), la cual transloca al núcleo

y controla la inducción 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 (Lee et al., 2003; Acosta-Alvear et al., 2007). IRE1 α 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 α 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 et al., 2008).

La activación de la quinasa PERK conlleva a la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α (del inglés, *eukaryotic Initiation Factor 2 α*), 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 et al., 2008; Kouroku et al., 2007; Rouschop et al., 2010) (Fig. 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). De esta manera se han identificado estos y muchos otros componentes de la vía apoptótica relacionada al estrés de RE (revisado en Hetz et al., 2012).

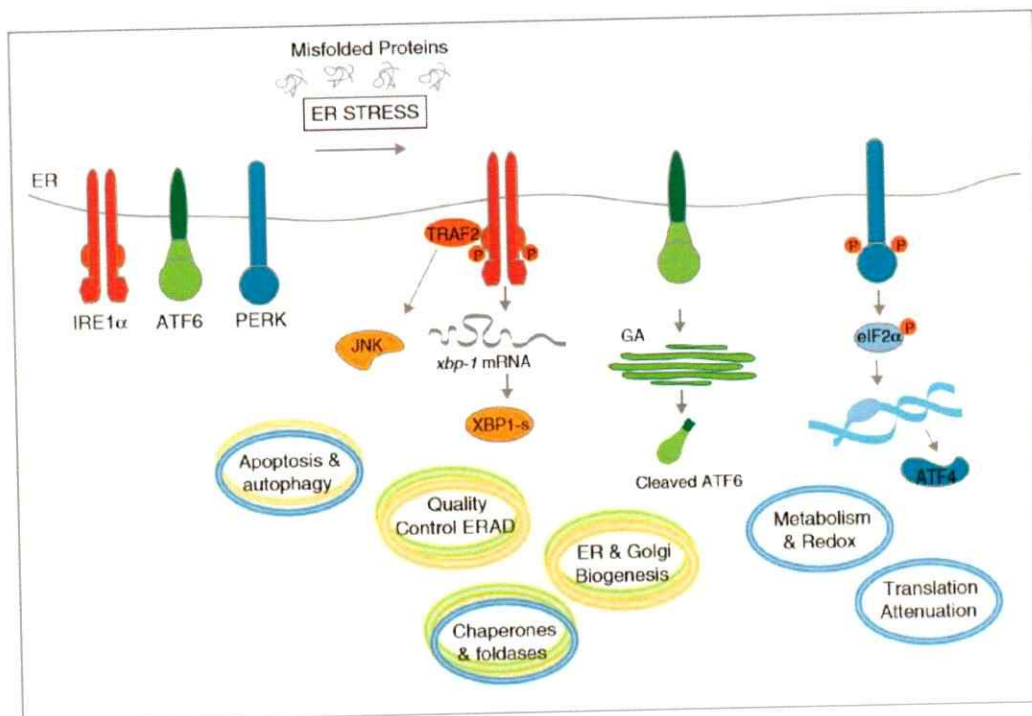


Figura 3. Vías de señalización de la respuesta de proteínas mal plegadas. La UPR (respuesta de proteínas mal plegadas) es gatillada frente a una condición de estrés dada por la acumulación de proteínas con esta conformación en el lumen del retículo endoplasmático. La presencia de sensores de estrés en la membrana de este organelo, IRE1 α , ATF6 y PERK, es clave para el inicio de cascadas de transducción de señales que llevan a la expresión de genes que permitirán el restablecimiento de la homeostasis celular o la activación de vías apoptóticas. Modificado de Matus et al., 2011

2.5. Antecedentes que relacionan las proteinopatías de TDP43 con la UPR

Estudios que muestran diversos análisis de muestras de pacientes con ELA evidencian que el contexto patológico de 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 el tejido mencionado (Hetz et al., 2009).

En estudios *in vivo*, por tanto, 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; Urushitani et al., 2008). 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 (Tobisawa et al., 2003; Wate et al., 2005; Kikuchi et al., 2006). Por otro lado, se ha descrito que en las motoneuronas presentes en la médula espinal de ratones transgénicos para SOD1 mutante, las mitocondrias tienen una capacidad 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).

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 sobrepresan FUS mutante (Farg et al., 2012). FUS es una proteína que presenta

características muy similares a TDP43, 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 (Neumann et al., 2006; Kwiatkowski et al., 2009; Sproviero et al., 2012) (Tabla 1).

Hasta la fecha se han publicado muy pocos estudios que relacionen condiciones de estrés de RE con la patogénesis neurológica ligada a TDP43, por lo que es un campo muy abierto a ser explorado. Si bien se ha documentado la presencia de inclusiones positivas para TDP43 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 generada como una consecuencia de un defecto sistémico de otra fuente como la alteración de la función de TDP43 como regulador, determinada por una ganancia o pérdida de función, o quizás estaría influyendo un efecto pleiotrópico más complejo (revisado en Lee et al., 2011).

Se puede resaltar que en el año 2012 se publicó un estudio *in vitro* que muestra que la sobreexpresión leve de TDP43 en células NSC34, HeLa y MEF causa muerte neuronal mediada por la regulación positiva de Bim y la regulación negativa de Bcl-xL, proteínas proapoptótica y antiapoptótica respectivamente y ambas miembros de la familia BCL-2, (Suzuki et al., 2012). Por otro lado, se observó un aumento en la expresión de CHOP, un blanco proapoptótico de la UPR (Puthalakath et al., 2007). CHOP es principalmente regulado por la activación de la UPR, más específicamente por la vía PERK/eIF2 α /ATF4 (Marcniak et al., 2004), sin embargo en este trabajo no se observan marcadores de esta vía. Por lo tanto los autores sugieren que TDP43

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 TDP43 con la UPR (Tong et al., 2012). En este estudio se utilizó un modelo de rata que sobreexpresa la TDP43 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 observan inclusiones ubiquitinadas, pero no positivas para TDP43 en neuronas de la corteza frontal e hipocampo. Además, observaron 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 demostraron que la disminución en la expresión de estas proteínas se correlaciona con el inicio de la sobreexpresión de la TDP43 humana mutante. Por lo tanto, en este trabajo se postula que la sobreexpresión de TDP43 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 por microscopía electrónica se detectó una degeneración que afecta por completo la integridad del aparato de Golgi y el RE, lo cual es un factor crucial a considerar en una eventual respuesta a una condición de estrés de RE.

Es importante mencionar también la relación que podría tener TDP43 con blancos de la UPR en el contexto neurodegenerativo. La familia de las PDIs ha sido bien caracterizada como blancos de esta vía de respuesta celular (revisado en Andreu et al., 2012). Las PDIs corresponden a una familia de foldasas y chaperonas mayormente localizadas en el lumen del RE que tienen como función catalizar la

formación e isomerización de los puentes disulfuros, facilitando de esa manera el plegamiento de las proteínas. Además, las PDIs están involucradas en importantes funciones fisiológicas como control de calidad (Hagiwara y Nagata, 2012; Hosoda et al., 2009), muerte celular (Wang et al., 2010; Lovat et al., 2008) y señalización (Coe et al., 2010; Turano et al., 2011). Dado que el mal plegamiento de las proteínas al interior del RE está involucrado en enfermedades neurodegenerativas (revisado en Matus et al., 2011), las PDIs tienen mucha relevancia en los contextos patológicos. Existe evidencia que muestra que la expresión alterada de las PDIs es una característica común y prevalente en enfermedades neurodegenerativas (revisado en Benham, 2012). En el contexto patológico de ELA se ha descrito que en pacientes esporádicos hay una inducción de la expresión las PDIs (Atkin et al., 2008; Hetz et al., 2009), y este fenómeno también se ha observado en modelos animales transgénicos de SOD1 mutante (Atkin et al, 2006; Hetz et al, 2009).

Se ha sugerido que PDI (PDIA1), proteína miembro de esta familia, podría interactuar con TDP43 en el contexto de ELA (Honjo et al., 2011), 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 TDP43 junto a ERp57 (PDIA2), otro miembro de las disulfuro-isomerasas, como biomarcadores de la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica desde muestras de células mononucleares de sangre periférica provenientes de pacientes (Nardo et al., 2011).

Dada la importancia del estudio de TDP43 en la investigación de los mecanismos que dan origen a la ELA y también a la DLFT, en esta tesis se caracterizará el primer modelo murino transgénico de hTDP43 publicado con la

mutación A315T (Wegorzewska et al., 2009) con el objetivo de conocer en detalle su deterioro a nivel fenotípico y explorar cambios a nivel molecular, en relación a una posible condición de estrés de RE, respecto de las condiciones basales. En la publicación de este modelo murino (Wegorzewska et al., 2009) no se muestra una caracterización cabal de los posibles fenotipos motores y/o cognitivos que podría presentar este animal transgénico. Por otro lado, en este modelo no se han realizado análisis de marcadores de estrés de RE o de activación de la UPR. Por lo tanto, esta aproximación será muy importante para el futuro estudio del rol de TDP43 en las enfermedades neurodegenerativas como ELA y DLFT, para así evaluar las características de este modelo proyectando a eventuales pruebas de terapia a nivel preclínico.

3. HIPÓTESIS

La sobreexpresión de TDP43 mutante humana en ratones, la cual ha sido asociada a neurotoxicidad, genera cambios conductuales y motores asociados a una condición de estrés de retículo endoplasmático.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Caracterizar el efecto de la sobreexpresión de la proteína TDP43 humana con la mutación A315T en el sistema nervioso central de un modelo de ratón, tanto a nivel fenotípico como molecular.

4.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar la progresión de la enfermedad del modelo murino a través del monitoreo de peso y pruebas de comportamiento.
- Caracterizar histológicamente la sobreexpresión de TDP43 en tejidos de corteza los ratones TDP43^{A315T}
- Evaluar la posible activación de la respuesta de proteínas mal plegadas en extractos de corteza y medula espinal de ratones transgénicos para la TDP43^{A315T}

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Mantención de colonias de ratones TDP43^{A315T} y genotipificación

El modelo utilizado corresponde a ratones transgénicos que sobreexpresan la forma humana mutante de TDP43, 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 por completo gracias a la presencia 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).

Se ha descrito que los ratones hemicigóticos 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 DLFT con agregados ubiquitinados (Wegorzewska et al., 2009). Para la amplificación de colonias se realizaron cruzas 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.

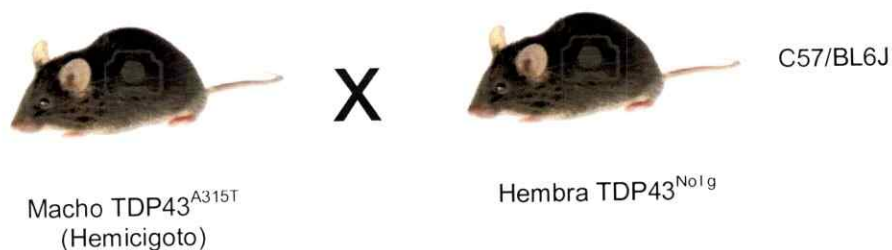


Figura 4. Esquema del proceso de cruce para amplificar la colonia TDP43^{A315T}. Como protocolo establecido para las colonias de modelos murinos de ELA o de enfermedades motoras, se cruza un macho transgénico (el que se enfermará) con una hembra WT para evitar problemas en el nacimiento de las crías. 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 μ L de buffer de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl y 1% SDS) y 6 μ 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 min y el sobrenadante fue mezclado con 450 μ 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 μ L de ADN se incubó con 12,5 μ L de Go Taq Master Mix (Promega) y 1 μ M de cada partidor para un volumen final de 25 μ 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 bromuro de etidio a una concentración de 1 μ g/mL 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 TDP43^{A315T}, la medición se hizo hasta el día de su eutanasia o muy cerca de la edad de muerte. Dentro de los ratones TDP43^{NoTg} (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 rotarod

Al igual que como fue llevado a cabo el monitoreo de peso, la prueba motora de rotarod (Modelo LE8500, Panlab SL) se realizó por lo menos dos veces a la semana a los animales a partir de los 37 días de edad hasta el día de eutanasia o el más cercano a su muerte. Se utilizó la modalidad acelerada, donde la rueda giratoria aumenta desde 4 a 40 RPM en 2 minutos. Previamente los animales se entrenaron por tres días consecutivos y tres veces al día promoviendo su aprendizaje y equilibrio primero a una velocidad constante de 4 RPM y luego a 10 RPM.

5.2.3. 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 bajar por la barra vertical en un tiempo menor a 30 segundos.

5.2.4. Prueba motora de la grilla invertida

Los ratones se colocaron de forma individual en una grilla en posición invertida y a una altura de unos 140 cm desde el piso, con el objetivo de que utilicen sus cuatro

extremidades para sostenerse en la rejilla. El tiempo de latencia se tomó para cada ratón dejando como máximo 60 segundos, tiempo en que se daba como por superada la prueba para el animal.

5.2.5. Prueba cognitiva de condicionamiento del miedo

Los animales se trasladaron al bioterio donde está ubicado el equipo que permite el desarrollo de esta prueba cognitiva una semana antes que la prueba fuera realizada, con el objetivo de que pudiesen ambientarse al lugar. Para la prueba, los ratones se colocaron de forma independiente en una cámara que posee una rejilla en su interior (PanLab) y que se encuentra conectada a un programa computacional (Freezing 1.8). Los animales caminaron sobre esta rejilla y sus movimientos se sensoron, se presentaron gráficamente en el programa y se cuantificaron en tiempo efectivo. Por otro lado, el dispositivo que incluye a la cámara está conectado a un equipo controlador de electricidad que permite la descarga de choques eléctricos desde la rejilla, los que se utilizaron como estímulos para los animales (Inoue et al., 2009). La prueba constó de tres etapas separadas por 24 h una de la otra. En la primera, la habituación sólo se sensó el movimiento basal del ratón dentro de la cámara sin propiciarle ningún estímulo por 3 minutos. En la segunda etapa, el entrenamiento, los animales se sometieron a tres estímulos de choque eléctrico con una duración de 1 segundo cada uno y separado por 1 minuto entre cada cual, seguidos de 4 minutos sin ningún choque. Por último, el tercer paso se llevó a cabo la medición del comportamiento de los ratones después de la experiencia del entrenamiento, donde sólo se registró el movimiento por 5 minutos sin ningún tipo de estímulo.

5.3. Análisis histológico de muestras de tejido de corteza frontal

5.3.1. Perfusión de animales y cortes de tejido

Los ratones transgénicos de TDP43 se anestesiaron en su período sintomático tardío junto con sus respectivos controles TDP43^{NoTg} (no transgénicos) de la misma edad. Para esto se utilizó una solución 6 μ L 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 y 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) y utilizando un criostato (Leica) se realizaron cortes de 40 μ m de espesor desde posterior hacia anterior iniciando en bregma (coordenada 0 fijada en el atlas de cerebro de ratón de Franklin y Paxinos, 2001).

5.3.2. Inmunofluorescencia de tejido

Para el análisis de inmunofluorescencia se realizó todo el protocolo en cortes flotantes de cerebro de ratón de 40 μ m 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-TDP43, 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) 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 montaron en medio Fluoromount (Electron Mycroscope Science) y se cubrieron por un cubreobjeto sellado con cutex, 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 captaron con la cámara QImaging QICAM Fast 1934.

5.4. Análisis bioquímico de muestras de tejido de corteza frontal y médula espinal

5.4.1. Extracción de proteínas

Los tejidos de corteza y médula espinal se homogenizaron en 100 µL de PBS frío suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). Una parte de este homogenizado se llevó a 100 µL (en extractos de corteza) y 50 µL (en extractos de médula) de PBS 1% Tritón X-100 para el caso de experimentos en los cuales podrían observarse agregados o RIPA 2X (20 mM Tris [pH 8,0], 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 % DOC y 0,5 % Tritón X-100), para ver niveles de distintas proteínas. En el caso de la corteza, 60 µL del homogeneizado se llevaron a la solución tampón, en tanto que para la médula se tomaron 30 µL. Ambas soluciones tampones con detergentes, PBS 1% Tritón X-100 y RIPA, tenían incorporados el cóctel de inhibidores de proteasas. Posteriormente, las muestras se sonicaron 3 veces por 5 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 µg del total de proteínas, se incubaron con DTT a una concentración final de 100 mM por 10 min 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.

5.4.2. 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 min en hielo. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en PBS por 30 min 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-TDP43 (1:2000, ProteinTech Group), anti-ERp57 (1:1000, Santa Cruz), anti-HSP90 (1:3000, Santa Cruz), anti- β actina conjugada a HRP (1:2000, Cell Signaling). Las membranas se lavaron 6 veces por 5 min con PBS-tween al 0,1% y luego incubadas con el anticuerpo secundario anti-rabbit-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 min. Finalmente, se revelaron mediante el kit ECL Substrate

Western Blotting (Pierce) y filmes Super HR-U photographic (Fujifilm). Para cuantificar los niveles de proteínas obtenidos, las intensidades de las bandas se calcularon usando el programa computacional ImageJ. Para todos los anticuerpos se normalizó en el mismo film con respecto al menor valor obtenido en las muestras de líneas no transgénicas (TDP43^{Notg}) y posteriormente con respecto a los controles de carga HSP90 y β actina para observar diferencia en niveles.

5.4.3. Extracción de ARN y generación de ADN complementario

Los tejidos de corteza y médula espinal se homogenizaron en 100 μ L de PBS frío suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). Un volumen de 30 μ L se transfirió a 600 μ L 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 μ g 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 μ L de transcriptasa reversa en un volumen final de 20 μ L. El programa para esta reacción RT fue: 25°C por 5 minutos, 44°C por 45 minutos y 85°C por 5 minutos.

5.4.4. 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 μ M en 25 μ L de reacción):

xbp-1t sentido 5'-AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC-3', *xbp-1t* antisentido 5'-GGATCTCTAAACTAGAGGCTTGGTG-3'.

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

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

El producto de *xbp-1* 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 *xbp-1u* (*unspliced*, no procesado) que permite el corte del producto en la mitad de su secuencia, entregando productos de 300 pb. Los productos de PCR (*xbp-1* con la digestión PstI y *actina*) se analizaron a través de electroforesis en geles de agarosa ultrapura al 2,5% con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL a 100 V.

5.4.5. PCR en tiempo real

Se utilizó el sistema "*Light Cycler*" (Stratagene) empleando la sonda fluorescente SYBRgreen (Agilent Technologies) con un volumen de reacción por muestra de 20 µL. Se utilizaron los pares de partidores:

erp57 sentido 5'-GAGGCTTGCCCCTGAGTATG-3', *erp57* antisentido 5'-GTTGGCAGTGCAATCCACC-3', *actina* sentido 5'-TACCACCATGTACCCAGGCA-3', *actina* antisentido 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'.

