

UCH-FC  
Biotecnología  
479  
E.1



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE PREGRADO

**CARACTERIZACIÓN DE LINEAS DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE  
SOBREENPRESAN FORMAS MUTANTES DE LA FOLDASA ERP57 ASOCIADAS A  
LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA**

**MARTÍN NICOLÁS SEPÚLVEDA DURAND**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Director del Seminario de Título: Dr. Claudio Hetz

Co-Director de Seminario de Título: Dr. Danilo Medinas

Diciembre, 2015

Santiago – Chile



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 el Sr. Martín Nicolás Sepúlveda Durand

**“CARACTERIZACIÓN DE LINEAS DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREEXPRESAN FORMAS MUTANTES DE LA FOLDASA ERP57 ASOCIADAS A ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA”**

**MARTÍN NICOLÁS SEPÚLVEDA DURAND**

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

**Dr. Claudio Hetz**  
Director Seminario de Título

**Danilo Medinas**  
Co-Director Seminario de Título

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Tulio Núñez**  
Presidente Comisión

**Elías Utreras**  
Evaluador



Santiago de Chile, 18 de Diciembre, 2015

**“Equipados con sus cinco sentidos, el ser humano explora el universo que lo rodea y llama a esa aventura Ciencia”**

**Edwin Powell Hubble (1889-1953)**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todas las personas que me ayudaron y apoyaron durante este periodo de mi vida. Sin ellos este camino hubiese sido imposible.

A Gianina, por su infinita paciencia, su apoyo incondicional, su constante ayuda y su forma de ver el mundo. A mis papas, que siempre creyeron en mí, por toda la ayuda que me han dado durante mi vida y por la forma que me criaron a mí y mis hermanos. A Sebastián, por siempre ser mi fiel amigo. A mis hermanos, que sentí su apoyo desde la distancia. A mi familia, tíos y primos por el buen tiempo pasado con todos ellos. A mi nueva familia extendida, por recibirme como si fuera su hijo.

A todos los miembros del Laboratorio de Estrés celular y Biomedicina, con los cuales construí lazos que duraran para siempre. A Claudio, por la increíble oportunidad que me dio de poder trabajar en su laboratorio. A Danilo, que me enseñó todo lo que actualmente se con respecto al trabajo en laboratorio, pero más importantemente por la amistad que se forjó. A Pablo y Fran, por la ayuda y consejos que me dieron permanentemente durante mi tesis. Al equipo ELA, Leslie, Vicente y Natalia por ayudarme cuando lo necesitaba más y por los buenos tiempos que me brindaron.

A Valentina, por ser siempre una fiel amiga. A Mario, por siempre hacernos reír. A mis compañeros de la universidad, Froco, Francisco, Valentina por distraerme en los momentos más difíciles durante la carrera. A mis eternos amigos del colegio, por seguir estando ahí después de tantos años.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
3.1. Esclerosis lateral amiotrófica .....	7
3.2. El retículo endoplásmico y la respuesta a proteínas mal plegadas .....	9
3.3. Estrés de RE y ELA .....	12
3.4. Chaperonas en motoneuronas y ELA .....	14
3.5. Familia de proteínas disulfuro isomerasas.....	18
3.6. Proteína residente del retículo endoplasmático de 57 kDa .....	20
3.7. Rol de las PDI en ELA .....	23
3.8. ERp57 y ELA .....	25
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>29</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
5.1. Objetivo general .....	29
5.2. Objetivos específicos.....	29
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
6.1. Generación de ratones transgénicos para ERp57 mutante en el sistema nervioso central y su genotipificación .....	30
6.2. Monitoreo fenotípico de animales .....	34
6.2.1. Medición de peso corporal .....	34
6.2.2. Prueba motora de <i>Wire Hang test</i> .....	34
6.3. Análisis bioquímico de muestras de corteza, cerebelo, médula espinal y músculo esquelético.....	35
6.3.1. Extracción de proteínas .....	35
6.3.2. SDS-PAGE y Western blot.....	35
6.3.3. Extracción de RNA y generación de cDNA .....	37
6.3.4. PCR cuantitativo (qPCR) .....	37
6.4. Electromiografía (EMG) .....	38
6.5. Análisis de UNM .....	39
6.5.1. Histología de diafragma .....	39
6.5.2. Análisis de morfología de UNM .....	40
6.6. Análisis de músculo esquelético .....	41
6.7. Análisis estadístico .....	43
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>

7.1. Generación de líneas de ratones transgénicos que sobreexpresan las formas mutantes de ERp57 D217N y Q481K en el SNC .....	44
7.2. Caracterización del fenotipo patológico y motor de los modelos murinos que sobreexpresan formas mutantes de ERp57.....	49
7.3. Inervación muscular en ratones que sobreexpresan formas mutantes de ERp57.....	58
7.4. Análisis de músculo esquelético de ratones ERp57 mutantes .....	72
7.5. Evaluación de la activación de la UPR en el SNC en los modelos murinos que sobreexpresan las formas mutantes de ERp57. ....	80
7.6. Determinación del posible efecto de la sobreexpresión de las formas mutantes de ERp57 sobre proteínas sinápticas .....	86
<b>8. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>96</b>
8.1. Modelos transgénicos que sobreexpresan formas mutantes de ERp57 D217N y Q481K.....	96
8.2. Problemas motores encontrados en los modelos animales generados... ..	99
8.3. Posibles mecanismos de la disfunción motora encontrado en los modelos estudiados.....	108
8.4. Proyecciones .....	114
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>116</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cascada de señalización generada por la UPR .....	11
<b>Figura 2.</b> Proteínas disulfuro isomerasas (PDI).....	19
<b>Figura 3.</b> Ciclo de plegamiento de glicoproteínas en el RE .....	22
<b>Figura 4.</b> Estructura de proteína ERp57 con las mutaciones relacionadas a la ELA. ...	27
<b>Figura 5.</b> Generación de líneas transgénicas que sobreexpresan ERp57 <sup>D217N</sup> y ERp57 <sup>Q481K</sup> en el SNC .....	31
<b>Figura 6.</b> Confirmación de líneas transgénicas que sobreexpresan ERp57 <sup>D217N</sup> y ERp57 <sup>Q481K</sup> en el SNC .....	45
<b>Figura 7.</b> Niveles de mRNA de ERp57 en líneas transgénicas que sobreexpresan ERp57 <sup>D217</sup> y ERp57 <sup>Q481K</sup> en el SNC .....	47
<b>Figura 8.</b> Niveles de proteína ERp57 en líneas transgénicas que sobreexpresan ERp57 <sup>D217N</sup> y ERp57 <sup>Q481K</sup> en el SNC .....	48

<b>Figura 9.</b> Fenotipo y sobrevivencia de las colonias que sobreexpresan ERp57 <sup>D217N</sup> y ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	52
<b>Figura 10.</b> Curva de progreso de peso corporal de los ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> y ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	54
<b>Figura 11.</b> Desempeño en la prueba motora “Wire hang test” de los ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> y ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	55
<b>Figura 12.</b> Promedio del puntaje de desempeño en la prueba motora “Wire Hang test” de los ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> y ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	56
<b>Figura 13.</b> Registro de EMG de ratones de las colonias mutantes de ERp57 y SOD1 <sup>G93A</sup> .....	59
<b>Figura 14.</b> Análisis del ancho de banda de los terminales post-sinápticos en ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> .....	63
<b>Figura 15.</b> Análisis del ancho de banda de los terminales post-sinápticos en ratones de la colonia ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	64
<b>Figura 16.</b> Análisis de las morfologías de UNM de los ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> .....	66
<b>Figura 17.</b> Análisis de las morfologías de UNM de los ratones de la colonia ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	67
<b>Figura 18.</b> Análisis de los aparatos pre- y post-sináptico de las UNM de los ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> .....	69
<b>Figura 19.</b> Análisis de los aparatos pre- y post-sináptico de las UNM de los ratones de la colonia ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	70
<b>Figura 20.</b> Niveles de la proteína ERp57 en líneas transgénicas que sobreexpresan ERp57 <sup>D217N</sup> y ERp57 <sup>Q481K</sup> en el músculo esquelético.....	73
<b>Figura 21.</b> Análisis del músculo esquelético de la colonia de ratones ERp57 <sup>D217N</sup> .....	75
<b>Figura 22.</b> Análisis del músculo esquelético de la colonia de ratones ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	76
<b>Figura 23.</b> Composición y tamaño de las fibras musculares en los ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> .....	78
<b>Figura 24.</b> Composición y tamaño de las fibras musculares en los ratones de la colonia ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	79
<b>Figura 25.</b> Niveles de mRNA de marcadores de estrés de RE en ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> en el SNC.....	81

<b>Figura 26.</b> Niveles de mRNA de marcadores de estrés de RE en ratones de la colonia ERp57 <sup>Q481K</sup> en el SNC.....	82
<b>Figura 27.</b> Análisis de Western blot de chaperonas del RE en los tejidos del SNC de ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> .....	84
<b>Figura 28.</b> Análisis de Western blot de chaperonas del RE en los tejidos del SNC de ratones de la colonia ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	85
<b>Figura 29.</b> Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de médula espinal de los ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> .....	87
<b>Figura 30.</b> Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de médula espinal de los ratones de la colonia ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	88
<b>Figura 31.</b> Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de corteza de los ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> .....	89
<b>Figura 32.</b> Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de corteza de los ratones de la colonia ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	90
<b>Figura 33.</b> Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de cerebelo de los ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> .....	91
<b>Figura 34.</b> Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de cerebelo de los ratones de la colonia ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	92
<b>Figura 35.</b> Niveles de mRNA de proteínas sinápticas en ratones ERp57 mutantes en el SNC.....	95
<b>Figura 36.</b> Progresión y patogénesis de la enfermedad ELA.....	107
<b>Figura 37.</b> Efecto de las mutaciones de ERp57 relacionadas a la ELA en las motoneuronas.....	113

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Razón de nacimientos de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> .....	50
<b>Tabla 2.</b> Razón de nacimientos de la colonia ERp57 <sup>Q481K</sup> .....	50
<b>Tabla 3.</b> Resumen de resultados de EMG de ratones de la colonia ERp57 <sup>D217N</sup> y SOD1 <sup>G93A</sup> .....	61
<b>Tabla 4.</b> Resumen de resultados de EMG de ratones de la colonia ERp57 <sup>Q481K</sup> y SOD1 <sup>G93A</sup> .....	61

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- $\alpha$ BTX** –  $\alpha$  bungarotoxina
- AChR** – Acetylcholine receptor
- ANOVA** – Analysis of variance
- ATF3** – Activating transcription factor 3
- ATF4** – Activating transcription factor 4
- ATF6** – Activating transcription factor 6
- ATF6f** – Activating transcription factor 6 fragment
- BIP** – Binding immunoglobulin protein/Grp78
- BSA** – Bovine serum albumin
- C9orf72** – Chromosome 9 open reading frame 72
- CHOP** – C/EBP homologous protein
- CMA** – Chaperone mediated autophagy
- CNX** – Calnexin
- CRT** – Calreticulin
- DAPI** – 4',6-diamino-2-fenilindol
- DNA** – Deoxyribonucleic acid
- DTT** – Ditioneitol
- EA** – Enfermedad de Alzheimer's
- ECJ** – Enfermedad de Creutzfeld-Jakob's
- ECL** – Enhanced chemiluminiscence
- EDTA** – Ácido etilendiaminotetraacético
- eIF2 $\alpha$**  – Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$
- ELA** – Esclerosis lateral amiotrófica
- ELAe** – Esclerosis lateral amiotrófica esporádico
- ELAf** – Esclerosis lateral amiotrófico familiar
- EMG** – Electromiografía

**ERAD** – Endoplasmic reticulum-associated degradation  
**ERO1 $\alpha$**  – Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 $\alpha$   
**ERO1 $\beta$**  – Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 $\beta$   
**EP** – Enfermedad de Parkinson's  
**ERp57** – Endoplasmic reticulum resident protein 57 kDa  
**ERp72** – Endoplasmic reticulum resident protein 72 kDa  
**FUS** – Fused in sarcoma  
**Grp94** – Glucose-related protein 94 kDa  
**HRP** – Horseradish peroxidase  
**HSP90** – Heat shock protein 90 kDa  
**IL-2** – Interleuquina 2  
**iPSC** – Induced pluripotent stem cell  
**IRE1 $\alpha$**  – Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$   
**JNK** – JUN N-terminal kinase  
**KO** – Knockout  
**mRNA** – Messenger ribonucleic acid  
**NADH-TR** – Nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase  
**NMDAR2a** – N-methyl-D-aspartate receptor 2 $\alpha$   
**NOX** – NADPH oxidase  
**NP40** – Nonidet P-40  
**OCT** – Optimal cutting temperature  
**PBS** – Phosphate-buffered saline  
**PCR** – Polymerase chain reaction  
**PDI** – Protein disulfide isomerase  
**PERK** – PKR-like ER kinase  
**PFA** – Paraformaldehido  
**PrP** – Proteína de prion