5.5. 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 cumplieran con la normalidad se utilizaron pruebas paramétricas como t-Student y ANOVA de dos vías (para los casos de datos

agrupados). En el caso del análisis de datos que no cumplieran 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. Presentación e identificación del modelo murino transgénico TDP43^{A315T}

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó un modelo murino que sobreexpresa la proteína TDP43 humana con la mutación A315T en el SNC (Wegorzewska et al., 2009), generado con el objetivo de estudiar las características de la proteinopatía de TDP43 observada en pacientes con ELA y DLFT-U. El constructo que posee el animal transgénico contiene una secuencia de ADNc que codifica para la proteína TDP43 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 una etiqueta *flag* en el extremo N-terminal (Fig. 5A) y su expresión está dirigida por un promotor priónico de origen murino (PrPm) que permite la sobreexpresión del transgén, en relación a los niveles de TDP43 endógeno, exclusivamente en el SNC.

Los animales experimentales transgénicos para TDP43 (TDP43^{A315T}) se generaron mediante cruces de animales silvestres (TDP43^{NoTg}) y TDP43^{A315T}, por lo que todos los animales sólo portaron un alelo mutante. Para identificar los genotipos de los animales obtenidos, se realizó PCR convencional utilizando los parámetros

especificados en Materiales y Métodos. Los partidores utilizados en la mezcla de reacción (aquéllos denominados 9442 y 9443) reconocen una secuencia específica del transcrito de TDP43 humano, es decir sólo amplifican el transgén generando un producto de un tamaño de 400 pb. 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 (Fig. 5B). La razón de nacimientos y la distribución genotípica obtenida a partir de las cruas realizadas se muestra en la tabla 4.

En edades jóvenes, luego del destete que se realiza a los 21 días de vida, los ratones TDP43^{A315T} mostraron una apariencia fenotípica completamente normal sin diferenciarse de los ratones TDP43^{NoTg}. Sin embargo, transcurridas 14 semanas aproximadamente, se comienzan a evidenciar signos que muestran algún tipo de deterioro, asociado a la patología ELA/DLFT tal como fue publicado previamente (Wegorzewska et al., 2009). En estos animales, se puede detectar una baja de peso corporal, curvatura de la columna (Fig. 5C), caída de las extremidades posteriores (Fig 5D), dificultades en el desplazamiento, pero nunca un desarrollo de parálisis total, a diferencia de otros modelos de ELA como los transgénicos de SOD1 mutante (Gurney et al., 1994; Ripps et al, 1994). Finalmente, los ratones fueron sacrificados cuando se observó una baja brusca del peso e inmovilidad. Dentro de los animales analizados, se observó que la sobrevivencia es diferenciada en cuanto a grupos de género; los machos TDP43^{A315T} muestran un promedio de sobrevivencia de 88 ± 2 días y las hembras TDP43^{A315T} de 138 ± 9 días. (Fig. 6A y 6B).

Tabla 4. Razón de nacimientos de la colonia de animales TDP43^{A315T}. Se calculó la distribución genotípica en porcentajes de las crías obtenidas de las cruas, llevadas a cabo para amplificar la colonia en estudio (ver Materiales y Métodos). Se puede observar que el porcentaje de hembras TDP43^{A315T} es menor al resto de los grupos experimentales.

	Machos TDP43 ^{NoTg}	Machos TDP43 ^{A315T}	Hembras TDP43 ^{NoTg}	Hembras TDP43 ^{A315T}	Total
N° Observado	32	36	51	28	147
% Esperado	21,8	24,5	34,7	19,0	100
% Observado	25	25	25	25	100

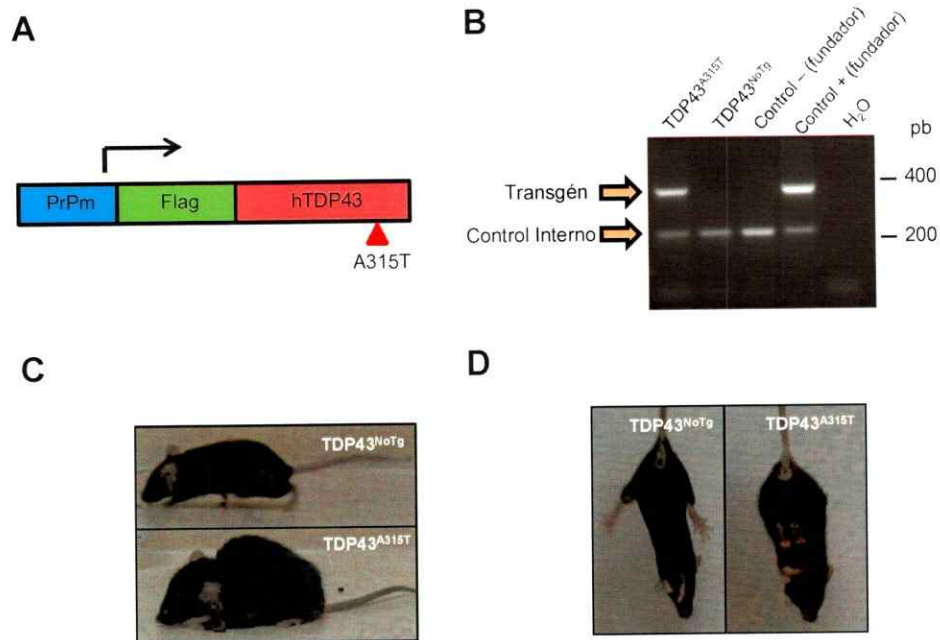
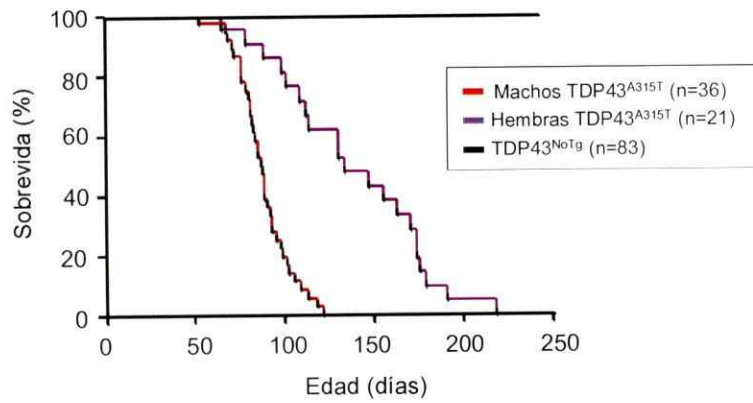


Figura 5. Presentación del modelo murino transgénico TDP43^{A315T}. (A) Diagrama esquemático que representa al constructo que contiene al transgén TDP43 humano con la mutación A315T; en él un ADNc contiene la secuencia de esta proteína (sección en fucsia) y además la secuencia de *flag* que cumple la función de marcador o "etiqueta" (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 TDP43^{A315T}. Se utilizó un par de partidores que reconoce la secuencia del transgén que arroja una banda de 400 pb y permite detectar ratones transgénicos. Además se agrega en todas las reacciones un par de primers como un control interno de la reacción, detectado como una banda de 200 pb en todas las muestras. (C) Fotografía que muestra el fenotipo patológico un ratón TDP43^{A315T} en etapa sintomática tardía comparando con su hermano no transgénico (TDP43^{NoTg}) de la misma edad (179 días, género femenino). (D) Se muestra la caída de las extremidades posteriores del ratón transgénico en su estado sintomático, contrastada con su hermano TDP43NoTg en el cual pueden verse sus extremidades extendidas.

A



B

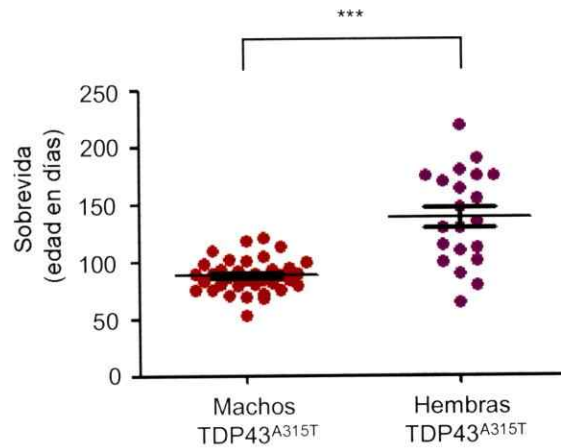


Figura 6. Sobrevida del modelo murino TDP43^{A315T}. (A) Curva de sobrevida para los ratones TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T}. Todos los animales TDP43^{NoTg} sobrevivieron más allá de los 200 días. En el caso de los animales transgénicos se separaron los datos de machos y hembras, lo cual permite observar la diferencia de sobrevida entre ambos grupos ($p = 0,0004$, prueba Mantel-Cox). Los machos TDP43^{A315T} tienen un promedio de sobrevida de 88 días y las hembras TDP43^{A315T} un promedio de 138 días. (B) Gráfico de distribución que permite comparar de otra forma la diferencia de la sobrevida entre machos ($n = 37$) y hembras TDP43^{A315T} ($n = 21$). (***) $p < 0,001$ prueba t-student no pareada).

6.2. Caracterización del fenotipo patológico motor del modelo murino transgénico TDP43^{A315T}

Con el objetivo de caracterizar el efecto patológico de la sobreexpresión de la TDP43 humana mutada en el SNC, se realizaron de manera sistemática mediciones de peso y tres tipos de pruebas motoras (ensayo de rotarod, *hanging* y grilla invertida) a lo largo de la vida de los ratones. Recolectando la información correspondiente a cada animal se monitoreó la progresión de la enfermedad. Dado que en la sobrevida se vieron diferencias significativas entre machos y hembras transgénicas, todos los análisis de los datos de la progresión de la enfermedad, ya sea de peso o fenotipo motor, se realizaron separando por genotipo y por género. Es importante señalar que los controles TDP43^{NoTg} que se utilizaron en todas las comparaciones son provenientes de la misma colonia.

6.2.1. Caracterización por parámetro de caída de peso corporal

Las mediciones de peso se llevaron a cabo a cada ratón (TDP43^{A315T} y controles TDP43^{NoTg}) tres veces a la semana. Cada progresión de peso corporal se graficó de forma individual (no mostrado) y posteriormente se graficaron las curvas promedio de cada grupo (Fig. 7A).

Los registros sistemáticos de peso corporal son recurrentemente utilizados como parámetro para establecer el inicio aproximado de una enfermedad en los modelos murinos (Weydt et al., 2003; Lüesse et al., 2001; Young et al., 2009). Se hizo un análisis individual de la caída del peso corporal de cada ratón TDP43^{A315T} para fijar el inicio de la enfermedad, el cual fue definido como el primer día en que se observa una baja del 2,5% o más del peso máximo registrado del ratón. Este criterio se estableció dada la característica del cambio de pendiente de las curvas de peso

corporal, en términos de porcentaje promedio. De los ratones analizados, puede decirse que existió una diferencia significativa entre machos y hembras transgénicas (Fig. 7B), donde los machos evidencian un inicio de la enfermedad promedio a los 72 ± 3 días de edad y las hembras a los 112 ± 9 . Además, se determinó la duración de la enfermedad de cada ratón monitoreado y fue un parámetro que se definió por la cantidad de días desde el inicio de la enfermedad hasta última medición de peso previo al sacrificio del ratón. En este caso no se observó una diferencia significativa entre machos y hembras TDP43^{A315T} (Fig. 7C).

Por otro lado, se determinó la severidad de la enfermedad que presentaban los grupos transgénicos, y una forma cuantificable de llevarlo a cabo fue obteniendo las pendientes de las curvas de regresión lineal desde el punto de inicio de la enfermedad hasta el día de última medición previa a la muerte por eutanasia (Fig. 8A). Como parte de la caracterización y con el objetivo de representar la diferencia fenotípica y validar el modelo, se comparó la severidad de la enfermedad con las pendientes de las curvas de peso de los controles TDP43^{NoTg} (Fig. 8B). Dado que los animales TDP43^{NoTg} no se enferman se calcularon las pendientes de las curvas de progresión desde el punto de inicio de la enfermedad promedio de cada grupo de género (en el caso de los machos 72 días y de las hembras 112 días). La distribución de las pendientes de las curvas de progresión de los cuatro grupos experimentales fue graficada y se observa una diferencia significativa entre las pendientes de los animales TDP43^{A315T} respecto a los de los TDP43^{NoTg} tanto en machos como en hembras, donde es posible detectar las caídas de pendiente en los TDP43^{A315T}; dando cuenta de la existencia de una baja de peso corporal progresiva asociada a una patología en estos ratones. Por otro lado, no hay diferencia significativa entre las pendientes de las curvas de machos y hembras

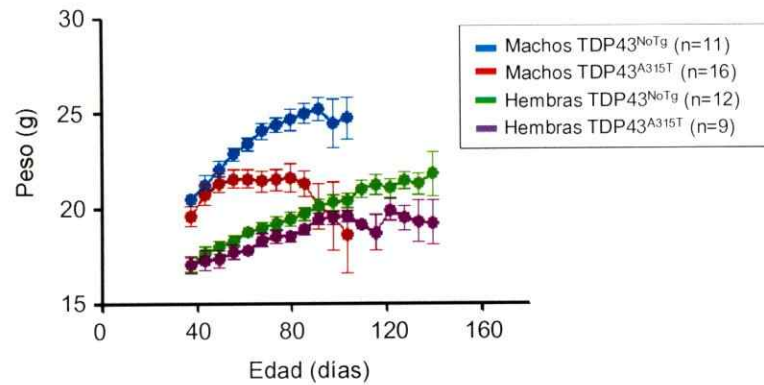
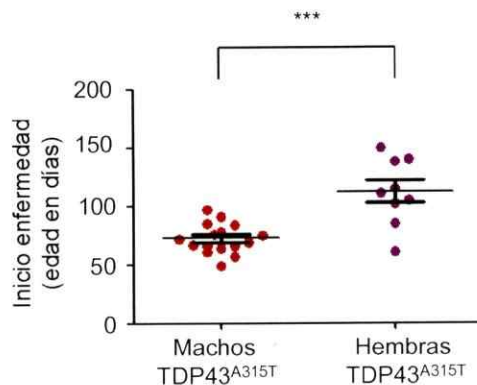
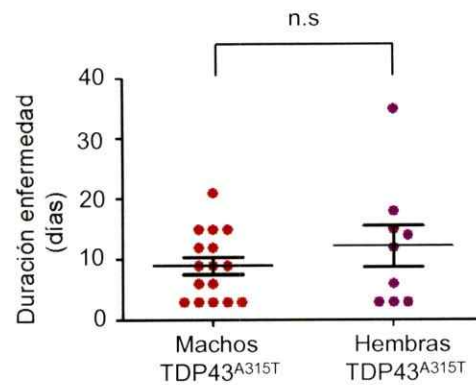
A**B****C**

Figura 7. Caracterización del fenotipo del modelo TDP43^{A315T} bajo el parámetro de medición de peso. (A) Curvas promedio de progresión de peso. Con el fin de llevar un seguimiento del estado fisiológico de los ratones se realizaron mediciones de peso corporal 2 veces por semana, comenzando a la edad de 37 días hasta los 100 días aproximadamente en el caso de los machos TDP43^{NoTg} (n = 11, curva azul) y TDP43^{A315T} (n = 16, curva roja) y hasta los 140 días aproximadamente en el caso de las hembras TDP43^{NoTg} (n = 12, curva verde) y TDP43^{A315T} (n = 9, curva morada). (B) Gráfico de la edad del inicio de la enfermedad de los ratones TDP43^{A315T} detectado por las mediciones de peso y las progresiones individuales. El inicio aproximado de la enfermedad en cada curva de progresión se definió como el primer día en que se mide una baja mínima del 2,5% del máximo peso detectado. Se realizó comparación de la distribución entre machos y hembras. Los machos arrojaron un inicio de la enfermedad promedio a los 72 días de vida mientras que las hembras a los 112 días, otorgando una diferencia significativa (***) p<0,001; prueba t-student no pareada). (C) Gráfico de los días de duración de la enfermedad de los ratones TDP43^{A315T}. Se calcularon los días de vida desde el inicio de la enfermedad (definido en B) hasta el día de muerte del ratón e igualmente se realizó una comparación de distribución entre machos y hembras. Los machos arrojaron un promedio de 9 días y las hembras uno de 13, sin embargo no se observó diferencia significativa entre machos y hembras transgénicos (no significativo p > 0,05; prueba t-student no pareada).