**PNS** – Polimorfismo de nucleótido simple

**PSD95** – Post-synaptic density protein 95 kDa

**PVDF** – Polyvinylidene fluoride

**qPCR** – Quantitative PCR

**RE** – Reticulo endoplásmico

**RNA** – Ribonucleic acid

**RPM** – Revoluciones por minute

**SDS** – Sodium dodecyl sulphate

**SDS-PAGE** – Sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis

**SERCA** – Sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

**SNC** – Sistema nervioso central

**SOD1** – Superóxido dismutasa 1

**STAT3** – Signal transducer and activator of transcription 3

**SV2** – Synaptic vesicle glycoprotein 2

**TDP-43** – TAR DNA binding protein 43 kDa

**TA** – Tibialis anterior

**TE** – Tris-Cl-EDTA

**TEMED** - Tetrametiletilenodiamina

**TEN** – Tris-Cl-EDTA-NaCl

**TLS** – Translocated in sarcoma

**UNM** – Union neuromuscular

**UPR** – Unfolded protein response

**UPS** – Ubiquitin-proteosome system

**WGA** – Wheat germ agglutinin

**WT** – Wild type

**XBP1** – X-box binding protein 1

**XBP1s** – X-box binding protein 1 spliced

## 1. RESUMEN

El estrés celular asociado a la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (RE) es una de las características patológicas principales de la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Durante la respuesta al estrés de RE, chaperonas y foldasas son sobreexpresadas, incrementando la capacidad de plegamiento del RE. Las proteínas disulfuro isomerasas (PDI) son una de las principales chaperonas del RE, las que son además reguladas positivamente en la ELA. ERp57 es una proteína miembro de la familia de las PDI y una chaperona del RE que participa en el plegamiento de glicoproteínas, siendo parte del ciclo calnexina/calreticulina. ERp57 ha sido relacionada con diversas enfermedades, como el cáncer y la hepatitis, en las cuales su contribución ha sido ampliamente estudiada. El rol de ERp57 en el sistema nervioso y su posible contribución en enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y la ELA aún no han sido dilucidados. Recientemente nuestro laboratorio reportó las mutaciones sin sentido D217N y Q481K en ERp57 en pacientes con ELA. Estas mutaciones afectan la conectividad y función de motoneuronas en diferentes líneas celulares y en modelos de pez cebra. En este Seminario de Título, se caracterizaron ratones transgénicos que sobreexpresan estas formas mutantes de ERp57 en el sistema nervioso central bajo el promotor de la proteína de prion (PrP). Ambas mutaciones de ERp57 gatillaron un impedimento motor, indicado por mediciones de coordinación motora usando la prueba de "Wire Hang test". La causa probable del fenotipo motor observado fue investigada mediante mediciones de electromiografía para detectar la actividad espontánea en la sinapsis entre las motoneurona y el músculo, en donde no se encontraron alteraciones. Sin embargo, análisis morfológico de la unión neuromuscular (UNM) mostró que los

ratones transgénicos ERp57<sup>D217N</sup> presentan alteraciones en la innervación muscular. Los aparatos pre-sinápticos presentaron hinchazón axonal y los aparatos post-sinápticos mostraron anchos de banda terminales más angostos, morfologías anormales y de menor volumen. Estudios de la fisiología del músculo esquelético mostraron que estos ratones no desarrollan alteraciones morfológicas, fibrosis ni alteración en los ciclos de degeneración/regeneración. Los músculos esqueléticos presentaron alteraciones en los patrones de miofibras oxidativas, donde disminuyen las fibras de contracción rápida y aumentan las fibras de contracción lenta. Mediante qPCR y Western blot se encontró que los modelos estudiados no presentaban activada la vía de señalización de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), pero presentaron alteraciones en los perfiles de expresión de proteínas sinápticas en el sistema nervioso central. En conjunto, estos resultados indican que estas mutaciones de ERp57 relacionadas a la ELA causan alteraciones en la homeostasis proteica, en la integridad y equilibrio de la UNM y en la fisiología muscular. De esta forma, proponemos que las líneas de ratones generadas modelan etapas tempranas sintomáticas de la ELA.

## 2. ABSTRACT

Protein folding stress in the endoplasmic reticulum (ER) is a primary feature of the neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis (ALS). During ER stress, chaperones and foldases are overexpressed to increase the folding capacity of the ER. The Protein Disulfide Isomerases (PDIs) are major ER chaperones upregulated in ALS. ERp57 is a member of the PDI family and a chaperone of the ER that participates in the folding of glycoproteins, forming part of the calnexin/calreticulin cycle. ERp57 has been related with different diseases, like cancer and hepatitis, in which the contribution has been widely studied. The role of ERp57 in the central nervous system and its possible contribution in neurodegenerative diseases, like Alzheimer's disease and ALS still remain unclear. We recently reported the missense mutations D217N and Q481K of ERp57 in ALS cases. Mutations in ERp57 affect motoneuron connectivity and function in cell lines and zebrafish models. In this Seminar of Title, we report the characterization of mouse models that overexpress mutant ERp57 under *Prp* promoter in the central nervous system. Both mutations of ERp57 led to motor impairment, as determined by measurements of motor coordination using the Wire Hang test. The motor phenotype was further investigated by electromiography recordings, to detect muscle denervation, which did not show alterations. Neuromuscular junction (NMJ) analysis showed that transgenic ERp57<sup>D217N</sup> mice present abnormal muscle innervation. Pre-synaptic apparatus presented axonal swelling and post-synaptic apparatus narrower endplate bands, abnormal morphologies and decreased volume. Analysis of skeletal muscle physiology showed no alterations in morphology, fibrosis or degenerative/regenerative cycles, but revealed an altered profile of oxidative myofibers, with less fast-twitch fibers and more slow-twitch fibers in the ERp57<sup>D217N</sup> transgenic mice. qPCR and Western blot analysis showed that overexpression of mutant ERp57

do not cause activation of the unfolded protein response (UPR) signaling pathway, but lead to an altered expression profile of synaptic proteins in the central nervous system. Together, these results indicate that the ALS-linked mutant ERp57, disrupt NMJ integrity and equilibrium possibly through altered levels of synaptic proteins, causing alterations in muscle physiology and impaired motor performance, a phenotype resembling early symptomatic stages of ALS.

### 3. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por ser desordenes progresivos y crónicos, donde existe un deterioro de la función y estructura de grupos específicos de neuronas. Las funciones neuronales pueden ser perturbadas por diferentes mecanismos relacionados al envejecimiento y a la neurodegeneración, como lo son anomalías sinápticas, alteración en el transporte axonal, inhibición de la degradación proteosomal, alteraciones en la dinámica mitocondrial y estrés oxidativo (Su y col., 2010; Van Spronsen y Hoogenraad, 2010; Huang y Figueiredo-Pereira, 2010; Uttara y col., 2009; Millecamps y Julien, 2013). Dentro de las principales enfermedades neurodegenerativas, se encuentran la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), todas ellas tienen en común la presencia de agregados de proteínas mal plegadas en diferentes tejidos neuronales que gatilla una disrupción en la homeostasis proteica (proteostasis) neuronal (Soto, 2003).

La proteostasis es una red interconectada de procesos de control de calidad de proteínas en la célula, que mantiene el proteoma funcional (Balch y col., 2008). El retículo endoplásmico (RE) juega un rol importante en el mantenimiento de este equilibrio dinámico, debido a que cerca de un tercio del proteoma se sintetiza a través de éste organelo durante su paso por la vía secretora (Hetz y Mollereau, 2014). Los principales mecanismos implicados en la mantención del balance y el control de calidad de proteínas, están conformados por una red funcional de chaperonas y foldasas residentes del RE (Hetz y col., 2015). Por otra parte, también en el citosol se llevan a cabo procesos de degradación de proteínas que cumplen un rol importante en la mantención de la proteostasis. Por ejemplo, cuando las proteínas no se encuentran

correctamente plegadas, o se encuentran formando agregados proteicos, son destinadas a diferentes mecanismos de degradación (Lilienbaum, 2013). Los principales mecanismos de degradación de proteínas corresponden al sistema UPS (del inglés *ubiquitin-proteasome system*) y la autofagia. El sistema de UPS consiste en el marcaje de proteínas incorrectamente plegadas mediante una modificación post-traducciona con ubiquitina y su transporte hacia el proteosoma, donde son degradadas (Amm y col., 2014). La autofagia complementa al sistema UPS, degradando principalmente agregados proteicos, a través de tres mecanismos diferentes: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA) y microautofagia (Glick et al. 2010). Durante la macroautofagia, se sequestran porciones del citosol, que incluso pueden incluir organelos y proteínas, en vesículas autofágicas, las cuales son transportadas y fusionadas con los lisosomas donde ocurre la degradación de su contenido. En el caso de la CMA, el proceso de degradación ocurre a través del direccionamiento de proteínas al lisosoma por parte de chaperonas y en el caso de la microautofagia el lisosoma sequestra directamente porciones del citosol (Labbadia & Morimoto 2015). Otra estrategia celular para la mantención de la proteostasis durante periodos de sobrecarga de proteínas mal plegada en el RE, es mediante la disminución de la síntesis general de proteínas, donde diferentes vías culminan en la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 $\alpha$  (del inglés *eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$* ), y la expresión selectiva de proteínas de respuesta a estrés (Teske y col., 2011). De esta forma, surge el concepto de la respuesta de estrés integrada, mediante la cual diferentes mecanismos interconectados comunican el estado metabólico y oxidativo de la célula y la coordinan con la actividad del RE para lograr mantener la proteostasis y la sobrevivencia celular (Hetz y col., 2015).

### 3.1. Esclerosis lateral amiotrófica.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad degenerativa y progresiva que se caracteriza por la degeneración conjunta de células neuronales piramidales de la corteza motora primaria, el tracto corticoespinal y motoneuronas del tronco encefálico y el asta ventral de la médula espinal. Esto conlleva a la interrupción de todas las señales a músculos voluntarios, causando debilidad muscular y atrofia, seguido de progresiva parálisis muscular y la posterior muerte del paciente, típicamente después de 2 a 4 años de los primeros síntomas y generalmente por problemas respiratorios (Leblond y col., 2014).

La etiología de la ELA puede ser de tipo esporádico (ELAE) cuando no existen antecedentes previos de la enfermedad en la familia, o de tipo familiar (ELAF) cuando es causado por alguna mutación específica conocida (Leblond y col., 2014). Aunque la ELAE corresponde a cerca del 90% de los individuos afectados, es gracias a las mutaciones de genes específicos descubiertas en pacientes con ELAF que se ha podido estudiar los mecanismos patogénicos de la enfermedad. Debido a la similitud entre ambos tipos de patología y a que los mismos grupos neuronales están afectados, se ha postulado que terapias en modelos genéticos de la ELA pueden ser llevados a pacientes con ELAE. Los principales genes asociados a la ELAF y que presentan un alto riesgo causal en la enfermedad y los porcentajes de representación en ELAF son: (1) las repeticiones del hexanucleótido GGGGCC en una región intrónica de C9orf72 (37,6%) (Vance y col., 2006); (2) mutaciones en el gen que codifica para la Superóxido Dismutasa 1 (*SOD1*) (21%) (Rosen y col., 1993); (3) mutaciones en el gen *FUS/TLS* (4%) (Kwiatkowski y col., 2009; Vance y col., 2009); y (4) mutaciones en el gen que

codifica para la proteína de unión a DNA TAR (TDP-43) (4%) (Kabashi y col., 2008; Sreedharan y col., 2008).

La forma de herencia más común en la ELA, corresponden a mutaciones autosómicas dominantes, donde existen variaciones puntuales de nucleótidos los que pueden generar ganancias de funciones tóxicas, o la pérdidas de su función fisiológica (Winklhofer y col., 2008). Estas mutaciones gatillan la formación de agregados proteicos y oligómeros neurotóxicos de las proteínas mutadas, las cuales están asociada a la disrupción de la proteostasis y a la generación de estrés de RE (Winklhofer y col., 2008). Cabe destacar que alteraciones en el metabolismo del RNA han surgido también como un aspecto fundamental en la fisiopatología de la ELA, debido a que un porcentaje importante de los genes que pueden encontrarse mutados en formas familiares de la enfermedad corresponden a proteínas de unión a DNA/RNA, como TDP-43 y FUS (Ling y col., 2013).