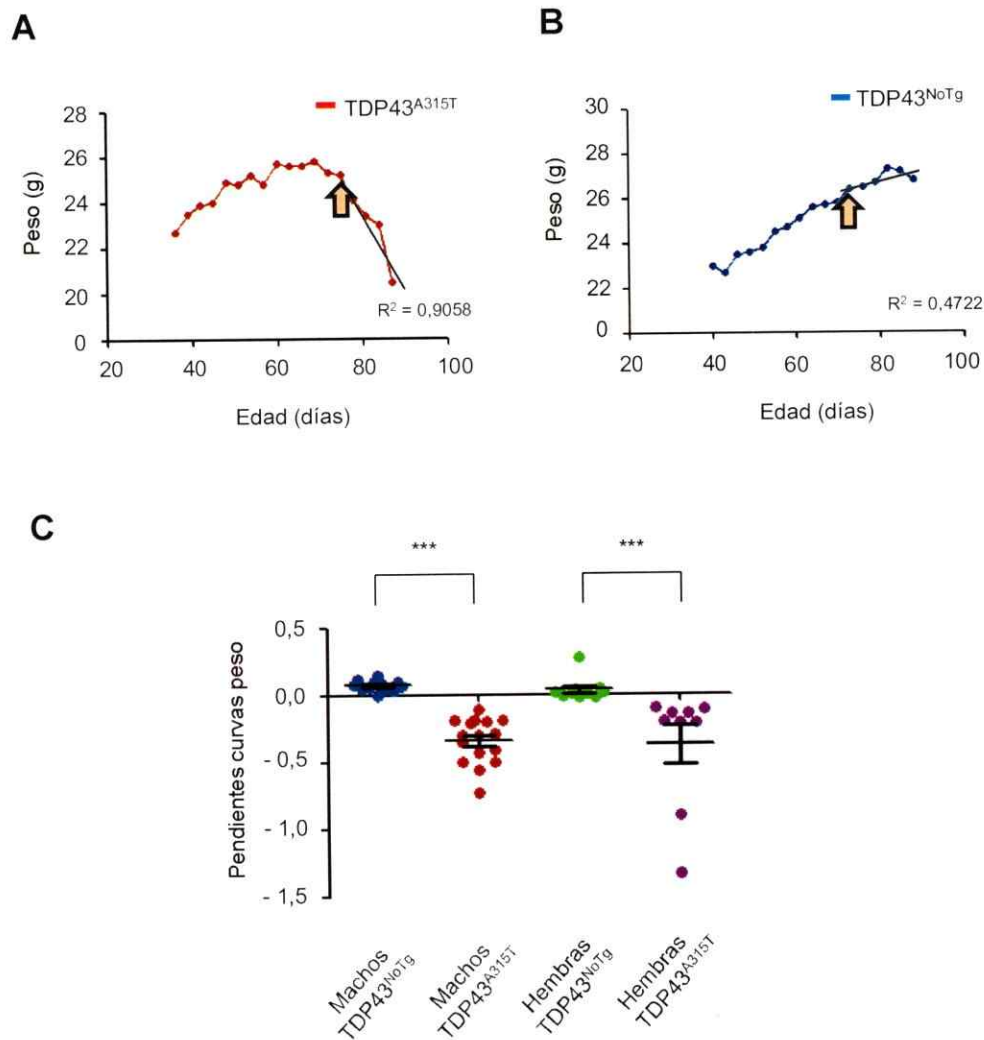


Figura 8. Medición de la severidad de la enfermedad a través de las curvas de progresión de peso individuales del modelo TDP43^{A315T}. Con el fin de determinar con algún método la severidad sintomática de la enfermedad una vez que ésta se hace evidente en el modelo transgénico, se calcularon las pendientes de todas las curvas de progresión de peso de cada ratón desde el inicio de la enfermedad (definido en Fig. 7 (B)) hasta su muerte; y se muestra el ejemplo en (A). Para el caso de los animales TDP43^{NoTg} se definió el criterio de calcular las pendientes desde el inicio de la enfermedad promedio de machos (72 días) y hembras (112 días) según correspondiera, mostrándose el ejemplo en (B). La distribución de las pendientes calculadas de los cuatro grupos experimentales se muestran en (C); se observó una diferencia significativa entre machos TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} (***, $p < 0,001$; prueba t-student no pareada) y entre hembras TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} (***, $p < 0,001$; prueba no paramétrica Mann-Whitney). Debido a la diferencia en la supervivencia y en el inicio de la enfermedad entre machos y hembras TDP43^{A315T} se compararon estas pendientes entre estos dos grupos y no se observó diferencia. (no significativo $p > 0,05$; prueba no paramétrica Mann-Whitney)

TDP43^{A315T}, mostrando que no existe disimilitud en la severidad de la enfermedad en los ratones transgénicos separados por poblaciones de género (Fig. 8C).

6.2.2. Caracterización por pruebas motoras

Con el fin de caracterizar la progresión de la enfermedad se evaluó el desempeño de los ratones a través de distintas pruebas motoras y posteriormente se correlacionó con la aparición del fenotipo patológico. La prueba de rotarod se realizó en modo acelerado, registrando mediciones de los tiempos de latencia de los animales en una rueda giratoria al menos dos veces a la semana una vez entrenados (Fig. 9A). Con los datos obtenidos, al igual como se hizo con las mediciones de peso, se graficaron las progresiones individuales. Las mediciones mostraron una gran variabilidad en el desempeño motor dentro de un mismo animal y también al comparar con sus símiles, por lo que no se pudo determinar un inicio de la enfermedad con este parámetro. A pesar de esto, se vio una tendencia al comparar las curvas individuales entre los distintos genotipos. Al igual que con las mediciones de peso, se calculó la severidad de la progresión de la enfermedad calculando las pendientes de las progresiones individuales y se realizó un gráfico comparativo de distribución (Fig. 9D). En el caso de las curvas de los ratones TDP43^{A315T} de forma cualitativa fue posible ver un empeoramiento en el desempeño de la prueba con el transcurso del tiempo, en consecuencia las pendientes se calcularon desde el punto de mayor latencia registrado (que se considera como el punto de registro donde el animal aprendió a equilibrarse y permanecer en el rotarod) hasta el último día de vida (Fig. 9B). En las curvas de los ratones TDP43^{NoTg} no se observó caída, sino que una tendencia a la estabilidad y en algunos casos un aumento progresivo del tiempo de latencia, por lo que en todas ellas se calculó la pendiente a partir de la tercera medición, asumiendo que en ese momento

ya existe aprendizaje de la prueba motora (Fig. 9C). Al comparar las pendientes de las curvas de los desempeños de ratones TDP43^{A315T} con sus controles TDP43^{NoTg} se observó una diferencia significativa tanto en machos como en hembras, evidenciando el empeoramiento progresivo de las habilidades motoras de los ratones que sobreexpresan la mutante de TDP43. Además, se compararon las pendientes de las curvas entre machos y hembras TDP43^{A315T} y no se observó diferencia (Fig. 9D).

La segunda prueba motora que se realizó es la denominada "*hanging*", la cual consiste en la medición de la habilidad del ratón para bajarse de una barra horizontal en un lapso de 30 segundos (Fig. 10A) y el desempeño es determinado por un puntaje de unidades arbitrarias (Fig. 10B). Al igual que los análisis anteriores se graficaron las progresiones individuales (no mostrado), y se promediaron las curvas en los cuatro grupos experimentales con el fin de ver el patrón general. Se compararon las curvas entre machos TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} (Fig. 11A), y entre hembras TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} (Fig. 11B). Se encontró que los ratones TDP43^{NoTg} son capaces de alcanzar puntajes altos que son mantenidos en el tiempo con poca variabilidad, mientras que los transgénicos logran alcanzarlos sólo en estadios tempranos, pero luego empeoran su desempeño (disminuyen los puntajes) conforme los fenotipos motores patológicos comienzan a manifestarse. También se calcularon los promedios del desempeño completo de cada animal y se compararon esos datos en un gráfico de distribución para los cuatro grupos experimentales (Fig. 11C). Dentro de los grupos de machos y hembras existe una diferencia significativa entre los animales TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T}, detectándose en los últimos un peor desempeño que sus controles. No se observaron diferencias significativas entre machos y hembras TDP43^{A315T}.

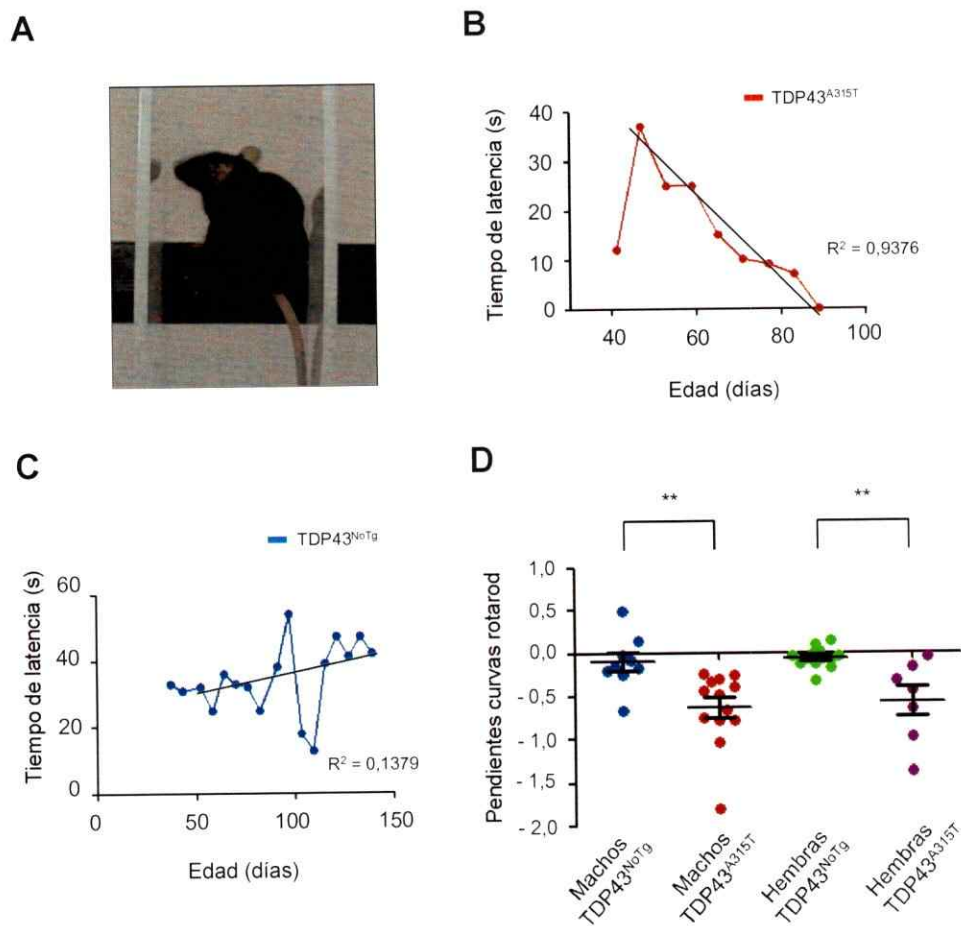
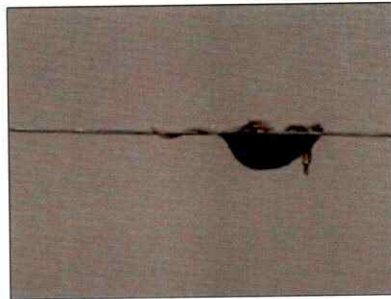


Figura 9. Caracterización del fenotipo motor del modelo TDP43^{A315T} por medio de la prueba de rotarod. (A) Se realizó la prueba motora de rotarod con el modo acelerado realizando mediciones de 2 veces por semana como mínimo comenzando a la edad de 37 hasta los 100 días aproximadamente en el caso de los machos TDP43^{NoTg} (n = 9) y TDP43^{A315T} (n = 13) y hasta los 140 días aproximadamente en el caso de las hembras TDP43^{NoTg} (n = 13) y TDP43^{A315T} (n = 7). Al igual que en el parámetro de peso, como parte del monitoreo de rutina se realizaron curvas de progresión del desempeño de los ratones a partir del tiempo de latencia en el cilindro giratorio, sin embargo por la alta variabilidad obtenida en los datos no fue posible determinar inicio de la enfermedad como un dato exacto. Para las curvas de los ratones TDP43^{A315T} se realizó un análisis cualitativo de las curvas obtenidas a partir de la obtención de las pendientes de las curvas desde que el ratón pudo aprender a mantenerse en el rotor (determinado por el punto de mayor tiempo de latencia que logró el ratón) hasta último punto medido previo a su muerte, como se ejemplifica en (B). En el caso de los ratones TDP43^{NoTg} se calculó la pendiente desde la tercera medición, como se ejemplifica en (C). Se comparó la distribución de estas pendientes en (D) entre machos TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} donde se observó diferencias significativas, entre hembras TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} donde también se observó diferencias significativas (** 0,001 < p < 0,01), y entre machos y hembras TDP43^{A315T} donde no se observó diferencia. (no significativo p > 0,05; prueba t-student no pareada).

A



B

Puntaje	Desempeño
0	El ratón cae antes de 10 segundos colgado de la barra
1	El ratón sólo se queda agarrado con las patas delanteras
2	El ratón queda agarrado con las patas delanteras e intenta con las traseras, pero sin tener éxito
3	El ratón utiliza las dos patas delanteras más una ó dos patas traseras para afirmarse en la barra
4	El ratón utiliza las cuatro patas y la cola para afirmarse en la barra
5	El ratón escapa activamente de la barra y desciende por la barra vertical

Figura 10. Descripción de la prueba motora de *hanging*. (A) Cada ratón fue colgado en una barra horizontal y en esa situación se capturó su comportamiento y desempeño con una cámara de video por 30 segundos. Las mediciones se realizaron 1 vez por semana, se analizaron las grabaciones y en base a lo observado se les asignó el puntaje correspondiente (con un máximo de 5, de acuerdo a cómo el ratón intenta escapar desde la barra en ese tiempo). Al igual que los otros parámetros de medición se realizaron curvas de progresión de sus desempeños individuales, desde los 37 días hasta los 100 aproximadamente en machos y hasta los 170 aproximadamente en hembras (no mostrado). (B) Tabla que muestra los puntajes (en U.A.) adjudicados conforme al desempeño observado en cada ratón.

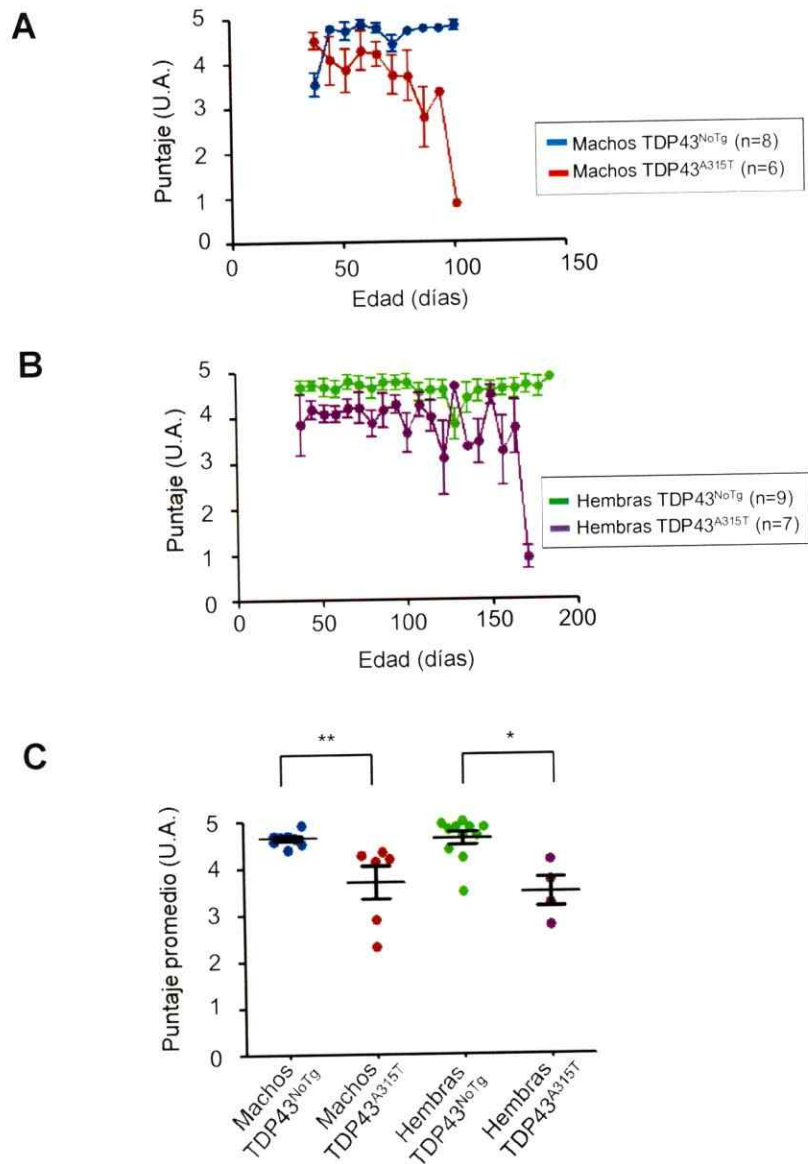


Figura 11. Caracterización del fenotipo motor del modelo TDP43^{A315T} por medio de la prueba de hanging. En (A) y (B) se muestran las curvas promedio de progresión de machos TDP43^{NoTg} (n = 8, curva azul), machos TDP43^{A315T} (n = 6, curva roja), hembras TDP43^{NoTg} (n = 9, curva verde) y hembras TDP43^{A315T} (n = 7, curva morada), cada una con los errores estándar en todos los puntos. (C) Comparación de la distribución del puntaje promedio de todas las mediciones hechas a cada ratón para los 4 grupos experimentales: machos TDP43^{NoTg} (n = 8), machos TDP43^{A315T} (n = 6), hembras TDP43^{NoTg} (n = 9) y hembras TDP43^{A315T} (n = 7). Se observaron diferencias significativas entre TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} en ambos grupos de género, pero no se detectó diferencia entre machos y hembras transgénicas. (** 0,001 < p < 0,01; * 0,01 < p < 0,05; no significativo p > 0,05. Comparación entre grupos de forma independiente con prueba no paramétrica Mann Whitney)

Los datos obtenidos en la prueba de *hanging* presentaron poca variabilidad entre los intentos de una misma medición y también comparando con sus símiles. Por esta razón fue factible determinar un inicio de la enfermedad en las curvas de progresión, parámetro que se definió con el primer punto que compone la caída de la pendiente. El inicio de la enfermedad se detectó fácilmente debido al espacio temporal entre una medición y la siguiente (una semana, ver Materiales y Métodos). Se comparó el inicio de la enfermedad entre machos y hembras TDP43^{A315T} (Fig. 12A) y se observó la misma tendencia que en las progresiones de peso; en las hembras TDP43^{A315T} el inicio de la enfermedad es a una edad mayor que la de los machos. Con esta prueba motora, el promedio en los machos transgénicos fue a los 74 ± 3 días de vida y en las hembras fue a los 129 ± 16 días. A partir de esta información se pudo obtener la duración de la enfermedad (días entre su inicio hasta la última medición previa a la muerte), y al igual a lo observado en las progresiones de peso corporal, no hay diferencia significativa entre machos y hembras TDP43^{A315T} (Fig. 12B).

Otra prueba motora que se realizó fue la denominada "grilla invertida", que consiste en registrar la latencia del ratón en una grilla metálica invertida (Fig. 13A) (ver detalles en sección Materiales y Métodos). Se midieron las progresiones de los desempeños individuales determinados por el tiempo de latencia en el aparato, y los registros fueron hechos dos veces por semana. Desafortunadamente, los datos obtenidos con esta prueba fueron altamente variables y en el caso de muchos ratones TDP43^{Notg} se registraron tiempos de latencia bajos dados por su desprendimiento de la grilla sin evidenciar de algún problema motor con la observación y con el seguimiento de otros parámetros. Por lo tanto, esta condición experimental invalidó la caracterización fenotípica del modelo. De igual forma se graficaron las curvas promedio

y por las razones explicitadas no se observaron diferencias entre TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} tanto en machos como en hembras (Fig. 13B y 13C).