Los mecanismos asociados a la ELA no se conocen del todo, pero múltiples investigaciones han mostrado que existen perturbaciones en las funciones celulares de las motoneuronas en la ELA, como lo son la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, un metabolismo anormal del calcio, transporte axonal alterado, y el mal plegamiento de proteínas (Pasinelli y Brown, 2006). Estas perturbaciones son consideradas como mecanismos autónomos de la célula, donde el daño dentro de una población de motoneuronas por si sola es suficiente para producir la enfermedad (Ilieva y col., 2009). A pesar de la vulnerabilidad selectiva aparente de motoneuronas, múltiples líneas de evidencia indican que mecanismos no-autónomos de la motoneurona pueden contribuir a la patogénesis de la ELA, como es el caso de los astrocitos y las microglías (Ilieva y col., 2009).

### 3.2. El retículo endoplásmico y la respuesta a proteínas mal plegadas

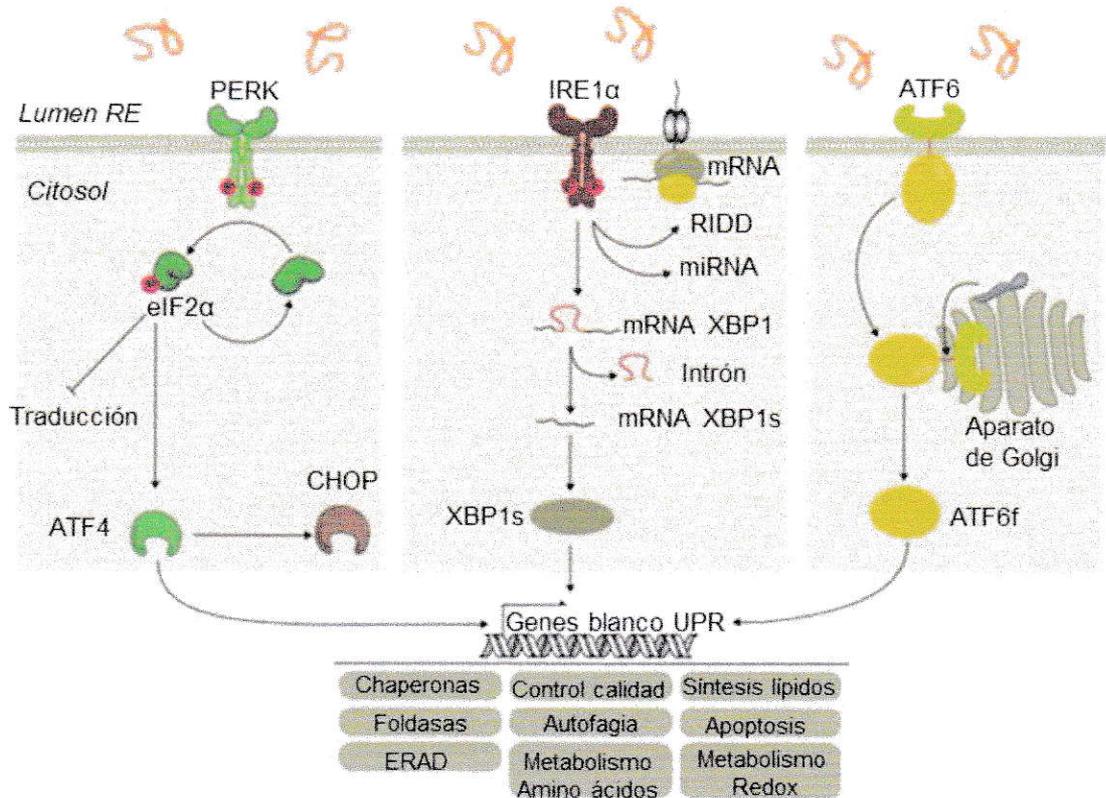
El RE es un organelo celular organizado en un sistema de cisternas tubulares que forman una red interconectada involucrada en diversos procesos metabólicos. En el RE, cerca de un tercio del proteoma total de las células inicia su proceso de plegamiento, maduración y tráfico hacia la ruta de secreción (Hetz y Mollereau, 2014). El plegamiento de proteínas es un proceso controlado por un conjunto de chaperonas, foldasas y co-factores residentes del RE que controlan la calidad del proceso, previniendo el mal plegamiento y agregación de proteínas traducidas. Perturbaciones en los procesos fisiológicos de este organelo y en la función de chaperonas resulta en la acumulación de proteínas no plegadas o mal plegadas, causando una condición celular denominada “estrés de RE”. El estrés de RE activa una cascada de transducción de señales adaptativas llamada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*) (Hetz y Mollereau, 2014).

La activación de la UPR afecta diferentes aspectos de la ruta secretora restaurando los niveles de proteostasis celular. La UPR se divide en dos eventos temporales, iniciando mecanismos adaptativos de sobrevivencia, los cuales son seguidos por eventos de muerte celular bajo condiciones crónicas de estrés (Hetz y col., 2015). La presencia de proteínas mal plegadas en el interior del lumen del RE desencadena una transducción de señales que se inicia con la detección de éstas, por parte de sensores presentes en la membrana del RE. En mamíferos se han identificado tres sensores de estrés de RE que desencadenan la UPR: IRE1 $\alpha$  (del inglés *Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$* ), ATF6 (del inglés *Activating transcription factor 6*) y PERK (del inglés *Protein kinase RNA-like ER kinase*). La activación de cada uno de estos sensores transduce la información sobre el estado de plegamiento proteico en el RE hacia el citosol, donde

activan tres factores de transcripción: XBP1 (del inglés *X-box binding protein 1*), ATF6f (del inglés *Activation transcription factor 6 fragment*) y ATF4 (del inglés *Activation transcription factor 4*) respectivamente, los que culminan con un cambio en el perfil de expresión génica (Figura 1).

Las primeras adaptaciones celulares al estrés en el RE, corresponden a la disminución de la carga proteica mediante la inhibición de la traducción general de proteínas debido a la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , la degradación de mRNA (del inglés *messenger ribonucleic acid*) codificantes con destino al RE, regulación positiva de la autofagia, inhibición de la traslocación de proteínas sintetizadas al RE y la síntesis de factores claves de la maquinaria de plegamiento y control de calidad, como BiP (del inglés *Binding immunoglobulin protein*), calreticulina (CRT), calnexina (CNX) y proteínas de la familia de proteínas disulfuro isomerasas (PDI), como ERp57 y PDIA1. Si bajo estas condiciones no se logra recuperar la proteostasis y el estrés de RE perdura de forma crónica, se desencadena la vía de muerte celular mediante apoptosis (Hetz, 2012; Schröder y Kaufman, 2005).

IRE1 $\alpha$  es una enzima bifuncional, con actividad quinasa y endoribonucleasa, la cual cataliza el procesamiento o "*splicing*" de un fragmento del mRNA que codifica para el factor de transcripción denominado XBP1, cambiando su marco abierto de lectura y permitiendo la formación de una proteína más estable denominada XBP1s. XBP1s trasloca al núcleo, donde activa la transcripción de genes relacionados a la UPR, que codifican para proteínas involucradas con el plegamiento, síntesis de lípidos y componentes del sistema de degradación ERAD (del inglés *ER-associated protein degradation*) (Hetz, 2012). La activación de IRE1 $\alpha$  también puede desencadenar



**Figura 1. Cascada de señalización generada por la UPR.** Los tres sensores de estrés de RE, IRE1α, PERK y ATF6, se activan cuando existe una sobrecarga de proteínas mal plegadas en el RE y gatillan una respuesta adaptativa para restituir la proteostasis celular mediante la activación de genes blancos relacionados a la UPR. Modificado de Hetz y col., 2015.

cascadas de señalización mediante la interacción con JNK (del inglés *JUN N-terminal kinase*), donde se pueden generar señales pro-apoptóticas y de autofagia (Hetz, 2012).

Bajo estrés de RE, ATF6 migra hacia el aparato de Golgi, donde es procesado por enzimas proteolíticas, liberando el factor de transcripción ATF6f. ATF6f activa la expresión de genes relacionados a la UPR, que codifican para proteínas involucradas con el plegamiento, componentes del ERAD y XBP1 (Ron y Walter, 2007).

La activación de PERK inhibe la traducción general de proteínas mediante la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , lo que promueve la traducción selectiva de ATF4. ATF4 activa la transcripción de diferentes genes involucrados en restablecer el balance redox, el aumento de los niveles de chaperonas y la regulación del metabolismo de aminoácidos, la autofagia y la apoptosis (Ron y Walter, 2007). La activación sostenida de PERK es un evento importante en la transición entre una respuesta adaptativa al estrés y la muerte celular, ya que a través de una serie de respuestas transcripcionales sucesivas mediadas por ATF4, es que finalmente se activa la expresión del factor de transcripción pro-apoptótico CHOP (del inglés *C/EBP-homologous protein*), el cual desencadena la muerte por apoptosis (Ron y Walter, 2007).

### **3.3. Estrés de RE y ELA**

El estrés de RE se induce en muchas enfermedades, como la diabetes, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, los desórdenes inmunológicos y las enfermedades neurodegenerativas (Oakes y Papa, 2015)

En el caso de la ELA, existe numerosa evidencia sobre la participación del estrés de RE en esta patología. Éstas se han encontrado en tejidos post-mortem de pacientes, y en modelos celulares y animales de la enfermedad (Matus y col., 2013).

Existen diferentes modelos murinos de ELAf, siendo los más estudiados aquellos que sobreexpresan formas mutantes de la proteína SOD1, como G93A y G86R, las cuales recapitulan eventos patológicos claves de la ELA en humanos (Julien y Kriz, 2006).

Un estudio realizado en motoneuronas vulnerables (neuronas que sufren degeneración temprana) en modelos murinos de ELAf, mediante disección laser y análisis transcriptómico, mostró que estas neuronas son propensas a sufrir estrés de RE crónico por su perfil de expresión génica relacionado con la UPR. Además, estos cambios fueron detectados en etapas asintomáticas, es decir, antes de la denervación muscular, lo que indica un rol activo del estrés de RE en la patogénesis (Saxena y col., 2009). En médula espinal post-mortem de pacientes con ELAe y ELAf, se han identificado la sobre-activación de las tres ramas de señalización de la UPR, altos niveles de chaperonas de RE, como las proteínas de la familia de PDI, ERp57 (Hetz y col., 2009) y PDIA1 (Ilieva y col., 2007), así como también la expresión de XBP1s y ATF4 (Hetz y col., 2009).

Recientes estudios transcriptómicos han ratificado la relación entre la ELA con la UPR (Prudencio y col., 2015; Sun y col., 2015). El equipo de Prudencio y col., 2015 realizó un análisis del perfil transcriptómico en cerebro de pacientes con ELAf asociados a mutaciones en C9orf72 y encontraron que genes blancos de la UPR son regulados positivamente en pacientes. Esto muestra que la UPR se encuentra activada en pacientes con la mutación más común en ELAf. Otro estudio transcriptómico en modelos murinos de ELAf mostró que los inicios de la patogénesis relacionada a la ELA está restringida a las motoneuronas e incluyen anomalías sinápticas y metabólicas, estrés de RE y activación de la vía PERK de la UPR (Sun y col., 2015).



De esta forma, se confirma que la activación de la UPR es un evento transversal en ELA.

### **3.4. Chaperonas en motoneuronas y ELA.**

Las chaperonas, co-chaperonas, foldasas y co-factores de una célula constituyen su “sistema de chaperonas”. Los componentes de este sistema forman grupos funcionales y redes, las cuales catalizan el plegamiento y controlan la calidad de proteínas (Kakkar y col., 2014). El sistema de chaperonas mantiene la proteostasis de las células, por lo tanto, la falla de una chaperona en particular puede tener efectos que repercuten más allá de su localización subcelular (Kakkar y col., 2014).

Condiciones patológicas en las cuales alteraciones en una chaperona es un factor causal son denominadas Chaperonopatias (Macario y Conway De Macario, 2007). Estos desordenes se caracterizan por un incremento o una disminución de los niveles de chaperonas o por la ganancia o pérdida de alguna de sus funciones (debido a mutaciones o modificaciones post-traduccionales) (Kakkar y col., 2014).

En etapas tempranas de la activación de la UPR, existe un aumento en la capacidad de plegamiento en el RE, debido a la sobre expresión de chaperonas del RE, como BiP, Grp94, CRT, CNX y diferentes miembros de la familia PDI (Schröder y Kaufman, 2005). La respuesta temprana protectora fuerte al estrés de RE disminuye con el envejecimiento (Naidoo y col., 2008), y el declive en las funciones celulares relacionadas a la edad son atribuibles en parte al progresivo fallo del sistema de chaperonas (Macario y Conway De Macario, 2002).

Dentro de las enfermedades neurodegenerativas, el rol causal que ejerce el sistema de chaperonas en la patogénesis ha sido ampliamente estudiado (Macario y

Conway De Macario 2002). Se ha postulado que el sistema de chaperonas podría encontrarse sobrecargado por la alta demanda de asistencia en el plegamiento y estabilización, derivada de la presencia de proteínas mutantes relacionadas a cierta enfermedad. Otro razonamiento propone que la falla del sistema de chaperonas se produce debido a mutaciones genéticas en algún componente del sistema, con pérdida parcial o completa de su función (Macario y Conway De Macario, 2002).