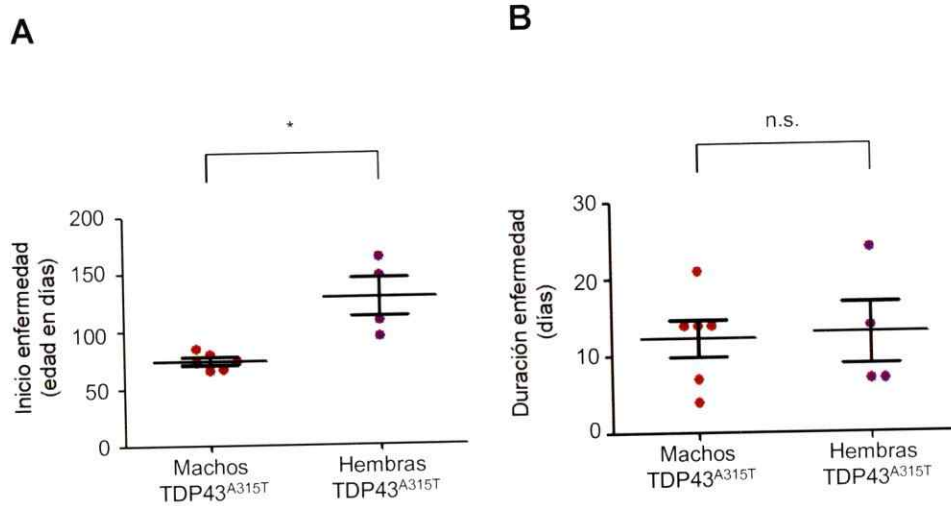


Figura 12. Cálculo del inicio y duración de la enfermedad por medio del parámetro de la prueba de hanging en ratones TDP43^{A315T}. (A) A partir del análisis de las curvas de progresión individuales se detectaron los inicios de la enfermedad eligiendo el primer punto de la caída de la pendiente, fácilmente detectable por la baja variabilidad de los puntajes. Similar al inicio de la enfermedad determinada por la progresión de la medición de peso, el promedio determinado por esta prueba motora fue de 74 días en los machos TDP43^{A315T} (n = 6) y de 129 en las hembras TDP43^{A315T} (n = 4). Además también correlativo al parámetro de peso, se ve que en las hembras TDP43^{A315T} el valor es significativamente mayor al de los machos TDP43^{A315T} (* 0,01 < p < 0,05; prueba no paramétrica Mann-Whitney). (B) Conocidos los inicios de la enfermedad en los animales monitoreados, se calculó la duración de la enfermedad en cada caso y puede verse que no hay diferencias significativas entre machos y hembras TDP43^{A315T} (no significativo p > 0,05; prueba no paramétrica Mann-Whitney).

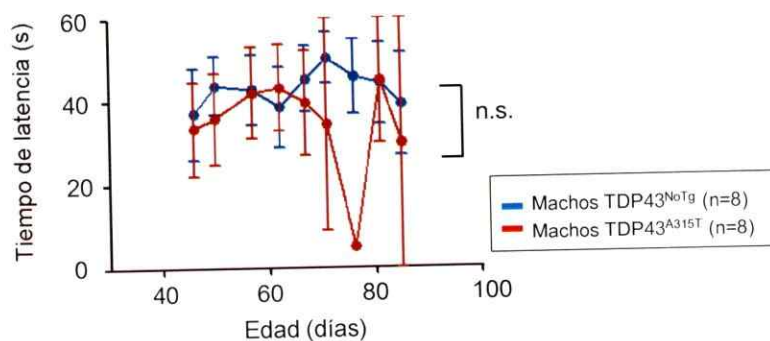
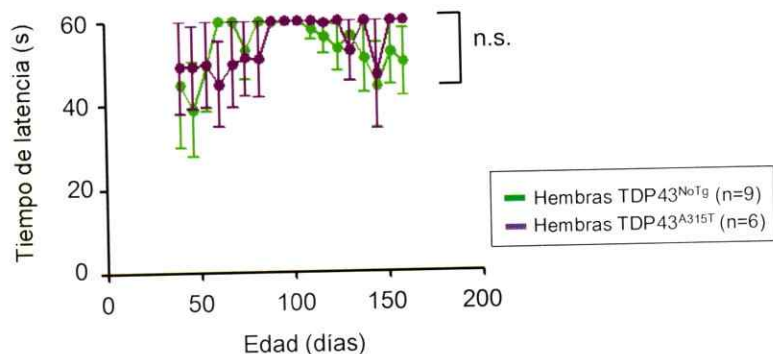
A**B****C**

Figura 13. Caracterización del fenotipo motor del modelo murino TDP43^{A315T} mediante la prueba de la rejilla invertida. (A) Cada ratón fue colgado en una rejilla con la posibilidad de sostenerse con sus 4 extremidades de forma invertida, y se registró su tiempo de latencia hasta un máximo de 60 segundos. Se muestran las curvas promedio de la progresión del desempeño de machos TDP43^{NoTg} (n = 8) y machos TDP43^{A315T} (n = 8) en (B) y de hembras TDP43^{NoTg} (n = 9) y hembras TDP43^{A315T} (n = 6) en (C). No se ven diferencias entre las curvas, sugiriendo que éste no es un buen parámetro de medición para caracterizar este modelo murino. (no significativo p > 0,05; prueba ANOVA de dos vías).

6.3. Evaluación del comportamiento asociado al estado cognitivo en etapa sintomática del modelo TDP43^{A315T}

Con el fin de explorar el fenotipo asociado a una disfunción cognitiva se realizó la prueba de "condicionamiento del miedo". El objetivo de esta experimentación es analizar el comportamiento de los ratones después de la exposición a una situación que les induce temor. Por lo tanto es posible analizar con esta prueba condiciones asociadas a la memoria, aprendizaje (zonas hipocampales) y miedo (zonas del cerebro primitivo como la amígdala) (Clark y Squire, 1998; Goosens y Maren, 2001).

En esta prueba se situaron a los ratones de forma individual en una cámara y sobre una rejilla que se encuentra en su parte interna (Fig. 14A), la cual está conectada a un sensor acoplado a un programa computacional que detecta los movimientos de los animales. El experimento consta de tres etapas separadas por 24 horas (Fig. 14A). La primera etapa corresponde a un proceso de habituación donde se ubica al ratón dentro de la cámara para que pueda reconocer el lugar y así registrar el movimiento basal que presenta el animal; la segunda etapa es el entrenamiento que consiste en la exposición del ratón a tres choques eléctricos desde la rejilla de 1 segundo de duración con el objetivo de provocarle temor; y finalmente la tercera etapa consiste en la evaluación del comportamiento del ratón sin proporcionarle ningún choque con el fin de analizar alguna asociación de reconocimiento del lugar con la experiencia vivida el día anterior. En esta prueba cognitiva, el miedo se relaciona con la inmovilidad o "freezing" del ratón, es decir, cuando éste siente temor muestra un desplazamiento bajo dentro de la cámara. El programa computacional representa el movimiento con *peaks* (Fig. 14B), cuando se detecta mayor movimiento se observan *peaks* más altos y cuando hay

menor movimiento *peaks* más bajos. Por otro lado, es posible fijar un umbral que permita distinguir los estados de *freezing* y cuantificar el tiempo en esas condiciones.

Se realizó esta prueba para analizar un grupo de ratones TDP43^{A315T} (n = 6) en etapa sintomática teórica (machos de 80 días) que no habían mostrado todavía signos de enfermedad evidentes y se compararon con controles TDP43^{NoTg} (n = 6) de la misma edad. Para las tres etapas del experimento, se cuantificó el porcentaje de *freezing* total (Fig. 15A, 15C y 15E) y acumulado con las curvas promedio de ambos grupos (Fig. 15B, 15D y 15F). El porcentaje total promedio de *freezing* en las etapas de habituación, entrenamiento y experimental fue de 15%, 62% y 69% respectivamente en los ratones TDP43^{NoTg} y de 22%, 27% y 31% respectivamente en los TDP43^{A315T}.

En la etapa de habituación no se observó una diferencia significativa entre el grupo TDP43^{NoTg} y el grupo TDP43^{A315T} (Fig. 15A y 15B), sin embargo es posible observar una tendencia de un porcentaje mayor de tiempo de *freezing* en los TDP43^{A315T} con respecto a los controles, lo cual podría explicarse a alguna lentitud en el desplazamiento asociado a fenotipos motores. En el entrenamiento, se observó una diferencia significativa entre los ratones TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T}, mostrando estos últimos un porcentaje de *freezing* menor a los controles, reflejado tanto en el total como en el acumulado (Fig. 15C y 15D). Por último, en la etapa experimental, que es donde se realiza el análisis del comportamiento del ratón un día después haber sido sometido a los *shocks*, se ve también una diferencia significativa; los ratones transgénicos presentan un menor porcentaje de *freezing* que los controles TDP43^{NoTg} (Fig. 15E y 15F).

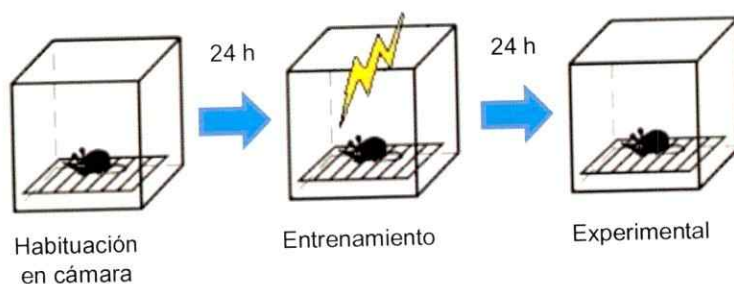
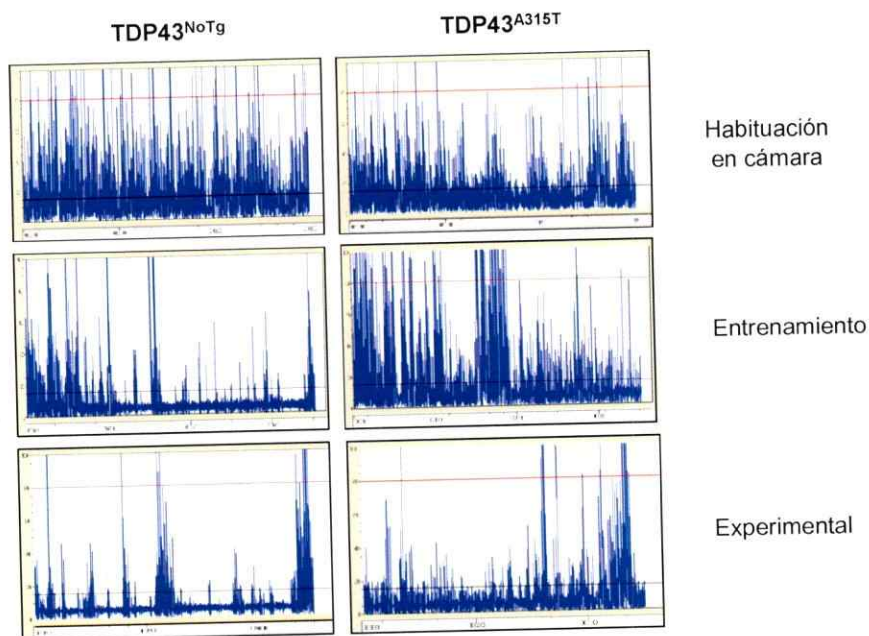
A**B**

Figura 14. Descripción de la prueba cognitiva de condicionamiento del miedo. (A) Diagrama esquemático del procedimiento experimental. El primer día, los ratones fueron situados de forma individual en la cámara para su habituación por 5 min y se registró el comportamiento normal de exploración. En el segundo día para el entrenamiento, cada animal fue ubicado en la cámara y sometido a 3 choques eléctricos de 0,5 mA cada 1 minuto. Finalmente, para la medición experimental del tercer día se situó a cada ratón dentro de la cámara por 7 min sin administrar choques eléctricos. (B) Ejemplo gráfico del registro del movimiento de un ratón TDP43^{NoTg} y otro TDP43^{A315T} a la edad de 80 días (sintomática para el transgénico) para las 3 etapas que componen el experimento.

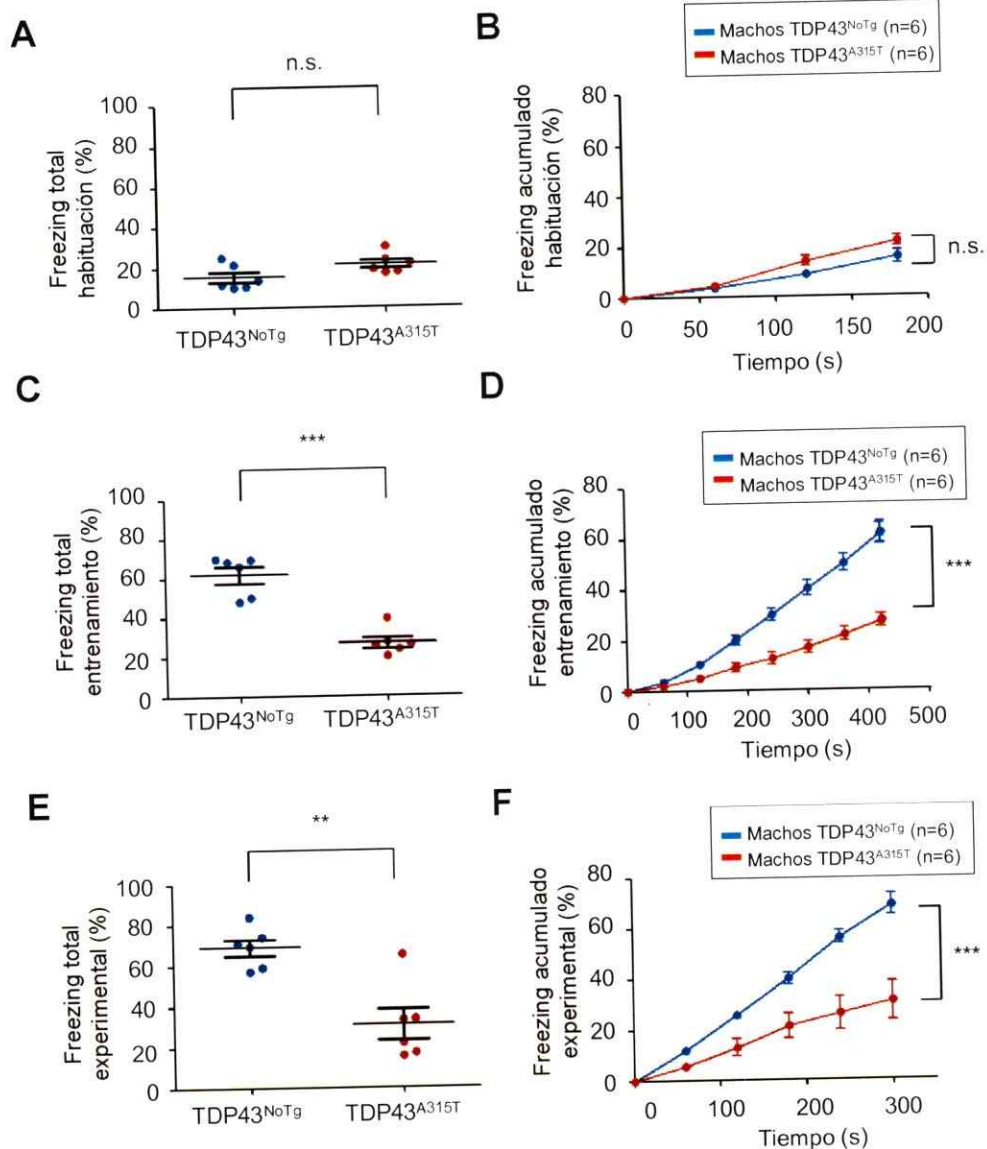


Figura 15. Análisis del fenotipo cognitivo del modelo TDP43^{A315T} por medio de la prueba de condicionamiento del miedo. Comparación de la cuantificación del porcentaje de *freezing* total entre ratones TDP43^{NoTg} (n = 6) y TDP43^{A315T} (n = 6), en las etapas de habituación (A), entrenamiento (C) y experimental (E). No se ven diferencias significativas basales en el porcentaje de *freezing* total entre TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T}, detectado en la etapa de habituación, pero sí en las etapas de entrenamiento y la experimental donde puede apreciarse un porcentaje de *freezing* significativamente menor en los TDP43^{A315T} con respecto a los controles TDP43^{NoTg} (no significativo p > 0,05; ** 0,001 < p < 0,01; prueba t-student no pareada). Por otro lado, se muestra la progresión del porcentaje de *freezing* acumulado durante todo el tiempo que abarca la habituación (B), el entrenamiento (D) y el experimental (F) (no significativo p > 0,05; *** p < 0,0001; prueba ANOVA de dos vías).

6.4. Análisis histológico del estado de la corteza frontal del modelo TDP43^{A315T}

Con el fin de observar por medio de la técnica de microscopía el efecto que produciría la sobreexpresión de la TDP43 humana mutante en ratón, se realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-TDP43 en cortes coronales de cerebro de ratones TDP43^{A315T} en etapa sintomática tardía y ratones controles TDP43^{NoTg} (Fig. 16A y 16B). El anticuerpo utilizado reconoce TDP43 endógeno y transgénico (ver Materiales y Métodos).

Con esta aproximación, dada la intensidad de la señal captada, se comprueba la sobreexpresión de TDP43 en cerebro de ratones transgénicos comparando con los animales TDP43^{NoTg}. Por otro lado, la localización de la proteína en los ratones TDP43^{A315T} en las imágenes observadas se aprecia en su mayoría nuclear.

6.5. Análisis bioquímico para la comparación de los niveles de expresión de TDP43 entre animales machos y hembras.

Dado que en la caracterización fenotípica del modelo murino TDP43^{A315T} se observó una evidente diferencia entre machos y hembras en cuanto a su sobrevivencia, se evaluaron los niveles de proteína de TDP43 tanto a nivel basal (Fig. 17A), como a nivel de sobreexpresión (Fig. 17C). No se obtuvo diferencia en la expresión de esta proteína por género (Fig. 17B y 17D).