Diferentes estudios se han realizado en el área de las chaperonopatías mediante la generación de modelos genéticos, donde se delecionan alelos que codifican para chaperonas residentes del RE, para así estudiar el efecto que ejercen en modelos murinos de la ELAf. Los principales chaperonas de RE analizados corresponden a CNX, CRT, BiP y el co-factor de BiP SIL1. Estos estudios han apoyado el concepto de que las motoneuronas son selectivamente vulnerables a perturbaciones en la función del RE y muestran la importancia que tiene el sistema de chaperonas y las consecuencias de posibles fallas de miembros de este sistema pueden tener en la ELA, el estrés de RE y el plegamiento de proteínas.

Por ejemplo, se observó el efecto de la deficiencia de CNX mediante la generación de un ratón *knockout* (KO) completo (Denzel y col., 2002). Su ausencia no fue esencial para la viabilidad embrionaria, ya que se completó el periodo de gestación normal, aunque un 50% de las crías KO murió dentro de los 2 primeros días de vida. Los ratones que sobrevivieron fueron más pequeños que sus hermanos de camada silvestres y mostraron desórdenes motores. Estos desórdenes fueron asociados a una pérdida drástica de fibras mielinizadas. Los fenotipos motores presentes fueron ataxia, temblores, retropulsión y geotaxis negativa y la sobrevivencia de estos ratones fue de 3 meses (Denzel y col., 2002).

En el caso de la deficiencia de la chaperona CRT en ratones, se ha observado que animales KO mueren entre el día embrionario 12,5-18 por problemas en el desarrollo del sistema cardiaco y muscular (Mesaeli y col., 1999). En la ELA, se ha visto que existe una disminución de un 40% de los niveles de CRT en motoneuronas vulnerables en etapas pre-sintomáticas y estos continúan hasta etapas tardías de la enfermedad (Bernard-Marissal y col., 2012). De esta forma, Bernard-Marissal y colaboradores realizaron la delección de un alelo de CRT en un modelo de ELA que sobreexpresa SOD1<sup>G93A</sup> (*crt*<sup>+/-</sup>;SOD1<sup>G93A</sup>) y observaron que estos ratones desarrollan debilidad y denervación muscular más temprana y en mayor cantidad que ratones SOD1<sup>G93A</sup> (Bernard-Marissal y col., 2015). Así, se confirma que perturbaciones en la función correcta del RE, mediante la haploinsuficiencia de esta chaperona, tiene efectos negativos sobre la ELA experimental.

La chaperona BiP también ha sido blanco de estudio en cuanto a su papel en procesos de neurodegeneración (Luo y col., 2006; Wang y col., 2010; Jin y col., 2014). La deficiencia completa de BiP en ratones es letal, debido a problemas en el crecimiento embrionario (Luo y col., 2006). Se realizó un KO condicional de BiP en células de Purkinje mediante el sistema de recombinación Cre-loxP en ratones, en los cuales se observó neurodegeneración. Estos ratones mostraron retardo en el crecimiento, defectos en la coordinación motora, alteraciones en el patrón de pisadas y atrofia en el cerebelo. También presentaron niveles elevados de estrés de RE, representado por altos niveles de Grp94, CHOP, GADD34 y PDIA1 (Wang y col., 2010). Otros aspectos importantes encontrados consisten en alteraciones morfológicas del RE y aumentos en p62, un factor relacionado con la autofagia y una disminución en la cantidad de proteínas ubiquitinadas citosólicas (Wang y col., 2010). Un estudio

reciente mostró el efecto que tiene una mutación en la secuencia de recuperación del RE de esta chaperona en ratones heterocigotos, mediante la técnica de *knockin* (Jin y col., 2014). Este modelo presentó neurodegeneración en la médula espinal, con serios problemas motores observados a los 21 meses de vida, relacionados a degeneración selectiva de motoneuronas. También presentaron acumulación de proteínas ubiquitinadas incluidos agregados de SOD1, y fallos en los sistemas de control de calidad y la autofagia (Jin y col., 2014).

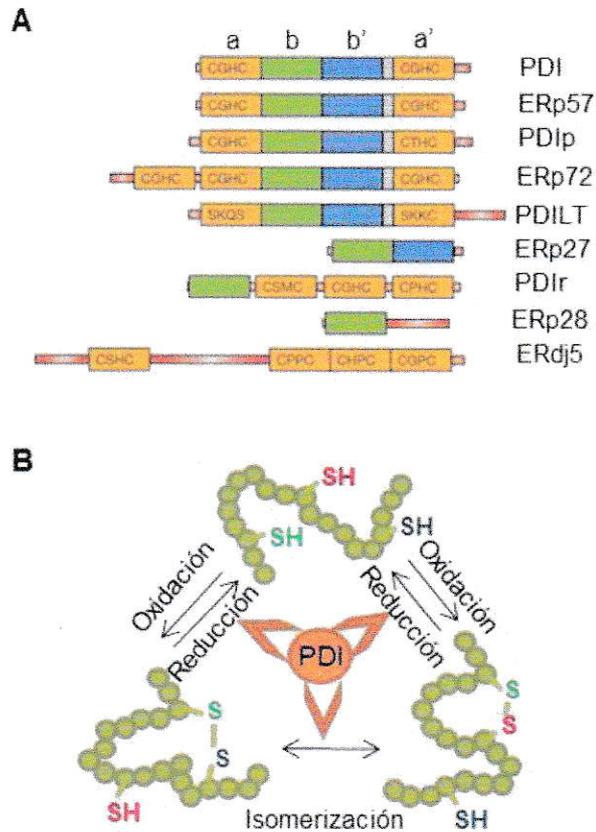
Por otra parte, un estudio reciente mostró que una co-chaperonas de BiP, SIL1, también está relacionada a la neurodegeneración de motoneuronas en la ELA (Filézac de L'Etang y col., 2015). SIL1, un factor de intercambio de nucleótidos de BiP fue identificado como un gen expresado robustamente en motoneuronas resistentes a la degeneración en modelos de ratones transgénicos de SOD1 mutante. Mientras que en motoneuronas vulnerables, su expresión disminuye a lo largo de la enfermedad. La delección de un alelo de SIL1 en un modelo de ELA que sobreexpresa SOD1<sup>G93A</sup> exacerbó las características patológicas de la ELA, aumentando los niveles de estrés de RE, los niveles de la proteína SOD1 mal plegada, adelantando la denervación de la unión neuromuscular (UNM) y disminuyendo la expectativa de vida de los ratones (Filézac de L'Etang y col., 2015).

Por lo tanto se postula que perturbaciones en el sistema de chaperonas está relacionado al desarrollo de problemas motores en ratones KO y modelos transgénicos de ELA. De esta forma, las chaperonas residentes del RE serían vitales para la mantención de motoneuronas bajo condiciones de estrés de plegamiento de proteínas. Estos estudios proponen que las motoneuronas son selectivamente vulnerables a la disrupción de la función del RE y el sistema de chaperonas.

### 3.5. Familia de proteínas disulfuro isomerasas.

Las proteínas disulfuro isomerasas (PDI) son las principales chaperonas del RE que son reguladas positivamente en la ELA, por lo que son candidatos de investigación importantes en esta enfermedad. Éstas chaperonas están estructurados con dominios tiorredoxina involucradas en la oxido-reducción (formación/eliminación) e isomerización (rearrreglo) de puentes disulfuro, a partir de los grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteínas de una variedad de proteínas sustratos (Figura 2B). La familia de proteínas PDI está compuesta por aproximadamente 20 miembros (Figura 2A) clasificados según su secuencia y homología estructural, donde algunos de los miembros más estudiados son PDIA1, ERp57 y ERp72 debido a su inducción durante el estrés de RE como blancos de la UPR (Walker y Atkin, 2011; Appenzeller-Herzog y Ellgaard, 2008; Benham, 2012). Los puentes disulfuro intra-moleculares confieren la estabilidad de las proteínas, mientras que los puentes disulfuro inter-moleculares mantienen la asociación de complejos multiméricos (Lu y Holmgren, 2014).

Los miembros de las PDI se caracterizan por sus diferentes arreglos y por la cantidad de dominios tipo tiorredoxina catalíticos y no catalíticos que poseen (Figura 2A) (Ferrari y Söling, 1999). Los dominios catalíticos (denominados a y a') contienen los sitios activos caracterizados por el motivo CXXC, el cual media la actividad redox e isomerasa. Los dominios no catalíticos (denominados b y b'), actúan estabilizando los dominios a y a', participan en el reclutamiento de sustratos y en la interacción con otros cofactores (Turano y col., 2011). Un proceso importante para la formación de puentes disulfuro en el RE esta mediado por la oxidasa de unión a FAD denominada ERO1 $\alpha$  y ERO1 $\beta$  (Feige y Hendershot 2011). ERO1 $\alpha$  participa en el reciclaje de las PDI en su forma reducida a sus estados activos mediante la oxidación de las chaperonas y la consiguiente reducción de O<sub>2</sub> hacia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De esta forma, las PDI entran en un nuevo



**Figura 2. Proteínas disulfuro isomerasas (PDI).** (A) Representación de miembros de la familia de proteínas PDI. Los dominios tipo tioredoxinas se muestran en rectángulos, donde los dominios catalíticos a y a' son amarillos y los dominios no catalíticos b son verdes y b' son azules. El rectángulo gris muestra una estructura conservada denominada x-linker, que une b' con a'. Modificado de Ellgaard y Ruddock, 2005. (B) Esquema representativo del plegamiento de proteínas mediado por miembros de las PDI. La familia PDI puede reducir, oxidar y/o isomerizar puentes disulfuros en sus proteínas sustratos.

ciclo redox para catalizar la formación de puentes disulfuro de nuevos sustratos (Tu y Weissman, 2002). La isomerización de puentes disulfuro se refiere al rearrreglo de estos enlaces cuando han sido formado incorrectamente y consiste en ciclos de reducción y oxidación (Appenzeller-Herzog y Ellgaard, 2008).

En conjunto, los miembros de las PDI actúan como chaperonas del RE, promoviendo el plegamiento de proteínas a su estado nativo y previniendo su mal plegamiento y agregación (Andreu y col., 2012). Además, algunos miembros de las PDI participan en diversos procesos celulares como es la eliminación de proteínas mal plegadas mediante ERAD (Lee y col., 2010), la mantención de la homeostasis del calcio (Li y Camacho, 2004), la presentación de antígenos (Cresswell y col., 2005) y la exportación de proteínas hacia el aparato de Golgi (Delom y col., 2001).

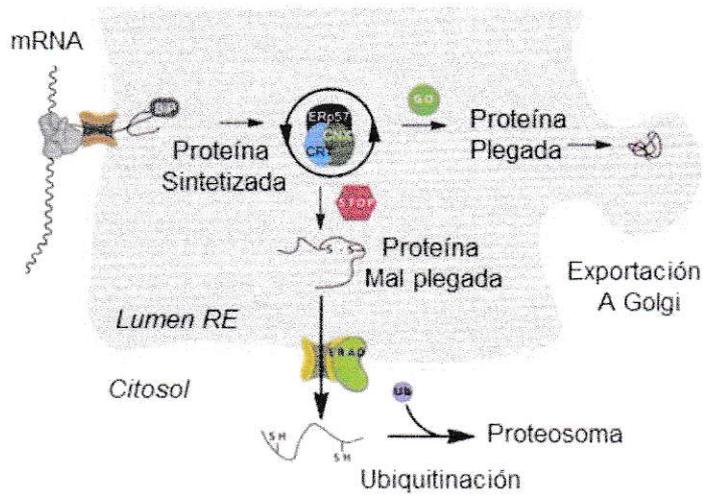
### **3.6. Proteína residente del retículo endoplasmático de 57 kDa.**

La proteína residente del RE de 57 kDa (ERp57) es un miembro de la familia PDI y una proteína de respuesta a estrés. Presenta dos dominios catalíticos (a y a') con motivos CGHC en su sitio activo, dos dominios no catalíticos (b y b'), el motivo QEDL de retención al RE en el C-terminal y un motivo KPKKKKK de localización nuclear (Shishkin y col., 2013). ERp57 está presente en diferentes compartimientos subcelulares, donde tiene diferentes funciones formando complejos con diversas proteínas (Turano y col., 2011).