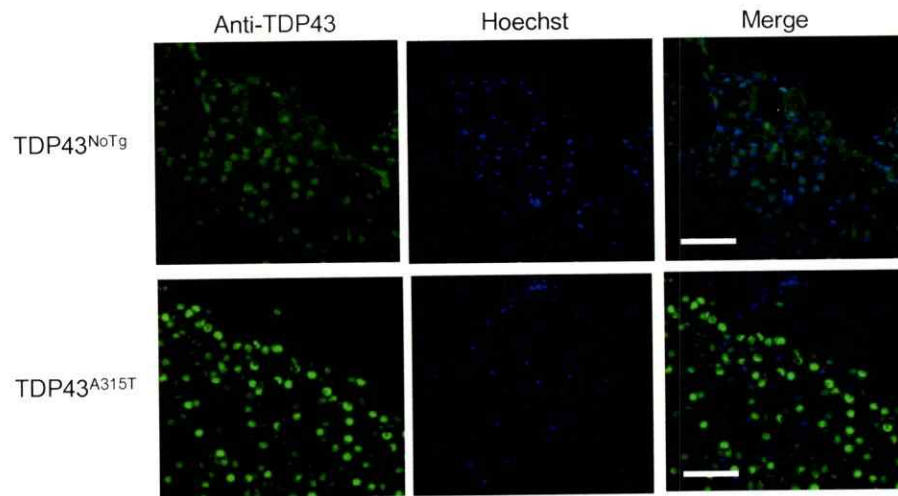
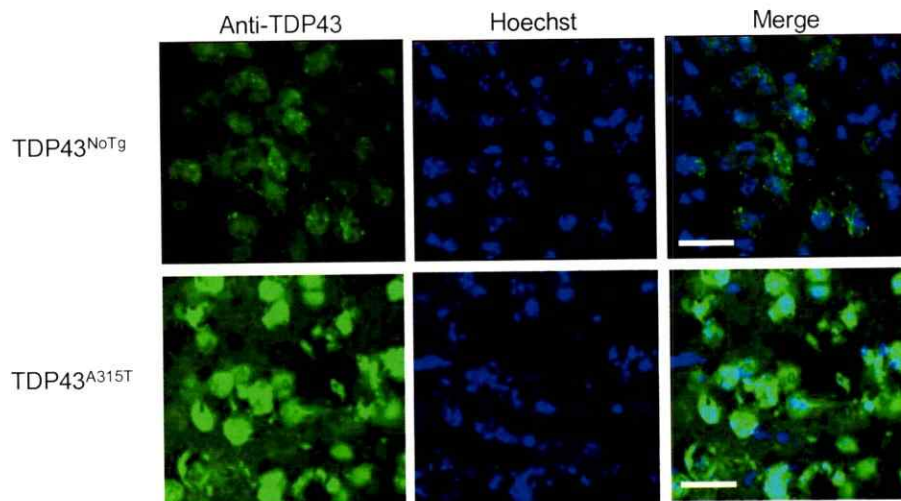
A**B**

Figura 16. Sobreexpresión de la proteína TDP43 en corteza frontal del modelo murino TDP43^{A315T}. Se realizó inmunofluorescencia contra TDP43 en cortes coronales de cerebros de ratones transgénicos sintomáticos tardíos con sus respectivos controles TDP43^{NoTg} de la misma edad (una pareja de 84 días y otra de 97 días, n = 2), seleccionando los cortes que abarcaran la corteza frontal. Se puede observar fácilmente la diferencia en intensidad de la señal entre los ratones TDP43^{A315T} con los TDP43^{NoTg}, evidenciando la sobreexpresión de la proteína. A grandes rasgos, la localización de TDP43 en los transgénicos es nuclear y no se ve una gran pérdida neuronal. Barras de escala en (A) 30 μ m y en (B) 12 μ m.

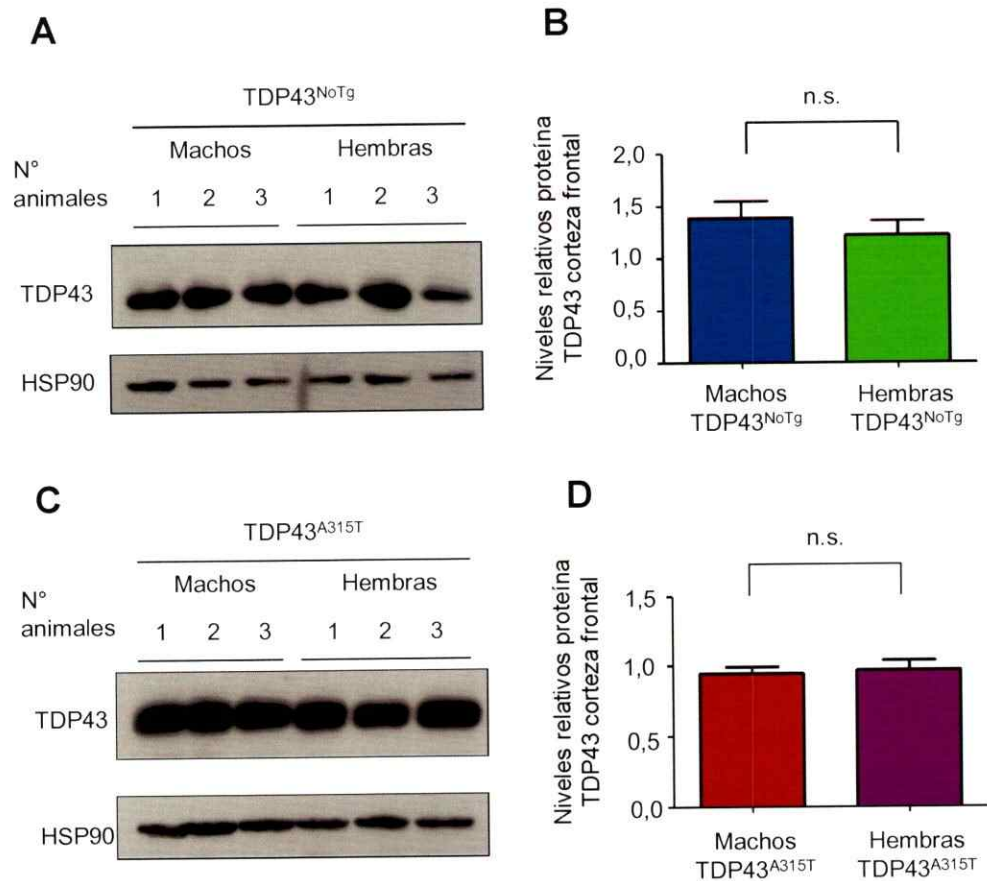


Figura 17. Comparación de niveles de expresión de la proteína TDP43 entre machos y hembras TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} en extractos de corteza frontal. Se compararon los niveles de TDP43 entre machos y hembras TDP43^{NoTg} en (A) y puede verse que no hay una diferencia significativa con la cuantificación (B). Similares resultados se obtuvieron en extractos de corteza de animales TDP43^{A315T} donde tampoco se ve diferencia entre machos y hembras con este genotipo (C), como muestra la cuantificación en (D).

6.6. Análisis bioquímico para ver la presencia de especies de alto peso molecular positivas para TDP43 en corteza frontal y médula espinal del modelo TDP43^{A315T}

Se utilizó la técnica de western blot para analizar los niveles de la proteína TDP43 en extractos de la corteza y la médula espinal de ratones TDP43^{A315T} en estadio sintomático tardío. En ambos casos, se corrieron muestras con DTT (Fig. 18A y 19A) y sin DTT (Fig. 18B y 19C). El objetivo de utilizar muestras sin DTT es detectar si es que existe la presencia de especies oligoméricas sensibles a este agente reductor. Se encontró la presencia de especies de alto peso molecular sensibles a DTT en corteza frontal de ratones TDP43^{A315T} (Fig. 18B), sin embargo en médula espinal no se hallaron tales especies (Fig. 19C). Por otro lado, al cuantificar la señal correspondiente a TDP43 tanto en animales transgénicos como controles se obtuvo en ambos tejidos nerviosos que la sobreexpresión es cercana a las 3 veces por sobre los niveles basales (Fig. 18D y 19B).

6.7. Evaluación de la expresión de marcadores de la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) en tejido de corteza frontal y médula espinal del modelo TDP43^{A315T}

Para detectar una posible activación de la respuesta de proteínas mal plegadas en los ratones TDP43^{A315T}, se evaluaron los niveles de expresión de algunos marcadores de esta vía de señalización. En una primera instancia se analizó el procesamiento del ARNm que codifica para el factor de transcripción *xbp-1*, a través de un ensayo llamado "Pst-I". Esta prueba experimental consiste en la digestión de un producto de RT-PCR de *xbp-1* con la enzima de restricción PstI. La enzima digiere este producto en un sitio presente exclusivamente en los transcritos de la forma no procesa-

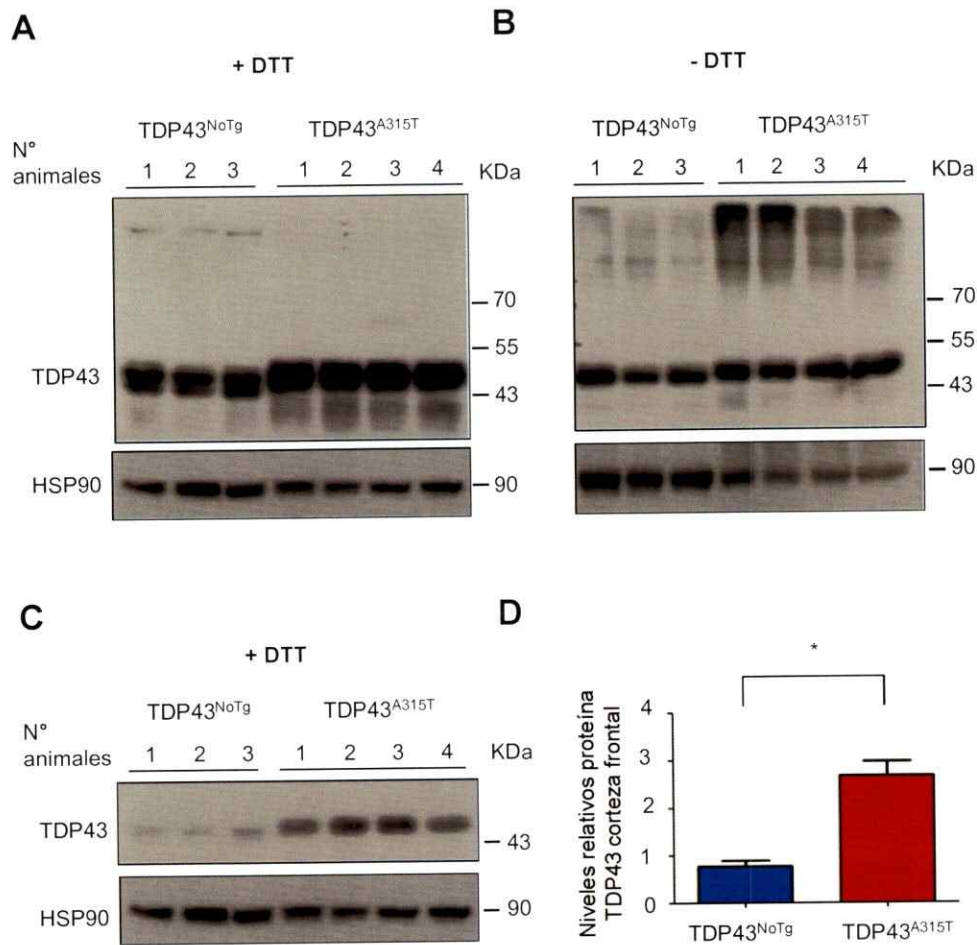


Figura 18. Detección de la proteína TDP43 en muestras de corteza frontal de ratones TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} en presencia y ausencia de un agente reductor. Comparación de extractos de proteína de corteza frontal de ratones TDP43^{NoTg} (n = 3) y TDP43^{A315T} en estadio sintomático tardío (n = 4), de muestras preparadas con DTT (a una concentración final de 100 mM) (A) y sin DTT (B). Se analizaron por western blot y se aprecia en los extractos provenientes de ratones transgénicos la aparición de especies de alto peso molecular positivas para TDP43 cuando no fueron tratados con DTT. (C) Menor exposición del western blot con DTT mostrado en (A) y su cuantificación con respecto a HSP90 en (D) donde puede verse la diferencia entre los niveles de TDP43 entre ratones TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T}; en éstos últimos se observa un aumento de 3 veces sobre el endógeno. (* 0,01 < p < 0,05; prueba no paramétrica Mann-Whitney).

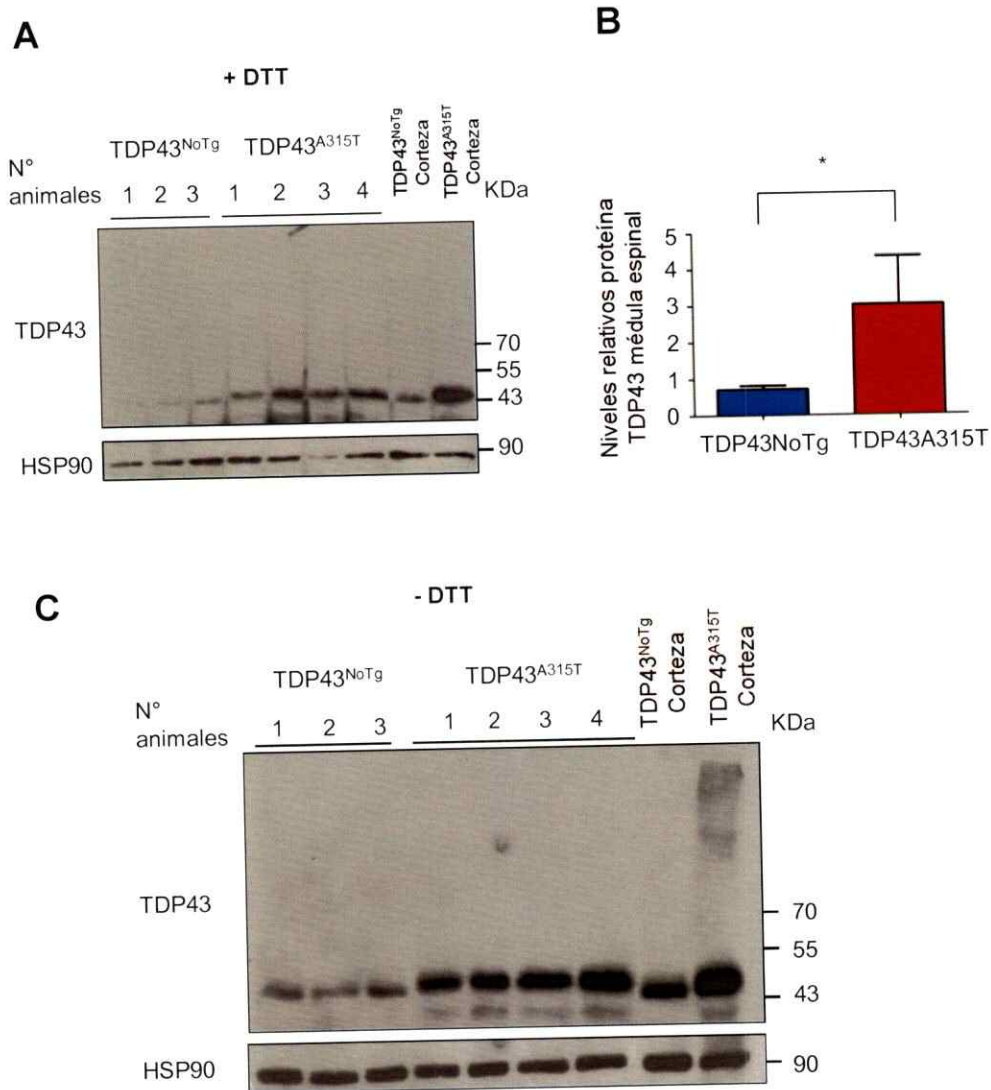


Figura 19. Detección de la proteína TDP43 en muestras de médula espinal de ratones TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} en presencia y ausencia de un agente reductor. Se realizó una comparación de extractos de proteína de médula espinal de los mismos ratones TDP43^{NoTg} (n = 3) y TDP43^{A315T} (n = 4). En (A) se observan las muestras tratadas con DTT y su respectiva cuantificación respecto a HSP90 en (B), donde también se ve una sobreexpresión de TDP43 de tres veces en los ratones TDP43^{A315T} por sobre los niveles basales de los ratones TDP43^{NoTg} (* 0,01 < p < 0,05; prueba no paramétrica Mann-Whitney). En (C) se observan las muestras tratadas sin DTT; y en esta imagen no es posible apreciar especies de alto peso molecular de TDP43 en los extractos de médula de los ratones transgénicos. Como control se cargaron extractos de corteza de un ratón TDP43^{NoTg} y uno TDP43^{A315T} en el mismo gel de poliacrilamida. Sin embargo, tanto las imágenes 13A y 13C fueron modificadas debido a que existía un carril vacío entre las muestras de médula y de corteza.

da de *xbp-1*, denominado "*xbp-1u*" (*unspliced*, de no procesado), lo que genera fragmentos de un tamaño correspondiente a 300 pb. Por lo tanto, la banda de 600 pb que se detecta en un gel de agarosa luego de la digestión con la enzima corresponde a transcritos de la forma procesada, la llamada "*xbp-1s*" (*spliced*, de procesado). Se utilizó esta estrategia para analizar el procesamiento de *xbp-1* en extractos de corteza (Fig. 20) y médula espinal (Fig. 21) de ratones TDP43^{A315T} en estadio sintomático y controles TDP43^{NoTg}. Es posible apreciar un incremento en los niveles de ARN de *xbp-1s* en corteza de animales transgénicos (Fig. 20), pero esto no es claro en médula (Fig. 21), donde aparentemente no hay diferencias.

También se evaluaron los niveles de expresión de la foldasa ERp57, que es un blanco de la activación de la respuesta de proteínas mal plegadas y su importancia radica en su condición de biomarcador en el contexto patológico de la esclerosis lateral amiotrófica, al igual que TDP43. Se observaron niveles de proteína y ARN en extractos de tejidos de la corteza frontal de animales TDP43^{A315T} en estadio sintomático tardío. No se observaron diferencias significativas al comparar los niveles de proteína con extractos obtenidos a partir de animales TDP43^{NoTg} (Fig. 22A y 22B). Sin embargo, al analizar los niveles transcripcionales, se observó una disminución significativa de *erp57* en los animales TDP43^{A315T} al compararlo con sus controles TDP43^{NoTg} (Fig. 22C).