Una función ampliamente estudiada de ERp57 consiste en el plegamiento de glicoproteínas que se secretan o proteínas de transmembrana y su control de calidad en el RE. ERp57 se encuentra asociada con CRT o su proteína paróloga de transmembrana CNX (Noack y col., 2014). Específicamente, el dominio b' de ERp57

esta enriquecido con lisinas y argininas proporcionándole cargas positivas y promoviendo la interacción con el dominio P negativamente cargado de CNX y CRT (Kozlov y col., 2006). El ciclo de plegamiento de glicoproteínas recientemente sintetizadas (Figura 3) empieza cuando el polipéptido emerge en el lumen del RE y es modificado covalentemente mediante la N-glicosilación en el sitio consenso NXS/T. Luego, la glicoproteína es reclutada por las lectinas CNX/CRT asociadas a ERp57. El complejo CNX/CRT-ERp57 asiste el plegamiento de la proteína sustrato. Si la proteína está cercana a su forma nativa, será reincorporada en el complejo y sufrirá un nuevo ciclo de plegamiento hasta alcanzar un mínimo energético. Proteínas completamente plegadas son exportadas al aparato de Golgi, donde continúa su maduración. Proteínas mal plegadas terminales son llevadas a degradación en el citoplasma mediante ERAD (Noack y col., 2014).

ERp57 participa también en procesos como el ensamblaje del complejo de carga de péptidos del Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase I (MHC-I) en el RE (Lindquist y col., 1998). Fuera del RE, ERp57 actúa a nivel de la superficie celular, el citoplasma y el núcleo (Turano y col., 2011). Se ha demostrado que ERp57 puede generar interacciones con el factor de transcripción STAT3 en el núcleo y en el citoplasma y modular su señalización (Coe y col., 2010). También existe evidencia de que ERp57 interactúa con componentes del citoesqueleto como  $\beta$ -actina, vimentina y  $\beta$ -tubulina de clase III (Santana-Codina y col., 2013), además de controlar la actividad de la bomba de calcio SERCA (Li y Camacho, 2004). De esta forma, se tiene que ERp57 participa en diferentes funciones fisiológicas de la celular, además del control de calidad de proteínas.



**Figura 3. Ciclo de plegamiento de glicoproteínas en el RE.** La proteína recientemente sintetizada es traslocada al lumen del RE, donde es N-glicosilada. La glicoproteína no plegada es reclutada por Calnexina/Calreticulina y enzimas asociadas como ERp57, que catalizan la oxido-reducción e isomerización de puentes disulfuros. La glicoproteína es liberada del complejo, y si no ha adquirido su estructura nativa, vuelve a entrar al ciclo de plegamiento. Cuando adquiere su forma nativa, es exportada al aparato de Golgi. Proteínas mal plegadas terminales son llevadas a degradación en el citoplasma mediante ERAD. Modificado de Noack y col., 2014.

### 3.7. Rol de las PDI en ELA.

Defectos en la función de las PDI han sido relacionados a enfermedades neurodegenerativas como la EA (Honjoy col., 2011), la EP (Colla y col., 2012) y desordenes relacionadas a priones, como es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) (Yoo y col., 2002).

Actualmente, la contribución funcional de las PDI en los mecanismos patogénicos de enfermedades neurodegenerativas está siendo ampliamente investigado (Andreu y col., 2012; Benham, 2012). En el caso de la ELA, dos miembros de la familia PDI, PDIA1 y ERp57, se encuentran regulados positivamente como se demostró en estudios proteómicos de médula espinal de ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína mutante SOD1<sup>G93A</sup> en etapas pre-sintomáticas, sintomáticas y finales de la enfermedad (Atkin y col., 2006; Massignan y col., 2007). Estas observaciones fueron confirmadas en médula espinal (Ilieva y col., 2007) y líquido cefalorraquídeo (Atkin y col., 2008) de pacientes con ELAe, encontrándose tendencias similares con respecto a los niveles de PDI. Es más, en un estudio realizado con células mononucleares de sangre periférica de pacientes con ELAe (Nardo y col., 2011), se logró identificar que PDIA1, ERp57 y la chaperona CRT podrían ser utilizados como posibles biomarcadores para el diagnóstico y el monitoreo de la progresión de la ELA (Nardo y col., 2011). Estos descubrimientos han abierto un área de investigación que relaciona el rol de chaperonas y foldasas residentes del RE, como las PDI, en el campo de estudio de la ELA.

Debido a la relación que se ha observado entre PDIA1 y ERp57 y la ELA, se han realizado estudios que analizan si estas PDI interactúan con los agregados proteicos típicos de la ELA (Atkin y col., 2006; Honjo y col., 2011; Frag y col., 2012). En cuanto a

SOD1, se ha reportado una interacción física entre PDIA1 y SOD1 mutante y silvestre en el RE y co-localización con inclusiones de SOD1 mutante (Atkin y col., 2006). Se ha postulado que los agregados de SOD1 contienen puentes disulfuros anormales (Furukawa y col., 2006), lo que sugiere que la formación de agregados insolubles patogénicos están relacionados a la creación de puentes disulfuros incorrectos y es ahí, donde PDIA1 podría jugar un rol importante en el correcto plegamiento de SOD1 y en la prevención de la formación de agregados neurotóxicos (Atkin y col., 2006). De forma similar, se ha visto que FUS interactúa con PDIA1 y co-localizan en cultivos celulares y médula espinal de pacientes con ELAe y ELAf (Farg y col., 2012). Honjo y col. mostraron que PDIA1 co-localiza con TDP-43 y SOD1, y que PDIA1 se encuentra modificada post-traduccionalmente por S-nitrosilaciones (Honjo y col., 2011).

El estrés nitrosativo está relacionado al aumento de especies reactivas de nitrógeno, y está ligado a procesos relevantes en la ELA, como es la exitotoxicidad, la activación del receptor de glutamato, la neuroinflamación y el estrés oxidativo (Uehara, 2007). La S-nitrosilación involucra la unión covalente de monóxido de nitrógeno (NO) al residuo de cisteína, la cual altera procesos de PDIA1, tanto en la inhibición de su actividad enzimática como en interacciones proteína-proteína, lo que podría generar estrés crónico (Hess y col., 2005). También se ha visto nitración en tirosinas de PDIA1 y ERp57 en ratones SOD1<sup>G93A</sup> (Walker y Atkin, 2011), la cuales estarían inhibiendo las funciones protectoras de estas chaperonas. Por otro lado, estudios muestran que en ratones transgénicos modelos de ELAf que sobreexpresan la proteína mutante SOD1<sup>G93A</sup>, las PDI se asocian con la activación de NADPH oxidasa (NOX) en microglías y en la producción de superóxido y estrés nitrosativo (Jaronen y col., 2013).

Se sugiere que las PDI también podrían tener una relación con eventos neurotóxicos en la ELA, aduciendo estrés oxidativo debido a un desbalance en el estado redox del RE (Jaronen y col., 2013). Se ha propuesto que las PDI tendrían un rol controversial en la ELA, debido a que el aumento descontrolado de su expresión durante la activación de la UPR podría generar la activación de NOX, llevando a un estrés nitrosativo anormal el cual generaría nitración de las mismas PDI y su consiguiente inactivación (Jaronen y col., 2014). En conjunto estos estudios han demostrado que la función de las PDI esta alterada en la ELA, lo que tendría potenciales implicaciones en la patogénesis de la enfermedad.

### **3.8. ERp57 y ELA.**

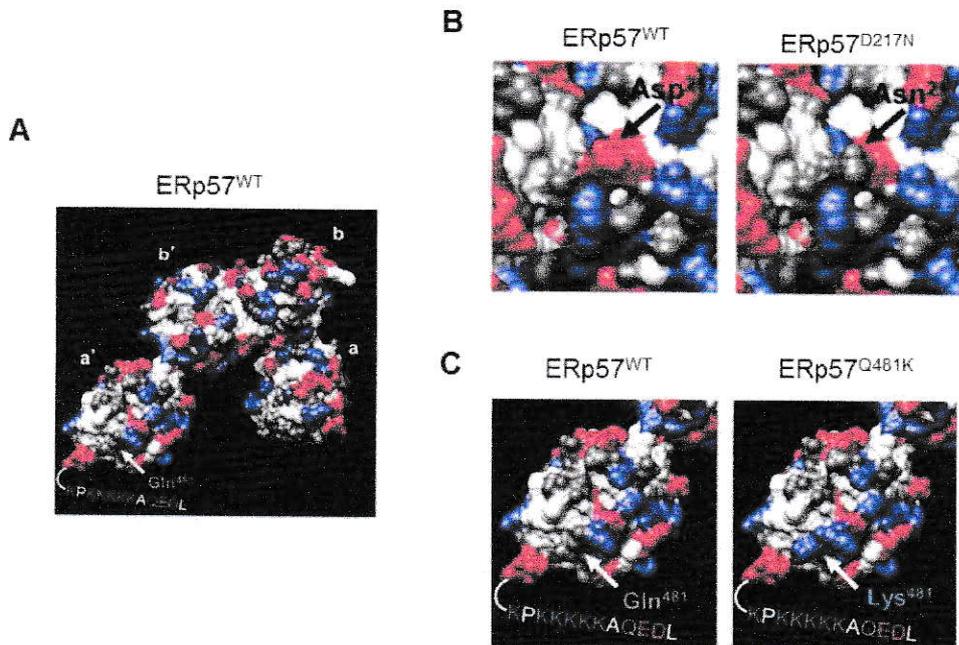
Estudios recientes, han mostrado que polimorfismos en regiones intrónicas de *PDIA1* son factores de riesgo para desarrollar ELA (Kwok y col., 2013; Yang y Guo, 2015). En estos estudios, se han encontrado polimorfismos de nucleótidos simple (PNS) en regiones intrónicas de *PDIA1* que actúan como genes que aumentan la susceptibilidad de padecer ELA. Trabajos recientes de nuestro laboratorio y en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Robert Brown de la Universidad de Massachusetts, han identificado mutaciones sin sentido de *PDIA1* y ERp57 en pacientes con ELAe y ELAf mediante secuenciación genómica directa (Gonzalez-Perez y col., 2015). En este trabajo se identificaron dos PNS de ERp57, D217N y Q481K (Gonzalez-Perez y col., 2015).

Las mutaciones de ERp57 relacionadas a la ELA generan alteraciones estructurales y bioquímicas en la proteína comparándolas con su estructura nativa (ERp57<sup>WT</sup>) (Figura 4A) (Gonzalez-Perez y col., 2015; Woehlbier y col., 2015). La mutación D217N provoca la pérdida de una carga negativa en un dominio cargado

positivamente que es esencial para la interacción con el dominio negativo de CNX o CRT (Figura 4B) (Gonzalez-Perez y col., 2015). La mutación Q481K genera el cambio de un aminoácido sin carga por uno positivo que influye en la unión con CNX (Figura 4C) (Gonzalez-Perez y col., 2015).

Ensayos de inmunoprecipitación usando células HEK293T muestran que ambas mutantes presentan más afinidad con CNX y CRT (Woehlbier y col., 2015). Cabe destacar que en el caso de ERp57 D217N, existe un sitio de N-glicosilación artificial generado por el PNS, fenómeno que se ha descrito en diferentes enfermedades, donde mutaciones en genes patogénicos generan proteínas glicosiladas anormales, las cuales son necesarias y suficientes para generar un impacto negativo en la célula (Vogt y col., 2007).

Acerca de ERp57, el KO completo genera mortalidad embrionaria al día 13,5 debido posiblemente a la modulación de la señalización de STAT3 (Coe y col., 2010). El rol de la deficiencia de ERp57 en el SNC fue analizado recientemente mediante la generación de un modelo KO condicional del gen usando el sistema de recombinación Cre-loxP (Woehlbier y col., 2015). La deficiencia de ERp57 en el SNC genera un retardo en el crecimiento, problemas motores (analizados por las pruebas motoras de Rota-Rod y Wire Hang test) y muerte prematura. Análisis del diafragma (músculo relevante en la pérdida de inervación observado en la ELA), mostró pérdida en la integridad de la UNM. La deficiencia de ERp57 genera UNM incompletas, de menor área y perímetro, con formas anormales y denervadas. Otro aspecto importante encontrado en el modelo corresponde a alteraciones en el perfil de proteínas sinápticas en la corteza cerebral, posiblemente debido a problemas en el plegamiento del subconjunto de glicoproteínas sustrato de ERp57. De esta forma, se estaría afectando



**Figura 4. Estructura de proteína de ERp57 con las mutaciones relacionadas a la ELA.**

(A) Estructura proteica de ERp57<sup>WT</sup> con sus dominios catalíticos a y a' y dominios no-catalíticos b y b'. (B) Imagen de superficie local que rodea el residuo Asp217 de ERp57<sup>WT</sup> y el residuo cambiado por Asn217 en la mutación. (C) Imagen de superficie local que rodea el residuo Gln481 de ERp57<sup>WT</sup> y el residuo cambiado por Lys217 en la mutación. Rojo: residuos positivos, azul: residuos negativos y gris: residuos polares sin cargas.

la integridad de la UNM. En cuanto a la fisiología del músculo, se encontró un cambio en el perfil de fibras musculares de contracción rápida y lenta, y una disminución en el diámetro de estas fibras. El fenotipo global de los ratones KO de ERp57 simulan etapas sintomáticas tempranas de la ELA y de otros desordenes neuromusculares (Woehlbier y col., 2015).

Con respecto a las mutaciones de ERp57 D217N y Q481K asociadas a la ELA y descritas anteriormente, se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* para analizar el mecanismo molecular relacionado a la patogénesis (Woehlbier y col., 2015). Se expresaron las formas mutantes en diferentes modelos celulares de motoneuronas y se demostró que las mutantes tienen efectos negativos en cuanto a la conectividad y extensión de neuritas (Woehlbier y col., 2015). Ensayos en pez cebra mostraron que las mutantes de ERp57 desarrollan morfologías axonales aberrantes, con motoneuronas de menor tamaño y ramificaciones anormales, además de problemas motores, lo que indica que las motoneuronas desarrollan una disrupción de la conectividad y función (Woehlbier y col., 2015). Sin embargo, el posible impacto de estas mutaciones en la ramificación neuronal en modelos de ratones se desconoce. Posiblemente ratones que expresen las mutaciones de ERp57 desarrollen fenotipos con efectos negativos en las sinapsis.

En base a estos antecedentes, se propone este proyecto de Seminario de Título que tiene como objetivo, estudiar el posible efecto de las mutaciones de ERp57 encontrados en pacientes con ELA a través del uso de animales transgénicos que sobreexpresen estas variantes. Potencialmente, la caracterización de estos nuevos ratones transgénicos podría establecer un nuevo modelo genético de la enfermedad, debido a la posible aparición de fenotipos similares a los observado en la ELA. Este

estudio constituye una valiosa herramienta para la investigación de mecanismos celulares y moleculares patogénicos de la ELA.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La sobreexpresión de formas mutantes de ERp57 asociadas a ELA en el sistema nervioso central activa mecanismos patológicos relevantes de la enfermedad, incluyendo alteraciones motoras y neuromusculares.

#### **5. OBJETIVOS.**

##### **5.1. Objetivo general**

Caracterización fenotípica e histológica de modelos murinos que sobreexpresan formas mutantes de ERp57 en el sistema nervioso central.

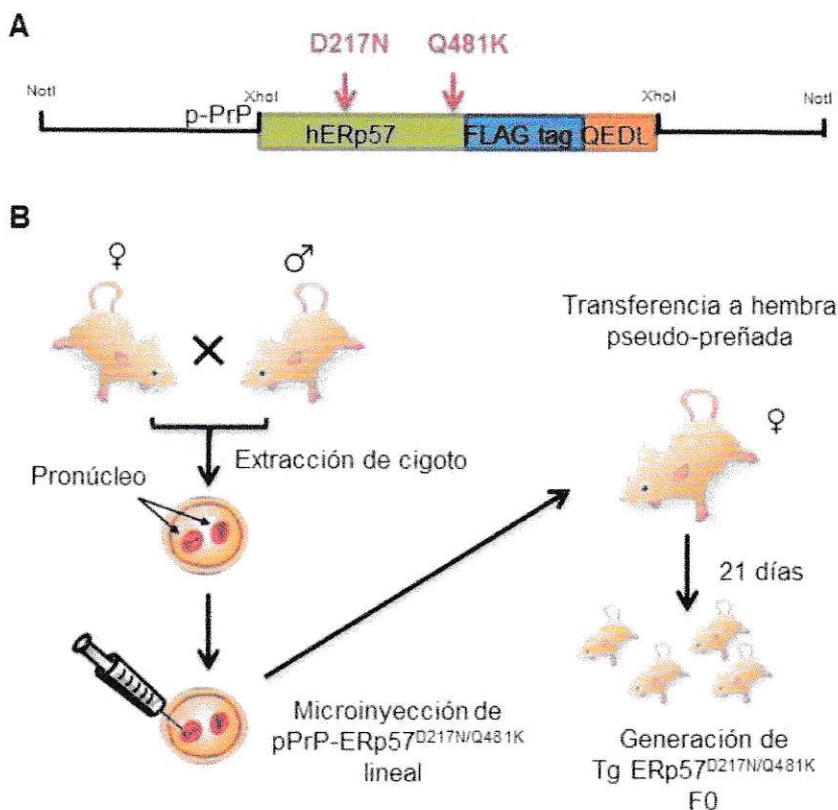
##### **5.2. Objetivos específicos.**

- Caracterizar diferentes líneas de ratones transgénicos que sobreexpresan la forma mutante de ERp57 D217N y Q481K en el sistema nervioso central y determinar si desarrollan síntomas tipo ELA con compromiso de la actividad motora.
- Analizar el estado de la innervación muscular mediante electromiografía, análisis de la unión neuromuscular y la fisiología de músculo esquelético.
- Determinar posibles alteraciones en la proteostasis a nivel de activación de la UPR.
- Cuantificar los niveles de proteínas sinápticas en ratones transgénicos para ERp57 mutantes

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. Generación de ratones transgénicos para ERp57 mutante en el sistema nervioso central y su genotipificación.

El Dr. David Brochelt del Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA proporcionó gentilmente el plasmidio de expresión MoPrP.XhoI (Borchelt y col., 1996). En nuestro laboratorio el gen de ERp57 humano (Gene ID: 2923) derivado del cDNA (del inglés complementary deoxyribonucleic acid) se introdujo en el plasmidio seguido por la secuencia codificante del FLAG-tag y la señal de retención del RE QEDL utilizando el sitio de restricción XhoI. Este plasmidio se utilizó para crear una línea de ratones transgénicos que sobreexpresan la forma nativa de ERp57 (ERp57<sup>WT</sup>) en el SNC (Castillo et al. 2015; Torres et al. 2015). Para realizar las mutaciones relacionadas a la ELA, se transfirió la secuencia de ERp57 humana a una sistema de clonamiento Zero Blunt (Thermo Scientific), donde se realizó la mutagénesis sitio-dirigida siguiendo las instrucciones del fabricante (Stratagene No. cat. 200517-5). Para la mutación D217N, se realizó el cambio del nucleótido guanina (G) en la posición 649 por un nucleótido adenina (A), donde se cambió el aminoácido ácido aspártico en la posición 217 por el aminoácido asparagina. Para la mutación Q481K, se realizó el cambio del nucleótido citosina (C) en la posición 1441 por un nucleótido A, donde se cambió el aminoácido glutamina en la posición 481 por el aminoácido lisina. Posteriormente, los dos constructos se reinsertaron en plasmidios de expresión MoPrP.XhoI mediante digestión con la enzima de restricción XhoI y se verificó el sentido de inserción de la secuencia. La Figura 5A muestra un esquema del plasmidio utilizado.



**Figura 5. Generación de líneas transgénicas que sobreexpresan ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup> en el SNC.** (A) Los plasmidio MoPrP.XhoI con las secuencias mutantes de ERp57 se generaron mediante la mutagenesis sitio-dirigida de la secuencia humana de ERp57. ERp57 quedó bajo el control del promotor prion (p-PrP) junto con la secuencia FLAG-tag y la secuencia de retención en el RE QEDL. (B) En el Centro de Estudios Científicos (CECs), Valdivia, se generaron las líneas de ratones transgénicos para ERp57<sup>D217N/Q481K</sup>. Para esto, se cruzaron ratones 50% C57BL/6- 50% CBA, a los cuales se les extrajeron cigotos y se realizaron microinyecciones del plasmidio MoPrP.XhoI con las secuencias mutantes de ERp57 linealizado por la digestión con NotI en el pronúcleo masculino. Los cigotos se transfirieron a hembras pseudo-preñadas y 21 días después nació la generación F0 de ratones Tg ERp57<sup>D217N/Q481K</sup>. Cada ratón se consideró como una línea independiente.

Los plasmidios de expresión resultantes contenían ERp57 con la mutación D217N o Q481K bajo el control del promotor de la proteína prion de ratón (PrP). Los constructos se enviaron al Dr. Bredford Kerr del Centro de Estudios Científicos (CECs), Valdivia, para la generación de ratones transgénicos para las formas mutantes de ERp57 (Figura 5B). El plasmidio se purificó, preparó y linealizó mediante la digestión con la enzima de restricción NotI para su microinyección por personal entrenado en un área designada del bioterio. Se realizó una inyección intraperitoneal a hembras 50% C57BL/6- 50% CBA con 50 U/mL de Gonadotropina coriónica equina y 0,1 mL de 50 U/mL de Gonadotropina coriónica humana para inducir la ovulación. Estas se cruzaron con machos 50% C57BL/6- 50% CBA. Los cigotos se extrajeron y se realizó microinyección del constructo en el pronúcleo masculino del cigoto. Luego se transfirieron aproximadamente 10 a 15 embriones por oviducto en una hembra pseudo-preñada (hembra previamente cruzada con un macho vasectomizado) de la cepa 50% C57BL/6- 50% CBA. Después de 21 días, nació la generación F0, con el mismo fondo genético. Los miembros de la generación F0 se denominaron Tg90-533, Tg90-550, Tg90-557 y Tg90-559 para la mutación ERp57 D217N y la línea transgénica Tg89-518 para la mutación ERp57 Q481K. Las cruces para la mantención de la colonia se realizaron siempre con ratones C57BL/6 para llevar a un fondo genético puro.

A los 21 días de vida, se destetaron los ratones y se genotipificaron mediante PCR usando los partidores *Erp57* 866 sentido 5'-AAT TCC TGG ATG CTG GGC ACA AAC - 3' y *Erp57* 1535 antisentido 5'-TCT GCT TGT CAT CGT CGT CCT TGT -3', los cuales amplifican un fragmento de DNA de 665 pb. Además, se utilizaron los partidores de *interleuquina-2 (Il-2)* sentido 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3' e *Il-2* antisentido 5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3' para la obtención de un

control interno de 324 pb. Para la extracción de DNA se recolectaron muestras a partir de trozos de cola de los ratones con un largo aproximado de 1,5 mm y se digirieron con 600  $\mu$ L de buffer de lisis (50 mM Tris pH 8,0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl y 1% SDS) y 6  $\mu$ L de proteinasa K a una concentración de 10 mg/mL por 16 h a 55°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13000 g por 10 min y el sobrenadante fue mezclado con 450  $\mu$ L de isopropanol al 100% para obtener un precipitado centrifugando nuevamente utilizando los mismos parámetros. El precipitado se lavó con etanol al 70% y finalmente se resuspendió en 200  $\mu$ L buffer TE (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 1 mM EDTA).

Para la reacción PCR, 1  $\mu$ L de extracto de DNA se incubó con 12,5  $\mu$ L de Go Taq Master Mix (Promega) y 1  $\mu$ M de cada partidor para un volumen final de 25  $\mu$ L. El programa de PCR tiene un protocolo tipo Touchdown que posee un ciclo de denaturación por 5 min a 94°C, 20 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 65°C (disminuyendo 0,5°C por ciclo), 50s a 72°C; 16 ciclos de 50s a 94°C, 30s a 55°C, 50s a 72°C y un ciclo final de elongación de 5 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2% con SYBR Safe a una concentración de 0,033  $\mu$ g/mL mediante electroforesis a 100 V.

Las líneas de ratones transgénicos se mantuvieron en los bioterios de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Santiago, Chile). Todos los experimentos y el cuidado de ratones siguieron el protocolo del Comité de Bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (CBA #0769 FMAUCH).



## **6.2. Monitoreo fenotípico de animales.**

### **6.2.1. Medición de peso corporal.**

Las mediciones de peso corporal de todos los ratones se realizaron una vez por semana con el objetivo de monitorear si la sobreexpresión de las mutantes de ERp57 provocaban diferencias en este parámetro. La colonia ERp57<sup>D217N</sup> se analizó a partir del día 117 hasta el día 220 de vida, mientras que la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> se analizó a partir del día 100 hasta el día 227 de vida.

### **6.2.2. Prueba motora de *Wire Hang test*.**

Los ratones se ubicaron de forma individual con sus patas delanteras sobre una barra horizontal con un largo de 39 cm sujeta por dos barras verticales 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 una vez por semana en triplicado a lo largo del tiempo de análisis de cada colonia. Cada video se analizó para asignarle un puntaje, y se promediaron las tres mediciones hechas por ratón. El criterio de puntuación utilizado fue: 0 cuando el ratón no pudo sostenerse en la barra por más de 10s, 1 cuando el ratón cayó después de los 10s pero antes de los 30s, 2 cuando el ratón pudo mantenerse solamente con las patas delanteras, 3 cuando utilizó 3 o 4 extremidades sin contar la cola, 4 cuando utilizó las cuatro patas y además la cola o alcanza a llegar a la intersección de la barra horizontal con la vertical y 5 cuando escapó activamente de la barra horizontal y logró bajar por la barra vertical en un tiempo menor a 30s.