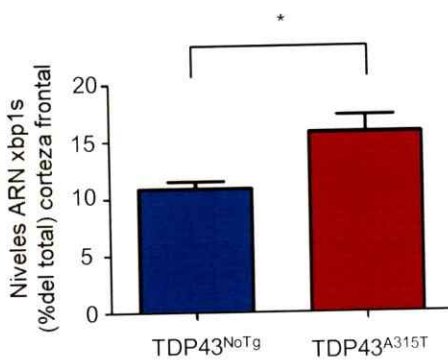
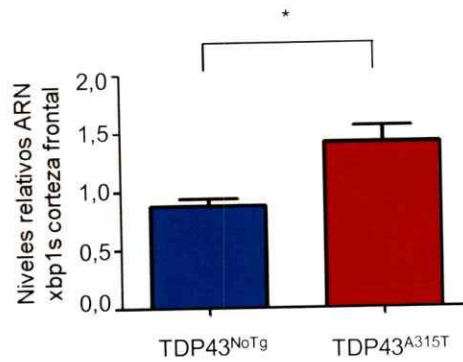
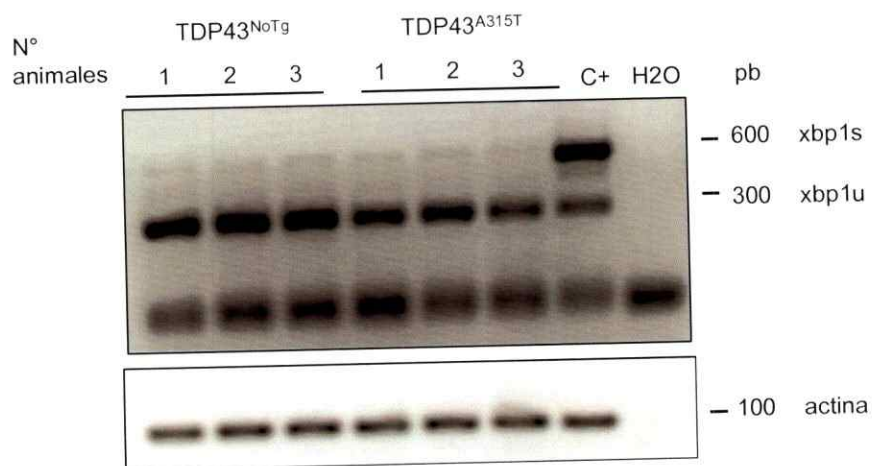
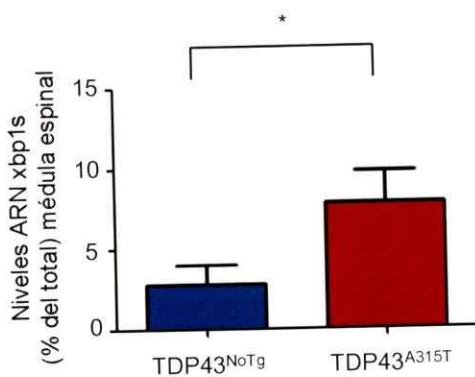
A**B****C**

Figura 20. Análisis del procesamiento del ARNm de *xbp-1* en extractos de corteza del modelo TDP43^{A315T}. (A) Se extrajo ARN a partir de extractos provenientes de ratones en edad sintomática tardía; para analizar de forma semi-cuantitativa los niveles de expresión a nivel transcripcional de *xbp-1s* se realizó un RT-PCR de los transcritos totales de *xbp-1* (procesado y no procesado), que corresponden a un producto de 600 pb. Posteriormente se llevó a cabo una digestión con la enzima de restricción Pst-I que digiere los productos correspondientes a *xbp-1* no procesado otorgando una banda de 300 pb, manteniendo de esta forma en una banda de 600 pb los productos de *xbp-1s*. Como control positivo se utilizó de extractos de cerebro de ratón inyectado con tunicamicina por 24 horas. La señal se cuantificó de 2 formas, en la primera (B) con la razón entre las señales de *xbp-1s* y *xbp-1t* (dado por las sumas de las señales de 600 y 300 pb) y la segunda (C) con la razón entre las señales de *xbp-1s* y actina. Se observa un leve incremento en el grupo de los ratones TDP43^{A315T} comparando con los TDP43^{NoTg} en ambas formas de cuantificación. (* 0,01 < p < 0,05; prueba no paramétrica Mann-Whitney).

A



B



C

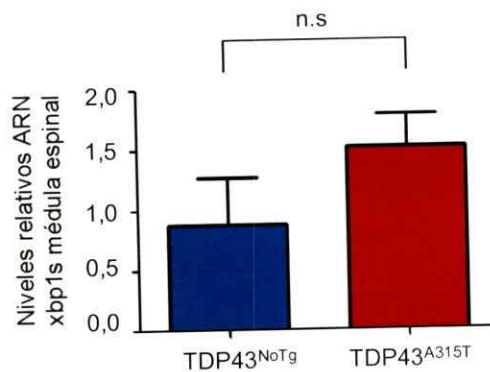


Figura 21. Análisis del procesamiento del ARNm de *xbp-1* en extractos de médula espinal del modelo TDP43^{A315T}. Se utilizaron extractos de ratones en edad sintomática tardía y se cuantificaron las señales que representa a los niveles de *xbp-1s* de la misma forma que la Fig. 13, en (A), (B) y (C). Se ve un leve aumento significativo en los extractos de ratones TDP43^{A315T} a partir de la cuantificación de la razón entre *xbp-1s/xbp-1t* en (A), sin embargo cuantificando la señal de *xbp1s* normalizando con actina no se aprecian diferencias significativas. (* 0,01 < p < 0,05; no significativo p > 0,05; prueba no paramétrica Mann-Whitney).

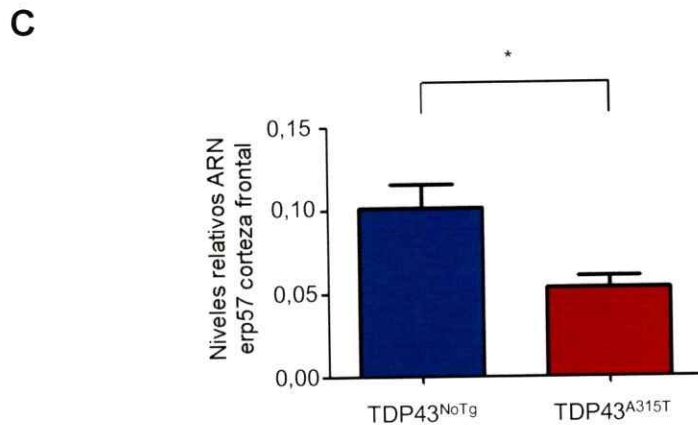
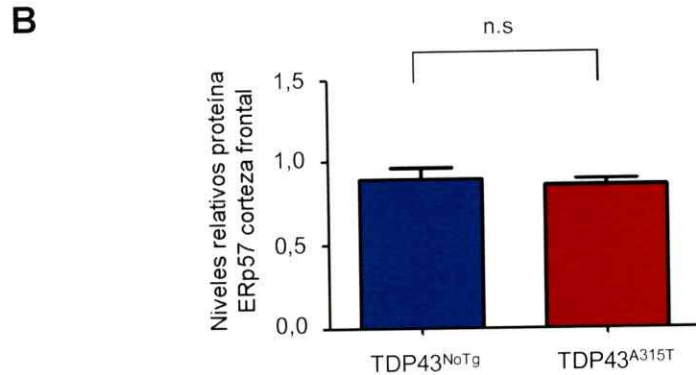
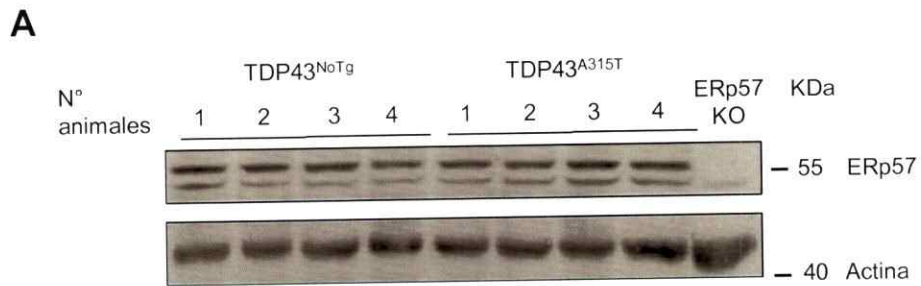


Figura 22. Niveles de expresión de la foldasa ERp57 en extractos de corteza de ratones TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T}. (A) a nivel de proteína por Western Blot donde además se agregó un control de extracto de corteza de un ratón ERp57 KO con el fin de detectar la banda correcta de la proteína. En (B) se muestra la cuantificación de la señal correspondiente a ERp57 en el Western Blot de (A); y en (C) se ve el perfil de expresión a nivel de ARN por medio de la técnica de PCR en tiempo real. A nivel de proteínas no se observan diferencias entre los extractos de ratones TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T}, sin embargo a nivel de ARN es posible observar una disminución en los TDP43^{A315T} con respecto a los controles en etapas sintomáticas tardías (* 0,01 < p < 0,05; no significativo p > 0,05; prueba no paramétrica Mann-Whitney).

7. DISCUSIÓN

TDP43 es una proteína nuclear que cumple varias funciones fisiológicas importantes relacionadas con la regulación del ARN, principalmente en los procesos de transcripción y de su procesamiento. TDP43 fue originalmente 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 (Ou et al., 1995). Con el tiempo se fueron describiendo otros roles celulares relevantes para TDP43 en los que estaría involucrado como por ejemplo en la estabilidad y la translocación del ARN, y el procesamiento de los micro-ARN (Ou et al., 1995) (Fig. 2). Sin embargo, hace sólo unos pocos años atrás (Neumann et al., 2006) se encontró a TDP43 como una de las principales proteínas desreguladas en la patología de ELA y DLFT-U. En estos contextos se detecta a TDP43 con una hiperfosforilación anormal y ubiquitinación, y fragmentada en especies de 20-25 KDa provenientes de su extremo C-terminal (particularmente en corteza cerebral). Esto se ha asociado a la localización anómala de TDP43, a la pérdida de su expresión nuclear normal y a la formación de agregados sarcosilo-insolubles (Neumann et al., 2006; revisado en Lee et al., 2011).

Dentro de las formas familiares de la ELA, la proteinopatía de TDP43 representa sólo un 5% de incidencia en mutaciones heredables presentes en el gen que la codifica. La mayor incidencia (40%) está dada por extensiones repetidas de hexanucleótidos ubicadas en una región intrónica del gen C9ORF72 (DeJesus-Hernandez et al, 2011; Renton et al, 2011), y la segunda mayor incidencia (20%) está representada por mutaciones en SOD1 (Rosen et al., 1993). Sin embargo la condición desregulada de TDP43 se encuentra presente en la mayoría de los casos que incluyen a los de tipo esporádicos y formas familiares no-SOD1 (revisado en Neumann et. al,

2009). Por lo tanto, la proteína TDP43 adquiere una relevancia particularmente interesante en la investigación de la etiología de la ELA.

Por otro lado, llama la atención la relación que tiene la TDP43 con la DLFT-U, porque sería ésta la proteína que conformaría las inclusiones ubiquitinadas que caracterizan a este subtipo de demencia, llegando incluso a ser propuesta como la proteína clave de este desorden. Esto llevó a nombrar a la enfermedad como DLFT-TDP (revisado en Lee et al., 2011). Además, a partir del hallazgo de la proteinopatía de la TDP43 en DLFT-U y ELA se han generado varios estudios con evidencias que demuestran que un espectro de disfunción del lóbulo frontal está presente en hasta el 50% de los pacientes con ELA (Lomen-Hoerth et al., 2003; Murphy et al., 2007), proponiendo una superposición de ambos fenotipos clínicos y relacionándolos como un todo; dejando de esta forma atrás la creencia de que los desórdenes fisiológicos en la ELA sólo estaban limitados al sistema motor.

En este trabajo se caracterizó en detalle un modelo murino transgénico que sobreexpresa la forma humana mutante de la proteína TDP43^{A315T} en el SNC, con un marcador "flag" en su extremo N-terminal. El promotor utilizado es de la proteína prion, que se expresa en altos niveles y de forma ubicua en tejidos nerviosos desde edades embrionarias tempranas, continuando durante toda la vida (Borchelt et al., 1996). Su promotor ha sido ampliamente usado para dirigir la expresión de genes específicamente en el cerebro y la médula espinal en animales transgénicos (Waldron-Roby et al., 2012). Este es el primer modelo transgénico publicado que sobreexpresa TDP43 en el SNC y el trabajo fue difundido en la revista científica PNAS (Wegorzewska et al., 2009).

7.1. Caracterización de la progresión a nivel de peso corporal y motor de la patología del modelo TDP43^{A315T}

El reporte que describe el modelo TDP43^{A315T} evidencia anomalías que se asemejan a los síntomas de ELA y entrega buena información del contexto patológico a nivel de histología, pero no describe la realización de un análisis metódico en el transcurso de la enfermedad (Wegorzewska et al., 2009). Por lo tanto, uno de los propósitos de esta tesis fue llevar a cabo una caracterización profunda y sistemática que permita entregar la mayor información posible acerca de la progresión patológica, lo que es fundamental para su futuro uso como un modelo *in vivo* que sea representativo para investigar enfermedades humanas.

En primer lugar, en este trabajo se muestra una diferencia significativa entre las sobrevividas de machos y hembras transgénicas (TDP43^{A315T}); mostrando los machos un promedio de 88 ± 2 días y las hembras uno de 132 ± 9 días (Fig. 6). Los investigadores que generaron el modelo transgénico obtuvieron una media de 153 días (Wegorzewska et al., 2009), pero con un n considerablemente menor y utilizando ratones con fondo genético mixto. Por otro lado, la diferencia evidente en las sobrevividas entre machos y hembras TDP43^{A315T} resulta ser un dato bastante interesante ya que es una característica que no había sido descrita anteriormente. No se observaron diferencias en los niveles proteicos de TDP43 en extractos de corteza entre machos y hembras TDP43^{NoTg}, descartando diferencias basales en la expresión dado el género; y tampoco se observaron diferencias entre extractos de machos y hembras TDP43^{A315T} (Fig. 17). 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. También es interesante notar que las proporciones de nacimientos arrojan un porcentaje mayor de machos TDP43^{A315T} que hembras de este mismo genotipo, sugiriendo algún tipo de selección durante en el desarrollo embrionario.

La medición de peso (Fig. 7) forma parte del monitoreo de rutina aplicado a animales experimentales, ya que constituye un buen biomarcador que permite determinar parámetros cuantitativos de utilidad en modelos que desarrollan una patología. Para esta colonia TDP43^{A315T}, la medición de peso corporal, resultó ser un método apropiado de seguimiento de la progresión de la enfermedad y con él fue posible determinar un inicio aproximado de ésta (Fig. 7B) y su duración (Fig. 7C). Además, como una forma de representar la severidad de la enfermedad se graficaron las pendientes de las curvas individuales desde el punto de inicio de la enfermedad hasta la última medición efectuada antes de la eutanasia (Fig. 8B). Como parte de la caracterización se compararon las pendientes de los animales TDP43^{A315T} con sus controles TDP43^{NoTg}, detectándose una diferencia significativa entre ambos grupos. Se obtuvieron valores cercanos a cero en los grupos TDP43^{NoTg} y cifras más negativas en los TDP43^{A315T}, dando cuenta de la enfermedad que padecen los ratones TDP43^{A315T} con la pérdida de peso. Al comparar las severidades entre machos y hembras TDP43^{A315T} no se observaron diferencias significativas (Fig. 8C).

Respecto a los seguimientos de desempeños en pruebas motoras se puede afirmar que para este modelo, la prueba de *hanging* (Fig. 10, 11 y 12) es la más idónea

para tener una idea de la progresión de la enfermedad (Fig. 11A y 11B) y determinar de una manera aproximada su inicio (Fig. 12A) y duración (Fig. 12B). Si bien es un método donde el puntaje es asignado basándonos sólo la observación del comportamiento del ratón al ser colgado en la barra horizontal, resultó ser bastante consistente entre animales pertenecientes al mismo grupo experimental y presentó poca variabilidad entre los intentos; conformando un método bastante reproducible para el monitoreo de esta colonia TDP43^{A315T}. El desempeño promedio de los animales también entrega una información acerca del empeoramiento de los grupos TDP43^{A315T}, evidenciándose su problema motor general (Fig. 11C).

Como se mencionó previamente, los parámetros de inicio y duración de la enfermedad fueron determinados en muestras de ratones TDP43^{A315T} por medio de los métodos de seguimiento de peso corporal y prueba de *hanging*. Fue posible apreciar que en los grupos de machos son bastante similares los inicios de la enfermedad determinados en los dos métodos, pero en las hembras hay una diferencia considerable (Tabla 5). Esto podría relacionarse con el hecho de que por alguna razón no conocida es posible observar mayor variabilidad en el grupo de hembras que en el de los machos en este parámetro (Fig. 7B y 12A), observándose algo similar en la sobrevivencia (Fig. 6). Por otro lado, en general se ve una concordancia en el parámetro de duración de la enfermedad obtenido por ambos métodos entre los cuatro grupos experimentales, además de poca variabilidad (Fig. 7C y 12B); sólo se aprecia una pequeña diferencia entre los valores obtenidos en el grupo de animales machos (Tabla 5). A partir de esto se puede concluir que las hembras TDP43^{A315T} se enferman después que los machos TDP43^{A315T} y que la duración de la enfermedad es la misma entre grupos separados por género.

Tabla 5. Parámetros cuantitativos obtenidos de la caracterización sistemática del modelo TDP43^{A315T} 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 (TDP43^{A315T}) separando en grupos de machos y hembras.

Parámetro	Peso Machos (n = 16)	Peso Hembras (n = 9)	<i>Hanging</i> Machos (n = 6)	<i>Hanging</i> 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

La prueba de rotarod, tuvo la desventaja de arrojar valores de tiempos de latencia muy variables entre los intentos de un mismo animal y entre individuos similares de sus propios grupos experimentales, por lo que no se logró determinar un inicio aproximado de la enfermedad con algún criterio consistente. Sin embargo, dentro de la misma variabilidad de los datos era posible detectar una caída de la latencia en las curvas individuales de los ratones TDP43^{A315T} y ver una mantención en el tiempo en los controles TDP43^{NoTg}. Por lo tanto, se observó una tendencia cualitativa en las curvas de progresión individual que daba la idea de un empeoramiento en el desempeño de la prueba motora en los grupos TDP43^{A315T}; y como una forma de representar esto se decidió comparar sus pendientes, tomando el criterio de medirlas desde que se considera que el ratón aprendió a realizar la prueba (Fig. 9). Se compararon entre grupos TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} separando entre machos y hembras, y fue posible detectar la diferencia significativa entre distintos genotipos, evidenciándose la caída de pendiente durante las progresiones individuales de los ratones TDP43^{A315T}. Este análisis también puede dar información acerca de la severidad de la enfermedad, dejando claro que son los animales TDP43^{A315T} los que empeoran su desempeño motor al comparar con los TDP43^{NoTg}; por otro lado en la comparación entre machos y hembras TDP43^{A315T} no se observan diferencias, lo que es correlativo a lo obtenido en

las pendientes calculadas en las curvas de peso en las etapas sintomáticas (desde el inicio de la enfermedad) (Fig. 9D). La variabilidad de los datos que se obtuvo con esta prueba motora probablemente se debió a la utilización del modo acelerado (con incremento de las velocidades desde 4 a 40 RPM en un tiempo de 2 minutos), el cual aparentemente no resulta ser el más idóneo para el monitoreo de este modelo murino. Quizás otro tipo de ajuste como mediciones de latencia con velocidad constante entregaría datos menos variables.

La prueba "grilla invertida" (Fig. 13) no resultó ser una prueba motora apropiada para registrar progresiones de desempeños en estos ratones, básicamente por dos razones: la primera fue la alta variabilidad en los datos entre los individuos similares y la segunda fue que los ratones TDP43^{NoTg} se desprendían de la grilla sin manifestar problema motor alguno. Por lo tanto, teniendo esta situación con la población control, los datos obtenidos en la población transgénica pierden validez. Dado todo este problema experimental, los resultados claramente no muestran diferencias entre las poblaciones TDP43^{NoTg} y TDP43^{A315T} (Fig. 13B y 13C).

7.2. Exploración del fenotipo cognitivo y sensorial del modelo TDP43^{A315T}

En una arista completamente distinta, se quiso explorar acerca de aspectos cognitivos del fenotipo del modelo TDP43^{A315T}, dada la conexión de la proteinopatía de TDP43 con la demencia lobar fronto-temporal, y teniendo claro los antecedentes que afirman la presencia de inclusiones ubiquitinadas en el hipocampo y la corteza cerebral (Wegorzewska et al., 2009). Para esto, se realizó la prueba de "condicionamiento del miedo" donde se evalúa la capacidad del ratón de recordar una situación que le produce temor, que en este caso corresponde a la administración de estímulos eléctricos en una cámara donde su desplazamiento es monitoreado (Fig. 14A). La

inmovilidad del animal se asocia al miedo y es cuantificado por los segundos en que se encuentra en ese estado, el cual es llamado "freezing". Se analizó el fenotipo cognitivo de ratones machos de 80 días de vida TDP43^{A315T} con sus respectivos controles TDP43^{NoTg} de la misma edad. Si bien los ratones transgénicos estaban en la edad que es sintomática para este grupo experimental, aún no mostraban un deterioro evidente.

En primera instancia, en la etapa de habituación se vio una tendencia de menor movimiento en los animales TDP43^{A315T}, probablemente debido a una leve dificultad en el desplazamiento cuya detección no era obvia por simple análisis visual. Posteriormente en las etapas de entrenamiento y experimental, los TDP43^{A315T} mostraron un porcentaje de *freezing* significativamente menor que los TDP43^{NoTg} (Fig. 15C, 15D, 15E y 15F). A partir de este resultado se puede concluir que existe una respuesta alterada relacionada al miedo en los ratones transgénicos, comparando con los controles. En base a esto, con sólo esta aproximación no es posible saber si los ratones TDP43^{A315T} recuerdan en menor medida la situación que genera temor, asociada a la administración de choques eléctricos, o si existe una insensibilidad en estos roedores para percibirlos. Existen varias observaciones que son importantes a considerar, como por ejemplo que en las tres etapas que conforman el experimento (habituación, entrenamiento y experimental) se detectó un porcentaje de *freezing* total similar en los TDP43^{A315T} (22%, 27% y 31% respectivamente), mientras que en los controles TDP43^{NoTg} se observó un gran cambio entre los porcentajes de *freezing* total de la etapa de habituación y el entrenamiento (15%, y 62% respectivamente), manteniéndose un alto porcentaje en el experimental (69%) (Fig. 15A, 15C, 15E); sugiriendo alguna disfunción sensitiva en los ratones transgénicos en edad sintomática, lo que es consistente con el fenotipo de ELA. Sin embargo, también fue posible

observar cambios leves en el patrón de movimiento con la administración de los estímulos entre la habituación y el entrenamiento en los ratones TDP43^{A315T} (Fig. 14B); y además existe un aumento en el porcentaje de *freezing* total en la etapa experimental con respecto al entrenamiento, lo que podría hacer suponer la existencia de algún grado de respuesta frente al estímulo; dejando en duda si los resultados obtenidos en los ratones transgénicos son atribuidos exclusivamente a la insensibilidad al estímulo administrado. Para resolver esta interrogante es necesario realizar otro tipo de pruebas de comportamiento en ratones que permitan medir el parámetro de sensibilidad. Dado lo interesante de los datos obtenidos en la aproximación experimental de la prueba de condicionamiento del miedo, es fundamental realizar mediciones sistemáticas desde edades pre-sintomáticas.

La prueba cognitiva de condicionamiento del miedo se ha realizado en otro modelo murino que sobreexpresa la forma silvestre de TDP43 bajo el control del promotor de la proteína calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII), por lo que la sobreexpresión de TDP43 en este animal es específica para el área del prosencéfalo (Tsai et al., 2010) (Tabla 2). Similar a lo obtenido en esta tesis, en la publicación donde caracteriza a este modelo CaMKII-TDP43^{WT} se muestra un comportamiento diferencial de los ratones transgénicos con respecto a los controles no transgénicos en la respuesta condicionada al estímulo. Los ratones transgénicos presentaron un porcentaje de *freezing* significativamente menor en comparación con los controles durante seis intentos. Además, a estos ratones se les realizó la prueba del "laberinto de agua", que también es una prueba cognitiva que permite medir niveles de aprendizaje y memoria espacial (Morris et al., 1982), y en concordancia a lo obtenido en la prueba de condicionamiento del miedo, los ratones transgénicos a lo largo de seis intentos

empeoran su desempeño en la tarea (Tsai et al., 2010). Este antecedente, es relevante si se toma en cuenta lo obtenido con los TDP43^{A315T}, ya que puede dar luces de una probable disfunción a nivel cognitivo en este modelo que no ha sido publicada hasta ahora.

7.3. Análisis de la patología en corteza frontal y médula espinal de ratones TDP43^{A315T}

Uno de los principales signos que caracteriza a los pacientes con ELA es la degeneración de las motoneuronas de la corteza frontal y de la médula espinal; es por esto que se analizaron estos tejidos en los ratones TDP43^{A315T}. Los tejidos fueron extraídos en su etapa sintomática terminal, es decir cuando los animales mostraron un claro deterioro fisiológico (descenso crítico de peso y dificultad motora evidente).

Dentro de los hallazgos más interesantes puede destacarse la aparición de especies de alto peso molecular de la proteína TDP43 en extractos de corteza frontal de ratones TDP43^{A315T} por técnica de western blot, pero sin efectuarles tratamiento con DTT (agente reductor) (Fig. 18B). Este resultado muestra que es altamente probable la existencia de agregados de TDP43 sensibles a ambientes reductores en la corteza de estos animales transgénicos, lo cual constituye una información que no había sido descrita anteriormente. En el trabajo en que se publica el modelo (Wegorzewska et al., 2009) no se encontraron especies de alto peso molecular de TDP43 por medio de esta técnica, probablemente porque la estrategia de no tratar las muestras con el agente reductor no fue utilizada.

Por otro lado, en extractos proteicos de médula espinal de ratones TDP43^{A315T} no se detectó la presencia de especies de alto peso molecular de TDP43 por western blot, con las mismas condiciones experimentales utilizadas en las muestras de corteza.

Esto lleva a proponer que en estos animales no existe presencia de agregados de TDP43, o quizás en una cantidad considerablemente menor comparando con la corteza frontal. Para descartar problemas en la técnica que impidiesen detectar las especies de alto peso molecular en las muestras de médula se corrió el gel de acrilamida-bis-acrilamida agregando una muestra de corteza de un animal TDP43^{A315T} sintomático terminal como control, y en ella fue posible observar la presencia de las especies de alto peso molecular, validando de esta forma el resultado (Fig. 19C).

La eventual inexistencia de agregados de TDP43 en extractos proteicos de la médula de los ratones TDP43^{A315T} no significaría que estos tipos celulares se mantuviesen invulnerables en medio del contexto patológico. En el trabajo de la revista PNAS (Wegorzewska et al., 2009) se muestran pruebas de degeneración axonal en fibras nerviosas presentes en la médula de estos ratones, además de pequeñas inclusiones ubiquitinadas de composición desconocida en el asta ventral y evidencias de fasciculaciones que se relacionan con una atrofia muscular probablemente debida a la degeneración de las fibras de las motoneuronas presentes en la médula. En base a esto, se podría inferir que en estos ratones transgénicos existen mecanismos distintos de muerte neuronal. Es posible pensar que en la médula espinal de los ratones TDP43^{A315T} tan sólo la aberración de TDP43, asociada a su mutación, podría ser causal de la neurodegeneración. En efecto, se ha documentado dentro de las funciones de TDP43 su papel en la regulación del procesamiento de blancos relacionados con la actividad sináptica (Polymenidou et al., 2011); y también su rol en el control de la biosíntesis de los micro-ARN, moléculas a las cuales se les ha atribuido una gran importancia en la regulación génica post-transcripcional que constituye un proceso clave en el desarrollo y funcionamiento neuronal (Ecker et al., 2009). Por

tanto, las especies de alto peso molecular de TDP43 halladas en muestras de corteza de los ratones transgénicos hace pensar que a nivel cerebral existe un contexto patológico más agresivo y que estén presentes efectos que convergen en una desregulación más severa. Quizás esto pueda relacionarse con la observación de que este modelo murino TDP43^{A315T} no presenta parálisis completa, conectando con un efecto menos severo en la médula espinal; y la aparente disfunción cognitiva que nos sugiere la aproximación por la prueba de condicionamiento del miedo que podría evidenciar una mayor disfunción a nivel cerebral. Sin embargo, es claro que se necesitan más estudios experimentales para comprobar este planteamiento. Estas observaciones se relacionan directamente con un tema controversial que ha sido discutido desde que se descubrió a la proteína TDP43 como componente principal de inclusiones de muestras de pacientes de ELA y DLFT-U; donde se ha planteado que múltiples factores relacionados con la desregulación de esta proteína pueden influir en la neurodegeneración. Se ha apuntado a un origen de ganancia de función tóxica, pérdida de función o un efecto pleiotrópico de ambos (revisado en Lee et al., 2011). El tema tiene muchas aristas sin resolver dado que también se han generado modelos de sobreexpresión de la TDP43 no mutada (WT, *wild type*) y que manifiestan signos de neurodegeneración y síntomas similares a ELA (Xu et al., 2010; Wils et al., 2010; Shan et al., 2010; Tsai et al., 2010) (Tabla 2), lo que es relevante para entender el rol de la desregulación de TDP43 en los casos esporádicos de ELA. Al parecer, el sólo hecho de sobreexpresar la proteína es causal de una aberración que podría llevar a su pérdida de función y/o ganancia de función tóxica.

7.4. Relación de la patología de los ratones TDP43^{A315T} con la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR)

En el trabajo que describe el modelo transgénico de la TDP43 mutante, a través de observaciones por inmunofluorescencia no se encontró la presencia de inclusiones positivas para TDP43 en células pertenecientes a cortes de corteza frontal, hipocampo y médula espinal de este modelo murino, pero sí se detectaron inclusiones citoplasmáticas ubiquitinadas de composición desconocida que no colocalizaron con TDP43 (Wegorzewska et al., 2009). Sin embargo, con sólo una aproximación por medio de microscopía no es posible afirmar la inexistencia de inclusiones y oligómeros positivos de TDP43 en las neuronas que componen estos tejidos. En el caso particular del análisis de la corteza frontal de estos animales, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que sí existe la presencia de inclusiones de TDP43 y dados los antecedentes probablemente no estén ubicados en el citoplasma. El hecho de que las especies de alto peso molecular observadas por western blot fuesen sensibles a DTT (agente reductor) evidencia que éstos se encontraban en un estado oxidado en los tejidos de los animales TDP43^{A315T} en estadios sintomáticos, es decir que los agregados estarían inmersos en un ambiente que favorece su oxidación. Se ha reportado por medio de microscopía electrónica en muestras de médula de pacientes de ELA esporádico alteraciones en la localización subcelular de TDP43 y se menciona la detección de esta proteína al interior del retículo endoplasmático (Sasaki et al., 2010).

La acumulación de proteínas mal plegadas formando conglomerados en zonas subcelulares es una característica muy común en enfermedades neurodegenerativas; y en las formas de ELA con la proteína SOD1 mutante, la presencia de esta proteína

formando cuerpos de inclusión en el lumen del RE ha sido documentada (Kikuchi et al., 2006; Atkin, et al., 2006; Urushitani et al., 2008). En esta arista, relacionando con el contexto patológico del modelo murino TDP43^{A315T}, una hipotética presencia de agregados de TDP43 en el lumen del RE generaría una conexión directa con una condición de estrés de este organelo que podría gatillar la activación de la respuesta UPR. En relación a esto, se observaron niveles de ARN del factor transcripcional clave en la UPR *xbp-1s* en extractos de corteza frontal y médula espinal de animales TDP43^{A315T} y TDP43^{NoTg}. Se observó que en corteza existe un leve aumento, pero significativo, en los niveles de *xbp-1s* en extractos de animales TDP43^{A315T} con respecto a los niveles basales de los TDP43^{NoTg} (Fig. 20), pero en extractos de médula el aumento no es claro debido a que la cuantificación que normaliza con niveles de actina no arroja una diferencia significativa entre extractos de TDP43^{A315T} y TDP43^{NoTg} (Fig. 21). Este hallazgo indica que existe activación de la UPR en la corteza motora, pero no en la médula espinal bajo un contexto patológico del ratón TDP43^{A315T}; lo que es interesante ya que se correlacionaría con la detección de especies de alto peso molecular en extractos de la corteza y no en la médula de estos ratones.

Hay que tener en cuenta que en los resultados en que se evalúan los niveles transcripcionales de *xbp-1s* también provienen de extractos que son obtenidos desde ratones en etapa sintomática tardía. Por lo tanto queda abierta la pregunta, debido a lo débil de la intensidad de las señales, si la eventual activación de esta vía de respuesta adaptativa en la corteza motora de los ratones TDP43^{A315T} se generaría sólo en las etapas sintomáticas o si comienza en las pre-sintomáticas (Fig. 20). Si existiese una activación de la UPR en edades previas a las etapas en que se manifiestan los síntomas, es posible que los niveles de *xbp-1s* detectados en estas muestras

correspondan a un remanente de la respuesta. Otro punto a considerar es la naturaleza del extracto ya que las muestras provenientes de tejidos animales, de ARN mensajero de xbp-1s en este caso, suelen estar muy diluidas debido a que están insertas en una mezcla compleja de muchos otros tipos celulares distintos que dan forma a la estructura tisular en sí; además muchas veces en organismos completos, leves cambios en la expresión de algunas proteínas no son detectados en extractos totales.

Por otro lado, se observaron los niveles de proteína y ARN de la foldasa ERp57 en extractos de corteza de animales TDP43^{A315T} y controles TDP43^{NoTg} en etapa sintomática tardía. ERp57 es miembro de la familia de las PDIs, que son conocidos blancos de la UPR y se caracterizan por actuar en el lumen del retículo catalizando la formación de los puentes disulfuro en las proteínas; promoviendo de esta forma su plegamiento al interior de este compartimiento celular. No se observaron diferencias en los niveles de proteínas en los animales TDP43^{A315T} y TDP43^{NoTg} (Fig. 22A y Fig. 22B), pero en los niveles de ARN se observó una disminución significativa en los TDP43^{A315T} con respecto a los niveles basales del TDP43^{NoTg} (Fig. 22). Es interesante lo observado en estos resultados, ya que resulta contradictorio con una eventual activación de la UPR. Se ha documentado que las PDIs presentan una expresión alterada en contextos patológicos neurodegenerativos (Hetz et al., 2009; revisado en Benham, 2012); y es posible que en esta etapa de la enfermedad explorada, la UPR ya no cumpla un rol adaptativo y comience a actuar en un contexto crónico (revisado en Woehlbier y Hetz, 2011). Sería óptimo analizar otros marcadores de apoptosis como CHOP y ATF4, a pesar de que por histología (Fig. 16) en general no se ve un gran daño tisular. En base a todos los resultados, es necesario realizar el estudio sistemático de observación de

estos marcadores de UPR en los tejidos afectados del ratón TDP43^{A315T} con el objetivo de resolver las nuevas interrogantes que surgen a partir de lo obtenido en este estudio y generar de esta forma una correlación con la caracterización fenotípica de este modelo murino.

7.5. Proyecciones

La utilización de un modelo *in vivo* de TDP43 es muy relevante para el estudio de la ELA y también la DLFT debido a la gran atención que se le ha puesto a la desregulación de esta proteína en los contextos patológicos en los pacientes. Si bien se han generado en los últimos años muchos modelos de ganancia y pérdida de función de TDP43 para el estudio de estas patologías neurodegenerativas, una de las ventajas de utilizar el modelo TDP43^{A315T} caracterizado en este trabajo es que todos los ratones transgénicos generados desarrollaron la patología neurodegenerativa. La progresión de la enfermedad en los ratones fue en general rápida (sobre todo en los machos), pero totalmente abordable; permitiendo realizar la caracterización del modelo en tiempos prudentes de seguimiento. Además, la diferencia clara de la supervivencia entre machos y hembras TDP43^{A315T} es interesante de investigar y desarrollar dada la incidencia diferencial de la ELA entre hombres y mujeres a nivel mundial, siendo los hombres más afectados con esta enfermedad.

La caracterización sistemática del fenotipo motor del modelo TDP43^{A315T} realizada en esta tesis tiene importancia para futuros estudios que apunten a la generación de terapias en ELA/DFT. Los resultados obtenidos en base a los marcadores de la respuesta de proteínas mal plegadas podrían indicar alteraciones funcionales que impidan el sostenimiento de la respuesta adaptativa. Sería interesante realizar cruces de estos ratones TDP43^{A315T} con transgénicos de XBP-1s y ERp57, con

el objetivo de observar algún efecto protector o distinto en el fenotipo de los animales dobles transgénicos; como una aproximación a evaluar blancos de terapias en esta enfermedad.

Por otro lado, es necesario también realizar un seguimiento del fenotipo cognitivo de los ratones TDP43^{A315T} desde etapas presintomáticas con la prueba de condicionamiento del miedo y realizar pruebas que evalúen la sensibilidad de los animales, ya que sería interesante evaluar si funcionan como buenos modelos de DLFT-U. Esta área de estudio cobra una gran relevancia dada la relación íntima que posee la DLFT-U y el contexto desregulado de TDP43; además de los nuevos descubrimientos entre la relación fenotípica entre DLFT-U y ELA en pacientes. Los resultados que sugieren la formación de agregados de TDP43 en la corteza y no en la médula espinal de los ratones TDP43^{A315T} marcan un buen precedente para desarrollar este tópico.

8. CONCLUSIONES

- El modelo murino transgénico TDP43^{A315T} desarrolla una patología neurodegenerativa reflejada en su pérdida progresiva de peso corporal, disminución gradual de sus capacidades motoras y alteraciones en el comportamiento frente a estímulos ambientales en su etapa sintomática que sugieren fuertemente un problema cognitivo.
- Las hembras transgénicas TDP43^{A315T} poseen una supervivencia mayor que los machos con este mismo genotipo, característica que no tiene que ver con los niveles de expresión de TDP43 tanto en condiciones basales como de la sobreexpresión.