### **6.3. Análisis bioquímico de muestras de corteza, cerebelo, médula espinal y músculo esquelético.**

#### **6.3.1. Extracción de proteínas.**

Los tejidos de corteza, cerebelo, médula espinal y músculo esquelético se homogenizaron en 400  $\mu$ L de TEN (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA y 100 mM NaCl) frío suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). Posteriormente, 250  $\mu$ L del homogenizado se llevó a 250  $\mu$ L de TEN con 1% de Nonidet P-40 (NP40), quedando a una concentración final de 0,5% de NP40. Las muestras se sonicaron 1 vez por 15 s a mínima potencia y se cuantificó mediante el ensayo BCA Protein Assay kit (Pierce) para determinar la concentración total de proteínas.

Las muestras para Western blot se prepararon con una concentración final de 2  $\mu$ g/ $\mu$ L de proteínas totales, se incubaron DTT a una concentración final de 100 mM por 10 min a temperatura ambiente, y luego se mezclaron con buffer de carga NuPAGE LDS 4X (Thermo Scientific). Finalmente, se calentaron las muestras por 5 min a 95°C y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

#### **6.3.2. SDS-PAGE y Western blot.**

Para la electroforesis de las muestras de proteínas se utilizaron geles denaturantes. El gel concentrador se preparó con 60 mM de Tris-HCl pH 6,8, 4% acrilamida-bis-acrilamida, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amonio y 0,06% TEMED. Los geles separadores se prepararon con 380mM de Tris-HCl pH 8,8, 8%, 10% o 12% acrilamida-bis-acrilamida (dependiendo de la proteína de interés), 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amonio y 0,06% TEMED. Se cargó un total de 40  $\mu$ g de proteína por

muestra. Una vez que se cargó las muestras en los geles, se inició la electroforesis en solución de 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 entró al separador. La corrida se detuvo cuando el frente azul de bromofenol dejó el gel. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF de 9x7 cm en solución de buffer de transferencia (25 mM Tris, 250 mM glicina y 20% de metanol) a un voltaje constante de 100 V por 2 h en hielo. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en PBS por 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en una solución de leche al 5% en PBS por 16 h a 4°C: anti-ERp57 H-220 (1:3000, SC-28823, Santa Cruz), anti-BiP (1:3000, AB21685, Abcam), anti- $\beta$ -Actin (1:40000, 8691001, MP Biomedical), anti- $\alpha$ -Tubulin (1:3000, 32-2500, Life Technologies), anti-HSP90 (1:3000, SC-7947, Santa Cruz), anti-ERp72 (1:3000, SPS-720, Stressgen), anti-NMDAR2a (1:3000, PRB-512P, Covance), anti-PrP 6D11 (1:2000, SIG39810-100, Covance), anti-SV2 (1:500, AB-2315387, DSHB), anti-Sinaptofisina (1:5000, MAB368, Millipore), anti-PSD95 (1:3000, 04-1066, Millipore). Las membranas se lavaron 3 veces por 5 min con PBS-0,1% Tween y luego se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP (1:3000, Invitrogen), anti-mouse-HRP (1:3000, Invitrogen) o anti-sheep-HRP (1:3000, Sigma) según correspondiera, en solución de leche al 5% en PBS por 2 h a temperatura ambiente. Nuevamente las membranas se lavaron con PBS-0,1% Tween 3 veces por 5 min. Finalmente, se revelaron las membranas utilizando el kit ECL Substrate Western Blotting (Pierce) en el detector de quimioluminiscencia ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad). Se cuantificó los niveles de proteínas obtenidos, mediante el análisis de intensidades de las bandas usando el programa computacional Image Lab (Bio-Rad) y los valores se normalizaron a la intensidad obtenida con HSP90,  $\beta$ -actina o  $\alpha$ -Tubulina

como un control de carga y como referencia biológica se compararon con las muestras de animales no-transgénicos.

### 6.3.3. Extracción de RNA y generación de cDNA.

Los tejidos de corteza, cerebelo y médula espinal se homogenizaron en 400  $\mu$ L de TEN (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA y 100 mM NaCl) frío suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). Posteriormente, 150  $\mu$ L del homogenizado se llevó a 200  $\mu$ L de TRIzol LS (Invitrogen), se homogenizó nuevamente y agregó 550  $\mu$ L de TRIzol LS y 100  $\mu$ L de TEN. La extracción de RNA se realizó bajo el protocolo sugerido por el fabricante. El cDNA se sintetizó a partir de 2  $\mu$ g de RNA total con el kit iScript cDNA Syntesis (BioRad), Buffer RT 10X, dNTPs 1 mM cada uno, partidores *random* p(dN)6 10X (Roche) y 1  $\mu$ L de transcriptasa reversa 50 U/ $\mu$ L (Thermo Scientific) en un volumen final de 20  $\mu$ L. El programa para la reacción RT fue: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min y 85°C por 5 min.

### 6.3.4. PCR cuantitativo (qPCR).

Se utilizó el sistema "*Light Cycler*" (Stratagene) empleando el kit 5x HOT FIREpol con la sonda fluorescente EvaGreen (Solis Biodyne) con un volumen de reacción por muestra de 20  $\mu$ L. Se utilizaron los pares de partidores: *Xbp1s* sentido 5'-GAC TAG CAG ACT CTG GGG AAG -3' y *Xbp1s* antisentido 5'-TGC TGA GTC GGC AGC AGG TG-3', *Chop* sentido 5'-TGG AGA GCG AGG GCT TTG-3' y *Chop* antisentido 5'-CCG CTC GTT CTC CTG CTC-3', *Bip* sentido 5'-TCA TCG GAC GCA CTT GGA A-3' y *Bip* antisentido 5'-CAA CCA CCT TGA ATG GCA AGA-3' y *Atf3* sentido 5'-GAG GAT TTT GCT AAC CTG ACA CC-3' y *Atf3* antisentido 5'-TTG ACG GTA ACT GAC TCC AGC-3', *Sv2* sentido 5'-GGC TTT CGA GAC CGA GCA G-3' y *Sv2* antisentido 5'-GAC CTT CGG GAA TAC TCA TCC T-3', *Psd95* sentido 5'-GGC AGG TTG CAG ATC GGA G-3'

y *Psd95* antisentido 5'-CAC CTT TAG GTA CAC AAC GTC AT-3', *Nmdar2a* sentido 5'-ACG TGA CAG AAC GCG AAC T-3' y *Nmdar2a* antisentido 5'-TCA GTG CGG TTC ATC AAT AAC G-3' y *Sinaptofisina* sentido 5'-CAG TTC CGG GTG GTC AAG G-3' y *Sinaptofisina* antisentido 5'-ACT CTC CGT CTT GTT GGC AC-3', los cuales reconocen las secuencias de endógenas de ratón.

Para analizar la expresión de ERp57 mutante, se diseñaron partidores mediante la herramienta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). El par de partidores reconoce secuencias presentes en ERp57 de ratón endógena (rERp57) y ERp57 humana (hERp57), por lo que se utilizó para ver los niveles de sobreexpresión de la forma humana en los ratones transgénicos sobre la endógena. Las secuencias de los partidores son *r/hERp57* sentido 5'-GTC ATA GCC AAG ATG GAT GCC-3' y *r/hERp57* antisentido 5'-TTA ATT CAC GGC CAC CTT CAT A-3'. El programa de qPCR tiene un protocolo que posee con un ciclo de 10 min a 95°C, 40 ciclos de 10 s a 95°C, 15 s a 60°C, 20 s a 72°C y un ciclo final de 1 min a 95°C, 30 s a 55°C y 30 s a 95°C.

#### **6.4. Electromiografía (EMG).**

Para realizar la medición de EMG, se utilizó el aparato de anestesia RC<sup>2</sup> Rodent Circuit Controller (VetEquip) el cual libera un flujo constante de Isoflurano mezclado con O<sub>2</sub>. Para esto, primero se introdujo al ratón en una cámara de acrílico donde se suministró anestesia de forma gaseosa con una presión constante de 220 kPa para inducir el sueño por 5 min. Posteriormente, se posicionó al ratón en una superficie termorregulada y se conectó un adaptador que dispone anestesia constantemente al ratón para realizarle las mediciones. Las mediciones de EMG se realizaron usando una maquina portátil de EMG modelo TD20 MKI EMG/ED (Teca) y electrodos de aguja

subdermales insertos en diferentes áreas del ratón. El electrodo de tierra se puso de forma subdermal en la extremidad trasera izquierda, mientras que los electrodos de cátodo y ánodo se insertaron de forma subdermal en la extremidad posterior derecha. El electrodo de registro se insertó en el músculo gastrocnemius derecho, donde se observó la actividad eléctrica espontánea del músculo y se registró utilizando papel termosensible de 63mm de ancho. El sistema de puntuación consistió en el siguiente: 0 músculo normal, sin actividad espontánea, + cuando se observaron pequeñas fibrilaciones espontáneas y aisladas, ++ cuando se encontraron fibrilaciones con asociación y +++ cuando existió fibrilaciones profusas. Una vez realizada la medición, el ratón se separó del adaptador de anestesia y recuperó conciencia luego de 1 min. Se analizaron ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y como control positivo se utilizó un ratón sintomático de la colonia SOD1<sup>G93A</sup>.

## **6.5. Análisis de UNM.**

### **6.5.1. Histología de diafragma.**

Músculos completos de diafragma de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> de 220 días y ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> de 400 días de vida se extrajeron y fueron fijados en 4% PFA por una hora a 4°C. Posteriormente, en agitación, las muestras fueron permeabilizadas durante 2 h en 0,5% Tritón X-100 y tratados con 0,1 M glicina a pH 7,4 por 15 min. Luego, se realizaron 2 lavados de 10 min en 0,5% Tritón X-100 y los diafragmas fueron incubados en solución de 10mg/mL NaBH<sub>4</sub> por 5 min. Los diafragmas fueron bloqueados en un buffer con en 0,5% Tritón X-100, 2% BSA y 0,5% suero de caballo por 12-16 h. Los diafragmas se incubaron con el anticuerpo anti-neurofilamento (1:1000, ab93340, Abcam) por 12-16 h, para luego ser lavado durante 2 h en agitación. Después los diafragmas se incubaron con el anticuerpo  $\alpha$ -

bungarotoxina ( $\alpha$ -BTX) conjugado con Alexa-488 (1:1000, B13422, Invitrogen) junto al anticuerpo anti-conejo conjugado con Cy3 hecho en burro (1:300, Jackson Immuno Research) durante 16-18 h. Posteriormente los músculos de diafragma se lavaron por 2 h en agitación y montados entre dos cubreobjetos con medio para fluorescencia (Dako).

### **6.5.2. Análisis de morfología de UNM.**

Para la cuantificación del ancho de banda de la placa (endplate), se capturaron imágenes fluorescentes de hemi-diafragmas teñidos con  $\alpha$ -BTX-Alexa-488 y montados entre dos cubreobjetos con medio para fluorescencia (Dako) con un microscopio fluorescente Nikon Eclipse 80i y se analizó la distribución de clúster de receptores de acetilcolina (AChR). Se midió el ancho y número total de banda de la placa cada 134  $\mu\text{m}$  a lo largo de la extensión dorso-ventral de los diafragmas. Se realizaron 60-80 mediciones por diafragma de un total de 4 ratones por genotipo y se analizaron mediante ImageJ.

Con el fin de analizar cambios morfológicos del aparato post-sináptico y pre-sináptico y cuantificar el volumen y superficie, se evaluó la morfología de los clúster de los AChR (post-sináptico) y de los neurofilamentos (pre-sináptico). Para ello los aparatos post-sinápticos se tiñeron con  $\alpha$ -BTX-Alexa488 y los aparatos pre-sinápticos con anti-neurofilamento-Alexa-568 para obtener imágenes de microscopía confocal (Zeiss LSM 700) en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA), Facultad Bio-Bio, Universidad de Concepción. Volúmenes y superficie se cuantificaron utilizando el plugin 3D object counter (Bolte y Cordelières, 2006) ajustando el umbral de fluorescencia y excluyendo los objetos seleccionados en los bordes y en planos profundos en eje Z. Se analizó la presencia de varicosidades (hinchazón) axonal en los

aparatos pre-sinápticos. Se definió que presenta hinchazón axonal cuando se encontró un engrosamiento entre el terminal y 50  $\mu\text{m}$  hacia el axón (Valdez y col., 2010). Se analizaron aproximadamente 50-70 aparatos post-sinápticos de la región ventral de diafragma por ratón. Se reconstruyó de forma 3D usando ImageJ la UNM y se estableció la forma de la UNM: pretzel o maduro (altamente complejos y ramificados que poseen parte de su interior con una baja densidad de agregados del AChR), la forma fragmentada (formados por la disgregación en segmentos de agregados del AChR en un número mayor a 4 fragmentos), la forma C / O (estructura con una o más perforaciones grandes que tienen sólo una abertura en su borde) y forma desmantelada (estructura que se ve de menor complejidad y tamaño, además de una morfología irregular respecto de un pretzel). Alrededor de 50-70 aparatos post-sinápticos se cuantificaron por ratón. El número de fragmentos por pretzel se determinó considerando la cantidad de disgregaciones de cada unidad post-sináptica.