- Existe una muy alta probabilidad de la existencia de agregados en la corteza cerebral de los animales TDP43^{A315T} en etapas sintomáticas tardías, pero no en su médula espinal.
- Hay un aumento en el procesamiento de *xbp-1* en células que componen la corteza frontal de los ratones TDP43^{A315T} comparando con los niveles basales de los TDP43^{NoTg}, pero no en la médula espinal. Esto indica la activación de la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) sólo en el primer tejido mencionado.
- Inesperadamente, en la corteza frontal del ratón TDP43^{A315T} no hay un aumento en la expresión de la foldasa ERp57, el cual constituye un blanco de la UPR.

9. 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. *J. Biol. Chem.* 282, 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. *Mol Cell.* 27, 53 - 66.

Ameri, K., Harris, A. L. (2008). Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol.* 40, 14 - 21.

Andreu, C. I., Woehlbier, U., Torres, M., Hetz, C. (2012). Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: from disease mechanisms to biomedical applications. *FEBS Lett.* 586, 2826 - 2834.

Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., Oda, M. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 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. *J Biol Chem.* 281, 30152 - 30165.

Atkin, J. D., Farg, M. A., Walker, A. K., McLean, C., Tomas, D., Horne, M. K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 30, 400 - 407.

Ayala, Y. M., Pantano, S., D'Ambrogio, A., Buratti, E., Brindisi, A., Marchetti, C., Romano, M., Baralle, F.E. (2005). Human, *Drosophila*, and *C.elegans* TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function. *J. Mol. Biol.* 348, 575 - 588.

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. *J Neurosci.* 30, 639 - 649.

Belzil, V. V., Daoud, H., Desjarlais, A., Bouchard, J. P., Dupré, N., Camu, W., Dion, P. A., Rouleau, G. A. (2011). Analysis of OPTN as a causative gene for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 32, 555.e13 - 14.

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. *Amyotroph Lateral Scler.* 12, 113 - 117.

Benham, A. M. (2012). The protein disulfide isomerase family: key players in health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 16, 781 - 789.

Bensimon, G., Lacomblez, L., Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med.* 330, 585 - 591.

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. *Mol Cell Biol.* 26, 9517 - 9532.

Boillée, S., Vande Velde, C., Cleveland, D. W. (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron.* 52, 39 - 59.

Borchelt, D. R., Davis, J., Fischer, M., Lee, M. K., Slunt, H. H., Ratovitsky, T., Regard, J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Price, D. L. (1996). A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genet Anal.* 13, 159 - 163.

Brooks, S. P., Trueman, R. C, Dunnett, S. B. (2012). Assessment of Motor Coordination and Balance in Mice Using the Rotarod, Elevated Bridge, and Footprint Tests. *Current Protocols in Mouse Biology* 2, 37-53.

Buratti, E., Baralle, F. E. (2008). Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front Biosci.* 13, 867 - 878.

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. *J. Biol. Chem.* 280, 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 J.* 277, 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, 92 - 96.

Cao, S. S., Kaufman, R. J. Unfolded protein response (2012). *Curr Biol.* 22, 622 - 626.

Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O., Berciano, M. T., Lafarga, M. (2009). TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons. *J. Struct. Biol.* 167, 235 - 241.

Chen, H. J., Anagnostou, G., Chai, A., Withers, J., Morris, A., Adhikaree, J., Pennetta, G., de Belleruche, J. S. (2010). Characterization of the properties of a novel mutation in VAPB in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 285, 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. *J Biol Chem.* 277, 13045 - 13052.

Chen, Y. Z., Bennett, C. L., Huynh, H. M., Blair, I. P., Puls, I., Irobi, J., Dierick, I., Abel, A., Kennerson, M. L., Rabin, B. A., Nicholson, G. A., Auer-Grumbach, M., Wagner, K., De Jonghe, P., Griffin, J. W., Fischbeck, K. H., Timmerman, V., Cornblath, D. R., Chance, P. F. (2004). DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet.* 74, 1128 - 1135.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 16320 - 16324.

Clark, R. E., Squire, L. R. (1998). Classical conditioning and brain systems: the role of awareness. *Science* 280, 77 - 81.

Cleveland, D. W., Rothstein, J. D. (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature Rev. Neurosci.* 2, 806 - 819.

Coe, H., Jung, J., Groenendyk, J., Prins, D., Michalak, M. (2010). ERp57 modulates STAT3 signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 285, 6725 - 6738.

Cozzolino, M., Pesaresi, M. G., Gerbino, V., Grosskreutz, J., Carri, M. T. (2012). Amyotrophic lateral sclerosis: new insights into underlying molecular mechanisms and opportunities for therapeutic intervention. *Antioxid Redox Signal.* 17, 1277 - 1330.

Damiano, M., Starkov, A. A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M., Manfredi, G. (2006). Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the

onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem* 96, 1349 - 1361.

de Jong, S., Huisman, M., Sutedja, N., van der Kooi, 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. *J Neurol.* 260, 507 - 512.

Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H., Beaumelle, B. (2012). The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic.* 13, 355 - 363.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G. Y., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., Wszolek, Z. K., Feldman, H., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Miller, B. L., Dickson, D. W., Boylan, K. B., Graff-Radford, N. R., Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 72, 245 - 256.

Dewey, C. M., Cenik, B., Sephton, C. F., Dries, D. R., Mayer, P. 3rd, Good, S. K., Johnson, B. A., Herz, J., Yu, G. (2011). TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1098 - 1108.

Dickson, D. W., Josephs, K. A., Amador-Ortiz, C. (2007). TDP-43 in differential diagnosis of motor neuron disorders. *Acta Neuropathol.* 114, 71 - 79.

Eacker, S. M., Dawson, T. M., Dawson, V. L. (2009). Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 10, 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. (2005). Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics.* 5, 635 - 651.

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. *Neurobiol Aging.* 33, 2855 - 2868.

Freibaum, 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. *J. Proteome Res.* 9, 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. *Nature Cell Biol.* 9, 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. *Arch Neurol.* 67, 606 - 616.
- Goosens, K. A., Maren, S. (2001). Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learn Mem.* 8, 148 - 155.
- Görlach, A., Klappa, P., Kietzmann, T. (2006). The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal.* 8, 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, 1936 - 1938.
- Grosskreutz, J., Van Den Bosch, L., Keller, B. U. (2010) Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium* 47, 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, 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. *Nat Genet.* 29, 166 - 173.
- Hagiwara, M., Nagata, K. (2012). Redox-dependent protein quality control in the endoplasmic reticulum: folding to degradation. *Antioxid Redox Signal.* 16, 1119 - 1128.
- 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. *Mol Biol Cell.* 10, 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, 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., Ben Hamida, M., Brown, R. Jr, Siddique, T. (1994). Linkage of recessive familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 2q33-q35. *Nat Genet.* 7, 425 - 428.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13, 89 - 102.

Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A. H., Bassik, M. C., Antonsson, B., Brandt, G. S., Iwakoshi, N. N., Schinzel, A., Glimcher, L. H., Korsmeyer, S. J. (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* 312, 572 - 576.

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 Dev.* 23, 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, 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. *Amyotroph Lateral Scler.* 12, 444 - 450.

Hosoda, A., Tokuda, M., Akai, R., Kohno, K., Iwawaki, T. (2009). Positive contribution of ERdj5/JPDI to endoplasmic reticulum protein quality control in the salivary gland. *Biochem J.* 425, 117 - 125.

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. *Amyotroph Lateral Scler.* 13, 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., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2011). Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J Clin Invest.* 121, 726 - 738.

Ikenaka, K., Katsuno, M., Kawai, K., Ishigaki, S., Tanaka, F., Sobue, G. (2012). Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int J Mol Sci.* 13, 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.* 130, 3111 - 3123.

Ince, P. G. (2000). *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Eds Brown, R. H. Jr, Meininger, V. & Swash, M. London.

Inoue, N., Nakao, H., Migishima, R., Hino, T., Matsui, M., Hayashi, F., Nakao, K., Manabe, T., Aiba, A., Inokuchi, K. (2009). Requirement of the immediate early gene *vesl-1S/homer-1a* for fear memory formation. *Mol Brain.* 2, 7.

Irmeler, M., Gentier, R. J., Dennissen, F. J., Schulz, H., Bolle, I., Hölter, 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 Neuropathol.* *124*, 187 - 197.

Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B. J., Vande Velde, C., Bouchard, J. P., Lacomblez, L., Pochigaeva, 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*, 572 - 574.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *103*, 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. *J Biol Chem.* *284*, 1593 - 1603.

Kim, Y. M., Jang, W. H., Quezado, M. M., Oh, Y., Chung, K. C., Junn, E., Mouradian, M. M. (2011). Proteasome inhibition induces α -synuclein SUMOylation and aggregate formation. *J Neurol Sci.* *307*, 157 - 161.

Kirby, J., Hewamadduma, C. A., Hartley, J. A., Nixon, H. C., Evans, H., Wadhwa, R. R., Kershaw, C., Ince, P. G., Shaw, P. J. (2007). Mutations in VAPB are not associated with sporadic ALS. *Neurology.* *68*, 1951 - 1953.

Kopito, R. R., Ron, D. (2000). Conformational disease. *Nat Cell Biol.* *2*, 207 - 209.

Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R. J., Kominami, E., Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* *14*, 230 - 239

Kovacic, P., Somanathan, R. (2012). Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. *Curr Neuropharmacol.* *10*, 289 - 302.

Kraemer, B. C., Schuck, T., Wheeler, J. M., Robinson, L. C., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Schellenberg, G. D. (2010). Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta Neuropathol.* *119*, 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. *Ann Neurol.* *58*, 800 - 803.

Kuo, P. H., Doudeva, L. G., Wang, Y. T., Shen, C. K., Yuan, H. S. (2009). Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic Acids Res.* *37*, 1799 - 1808.

- Kwiatkowski, T. J. Jr, 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. Jr. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 323, 1205 - 1208.
- 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. *Mol Cell Biol*. 23, 7448 - 7459.
- Lee, E. B., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. (2011) Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 13, 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 Dev*. 16, 452 - 466.
- Levine, B., Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 132, 27-42.
- Lin, J. H., Li, H., Zhang, Y., Ron, D., Walter, P. Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. (2009). *PLoS One* 4, e4170.
- 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 complexes with FUS/ TLS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 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, 1094 - 1097.
- Lovat, P. E., Corazzari, M., Armstrong, J. L., Martin, S., Pagliarini, V., Hill, D., Brown, A. M., Piacentini, M., Birch-Machin, M. A., Redfern, C. P. (2008). Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res*. 68, 5363 - 5369.
- Lüesse, H. G., Schiefer, J., Spruenken, A., Puls, C., Block, F., Kosinski, C. M. (2001). Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease: behavioral testing and impact of diabetes mellitus. *Behav Brain Res*. 126, 185 - 195.
- 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, 223 - 226.

Maselli, R. A., Wollman, R. L., Leung, C., Distad, B., Palombi, S., Richman, D.P., Salazar-Gruoso, E. F., Roos, R. P. (1993). Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 16, 1193 - 1203.

Matus, S., Glimcher, L. H., Hetz, C. (2011). Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER. *Curr Opin Cell Biol*. 23, 239 - 252.

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). *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 4, 96 - 99.

McGuire, V., Longstreth, W. T. Jr, Koepsell, T. D., Van Belle, G. (1996). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in three counties in western Washington state. *Neurology* 47, 571 - 573.

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, 141 - 143.

Mitsumoto, H., Chad, D. A., Pioro, E. P. (1998). *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Oxford Univ. Press, New York.

Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 297, 681 - 683.

Mulder, D. W. (1982). Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv. Neurol*. 36, 15 -22.

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. *Arch Neurol*. 64, 530 - 534.

Nagata, T., Ilieva, H., Murakami, T., Shiote, M., Narai, H., Ohta, Y., Hayashi, T., Shoji, M., Abe, K. (2007). Increased ER stress during motor neuron degeneration in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res*. 29, 767 - 771.

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, 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 Neuropathol*. 114, 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, e25545.

Neumann M. (2009). Molecular neuropathology of TDP-43 proteinopathies. *Int J Mol Sci.* 10, 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. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130 - 133.

Nishimura, A. L., Mitne-Neto, M., Silva, H. C., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J. R., Gillingwater, T., Webb, J., Skehel, P., Zatz, M. (2004). A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* 75, 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 Dev.* 22, 1451 - 1464.

Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, 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, 9220 - 9231.

Ou, S. H., Wu, F., Harrich, D., Garcia-Martinez, 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. *J. Virol.* 69, 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, e32479.

Paxinos, G., Franklin, K. B. (1997). *The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, 2nd edition.

Pereira, L. A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M. J., Deacon, N. J. (2000). A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* 28, 663 - 668.

Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K. R., Huelga, S. C., Moran, J., Liang, T. Y., Ling, S. C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., Kordasiewicz, H., Sedaghat, Y., Donohue, J.P., Shiue, L., Bennett, C.F., Yeo, G.W., Cleveland, D.W. (2011). Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature Neurosci.* 14, 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., Gotthardt, T., Akira,

S., Bouillet, P., Strasser, A. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 129, 1337 - 1349.

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., Isoviiita, 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, 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, 689 - 693.

Ron, D., Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8, 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. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 362, 59 - 62.

Rouschop, K. M., 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. *J Clin Invest*. 120, 127 - 141.

Rowland, L. P. (1992). *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Diseases*. Ed. Rowland, L. P., Raven.

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 Genet*. 4, e1000193.

- Sasaki, S., Takeda, T., Shibata, N., Kobayashi, M. (2010). Alterations in subcellular localization of TDP-43 immunoreactivity in the anterior horns in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 478, 72 - 76.
- Sato, T., Yamamoto, Y., Nakanishi, T., Fukada, K., Sugai, F., Zhou, Z., Okuno, T., Nagano, S., Hirata, S., Shimizu, A., Sakoda, S. (2004). Identification of two novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene with familial amyotrophic lateral sclerosis: mass spectrometric and genomic analyses. *J Neurol Sci.* 218, 79 - 83.
- Sephton, C. F., Good, S. K., Atkin, S., Dewey, C. M., Mayer, P. 3rd, Herz, J., Yu, G. (2010). TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *J Biol Chem* 285, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 16325 - 16330.
- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 4, 49 - 60.
- 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. *Neurobiol Aging.* 33, 837.e1-5.
- 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. *Neurobiol Dis.* 40, 404 - 414.
- Suzuki, H., Matsuoka, M. (2012). TDP-43 toxicity is mediated by the unfolded protein response-unrelated induction of C/EBP homologous protein expression. *J Neurosci Res.* 90, 641 - 647.
- Swarup, V., Phaneuf, D., Bareil, C., Robertson, J., Rouleau, G. A., Kriz, J., Julien, J. P. (2011). Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain.* 134, 2610 - 2626.
- Tabas, I., Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* 13, 184 - 190.
- Taylor, J. P., Hardy, J., Fischbeck, K. H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296, 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. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 496 - 503.

Tollervey, J. R., Curk, T., Rogelj, B., Briese, M., Cereda, M., Kayikci, M., König, J., Hortobágyi, T., Nishimura, A. L., Zupunski, V., Patani, R., Chandran, S., Rot, G., Zupan, B., Shaw, C. E., Ule, J. (2011). Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nature Neurosci.* 14, 452 - 458.

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. *J Neurochem.* 123, 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. (2010). Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-D. *J Exp Med.* 207, 1661 - 1673.

Turano, C., Gaucci, E., Grillo, C., Chichiarelli, S. (2011). ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cell Mol Biol Lett.* 16, 539 - 563.

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, 664 - 666.

Urushitani, M., Ezzi, S. A., Matsuo, A., Tooyama, I., Julien, J. P. (2008). The endoplasmic reticulum-Golgi pathway is a target for translocation and aggregation of mutant superoxide dismutase linked to ALS. *FASEB J.* 22, 2476 - 2487.

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. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 555 - 564.

van Blitterswijk, M., van Vught, P. W., van Es, M. A., Schelhaas, H. J., van der Kooij, A. J., de Visser, M., Veldink, J. H., van den Berg, L. H. (2012). Novel optineurin mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Aging.* 33, 1016.e1 - 7.

Vembar, S. S., Brodsky, J. L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 944 - 957.

Waldron-Roby, E., Ratovitski, T., Wang, X., Jiang, M., Watkin, E., Arbez, N., Graham, R. K., Hayden, M. R., Hou, Z., Mori, S., Swing, D., Pletnikov, M., Duan, W., Tessarollo, L., Ross, C. A. (2012). Transgenic mouse model expressing the caspase 6 fragment of mutant huntingtin. *J Neurosci.* 32, 183 - 193.

Wang, H.Y., Wang, I.F., Bose, J., Shen, C.K. (2004). Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics* 83, 130 - 139.

- Wang, M., Ye, R., Barron, E., Baumeister, P., Mao, C., Luo, S., Fu, Y., Luo, B., Dubeau, L., Hinton, D. R., Lee, A. S. (2010). Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis. *Cell Death Differ.* 17, 488 - 498.
- 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 Neuropathol* 110, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 18809 - 18814.
- Weydt, P., Hong, S. Y., Klot, M., Möller, T. (2003). Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport.* 14, 1051 - 1054.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 3858 - 3863.
- Woehlbier, U., Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPORosome: a matter of life and death. *Trends Biochem Sci.* 36, 329 - 337.
- Wu, L. S., Cheng, W. C., Hou, S. C., Yan, Y. T., Jiang, S. T., Shen, C. K. (2010). TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis* 48, 56 - 62.
- Wu, L. S., Cheng, W. C., Shen, C. K. (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. *J Biol Chem.* 287, 27335 - 27344.
- Xu, Y. F., Gendron, T. F., Zhang, Y. J., Lin, W. L., D'Alton, S., Sheng, H., Casey, M. C., Tong, J., Knight, J., Yu, X., Rademakers, R., Boylan, K., Hutton, M., McGowan, E., Dickson, D. W., Lewis, J., Petrucelli, L. (2010) Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J Neurosci.* 30, 10851 - 10859.
- 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, 73.
- 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, 807 - 814.

Young, M. R., Ileva, L. V., Bernardo, M., Riffle, L. A., Jones, Y. L., Kim, Y. S., Colburn, N. H., Choyke, P. L. (2009). Monitoring of tumor promotion and progression in a mouse model of inflammation-induced colon cancer with magnetic resonance colonography. *Neoplasia* 11, 237 - 246.

Zhao, Z. H., Chen, W. Z., Wu, Z. Y., Wang, N., Zhao, G. X., Chen, W. J., Murong, S. X. (2009). A novel mutation in the senataxin gene identified in a Chinese patient with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 10, 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 Genet.* 6, e1000887.