#### **6.6. Análisis de músculo esquelético.**

Músculos *Tibialis anterior* (TA) de ratones de diferentes genotipos se disertaron y se montaron en OCT (Sakura Finetek) y rápidamente se congelaron en isopentano previamente enfriado a  $-80^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido. Se realizó cortes transversales de 20  $\mu\text{m}$  con un criostato, los cuales se fijaron en 4% PFA por 20 min a temperatura ambiente y subsiguientemente se procesaron para estudiar la fisiología muscular.

Para estudiar la morfología de fibras musculares, se incubaron los cortes con concentraciones decrecientes de etanol para su hidratación, se lavaron en agua destilada y se incubaron con hematoxilina por 2 min. Después las muestras se incubaron con concentraciones crecientes de etanol y se tiñeron con cromotrope por 2

min. Finalmente, las muestras se lavaron en xileno I-IV por 3 min cada una. Las muestras se montaron en medio Entellan (Merck) para ser analizadas.

Para estudiar la presencia de fibrosis, los cortes se incubaron con concentraciones decrecientes de etanol para su hidratación y depósitos de colágeno se tiñeron con solución acuosa de 1% Pardo Bismark por 12 min en cortes previamente hidratados. Las muestras se transfirieron a solución de 0,5% verde metil por 2 min y después se deshidrataron en concentraciones de etanol crecientes, se lavaron 3 veces en xileno I-IV por 3 min cada una y posteriormente se montaron en medio Entellan (Merck) para ser analizadas.

Para estudiar la degeneración muscular, se analizó la presencia de centronucleación, uno de los cambios patológicos principales en músculos con distrofia (Totsuka y col., 1998), mediante la tinción con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugado con Alexa-488 (Invitrogen) de secciones fijadas con metanol frío por 20 min y después con 0,4  $\mu\text{M}$  DAPI por 5 min.

Para teñir las fibras de contracción lenta, secciones se incubaron con una solución para detectar actividad de NADH-TR (Tris-HCl, pH 7,4, NADH reducido y nitroazul de tetrazolio) (Sigma) por 45 min. Luego se lavaron e incubaron con concentraciones decrecientes de acetona. Las muestras se montaron con medio acuoso (Vector Labs Burlingame). Imágenes de campo claro de baja magnificación de la tinción de cortes con NADH se adquirieron en regiones anatómicas similares y las fibras se clasificaron como fibras de contracción lenta (azul oscuro), intermedias (azul) y de contracción rápida (azul claro). Se realizó la identificación y medición del diámetro de más de 100

fibras de cada tipo por ratón mediante la utilización del software ImageJ, y se expresaron como porcentajes del total de fibras por animal.

#### **6.7. Análisis estadístico.**

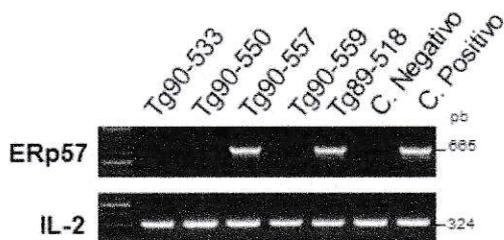
Los datos se presentaron como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio. Los análisis estadísticos se realizaron usando la prueba *t* de Student, la prueba *Mantel Cox* o ANOVA de una o dos vías, seguido por la prueba de *Bonferroni post hoc* para comparaciones múltiples. Un *p* value  $\leq 0,05$  se consideró como estadísticamente significativo. Todos los análisis s usando el programa GraphPad Prism.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1. Generación de líneas de ratones transgénicos que sobreexpresan las formas mutantes de ERp57 D217N y Q481K en el SNC.

Con el objetivo de generar ratones transgénicos que sobreexpresen las formas mutantes de ERp57 relacionadas a la ELA, se utilizaron plasmidios que contienen las formas de ERp57<sup>WT</sup>, mutantes ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup> humanas fusionadas al FLAG-tag bajo el control del promotor PrP. Los plasmidios se confeccionaron previamente en el laboratorio utilizando un vector descrito anteriormente (Borchelt y col., 1996) (Figura 5A, Materiales y Métodos).

La línea que sobreexpresa ERp57<sup>WT</sup> (Castillo y col., 2015) se utilizó para comparar los resultados con las líneas de ERp57 mutante para distinguir entre efectos producidos por la sobreexpresión de ERp57<sup>WT</sup> o por sus mutaciones. Se obtuvo 4 posibles líneas transgénicas para la mutación ERp57<sup>D217N</sup> designados Tg90-533, Tg90-550, Tg90-557 y Tg90-559 y una para ERp57<sup>Q481K</sup> sólo se obtuvo una línea denominada Tg89-518. Para confirmar su genotipo, se realizó PCR a partir de DNA genómico. Se desarrollaron partidores y un protocolo de PCR apropiado para la genotipificación de la colonia hERp57<sup>WT</sup> y hERp57 mutante. Un producto de 665 pb se obtuvo en los casos positivos de ratones transgénicos, mientras que ninguna banda se obtuvo en el caso de ratones no-transgénicos (Figura 6). Cabe destacar que los controles utilizados corresponden a DNA purificado de ratones de la colonia que sobreexpresa ERp57 nativa en el SNC, donde el control positivo (C. positivo) corresponde a ratones transgénicos ERp57<sup>WT</sup> y el control negativo (C. negativo) corresponde a hermanos de camada no-transgénicos. De los resultados obtenidos, se pudo apreciar que las líneas Tg90-533, Tg90-550, Tg90-559 no generan productos de



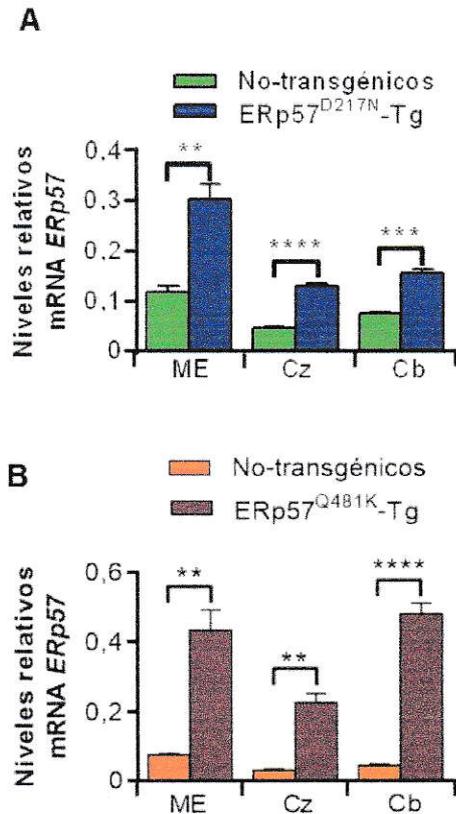
**Figura 6. Confirmación de líneas transgénicas que sobreexpresan ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup> en el SNC.** Diferentes líneas de ratones F0 (fundadores) se generaron en el CECs, Valdivia y se genotipificaron a partir de DNA genómico mediante PCR. Los partidores *Erp57* 833 sentido y *Erp57* 1535 antisentido se usaron para obtener un producto de 665 pb en el caso de los ratones transgénicos (panel superior), mientras que los partidores *Il-2* sentido y antisentido se utilizaron para amplificar una secuencia de 324 pb que se utilizó como control interno (panel inferior). Los controles utilizados corresponden a DNA purificado de ratones de la colonia que sobreexpresa ERp57<sup>WT</sup> en el SNC, donde el control positivo (C. positivo) corresponde a ratones transgénicos ERp57 y el control negativo (C. negativo) corresponde a hermanos de camada no-transgénicos.

amplificación, mientras que si se confirmó transgénicos para la línea Tg90-557 y Tg89-518. De esta forma, se desarrolló la caracterización de una línea de ratones para la mutación ERp57<sup>D217N</sup> (Tg90-557) y una para la mutación ERp57<sup>Q482K</sup> (Tg89-518). Estas líneas se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, realizando cruces con ratones de fondo genético C57BL/6 para llevar a un fondo genético puro.

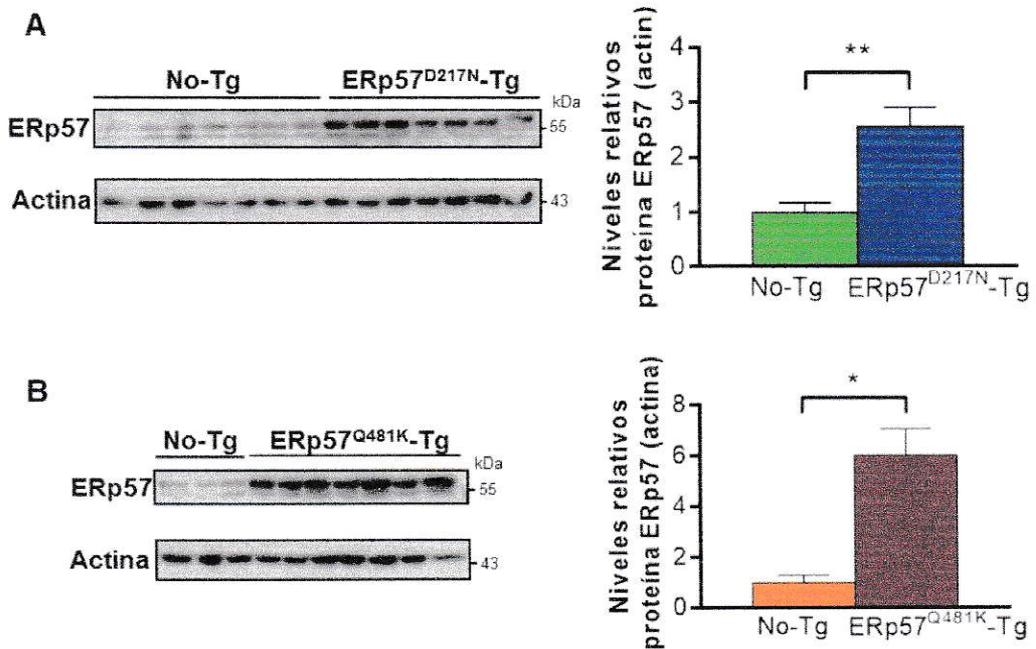
Para confirmar la sobreexpresión de las formas mutantes de ERp57 en el SNC de ambas líneas, se realizó un análisis de qPCR y de Western blot a partir de diferentes tejidos del SNC. Se generaron extractos de RNA de médula espinal, corteza y cerebelo, con los cuales se prepararon cDNA para ser analizados mediante qPCR (Figura 7). Los niveles de mRNA de *Erp57* se cuantificaron relativos a los niveles de mRNA de *Actina* y normalizados con respecto a los hermanos de camada no transgénicos.

Se confirmó la presencia del mRNA de ERp57 sobreexpresado en ambas líneas y en los tres tejidos, alcanzando niveles de sobreexpresión de 2,6 veces en médula espinal, 2,8 veces en corteza y 2 veces en cerebelo para ratones ERp57<sup>D217N</sup> transgénicos (ERp57<sup>D217N</sup>-Tg). En el caso de ratones ERp57<sup>Q481K</sup> transgénicos (ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg), se alcanzaron niveles de sobreexpresión de 5,7 veces en médula espinal, 7,1 veces en corteza y 10,1 veces en cerebelo. Así, se confirmó la expresión del mRNA del transgen en el SNC.

Para confirmar la traducción funcional y la presencia de proteínas de hERp57 en ambas líneas de ratones, se realizaron extractos de proteínas de médula espinal, con los cuales se realizaron análisis de Western blot (Figura 8A). Se detectó las proteínas utilizando un anticuerpo anti-ERp57, el cual reconoce ERp57 de ratón y la forma



**Figura 7. Niveles de mRNA de ERp57 en líneas transgénicas que sobreexpresan ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup> en el SNC.** Los niveles de sobreexpresión de mRNA de *ERp57* de las colonias ERp57<sup>D217N</sup> (A) y ERp57<sup>Q481K</sup> (B) se analizaron en diferentes tejidos del SNC mediante qPCR. La cuantificación se realizó con respecto a los niveles de mRNA de *actina*. Los tejidos analizados corresponden a médula espinal (ME), corteza (Cz) y cerebelo (Cb). Se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de ( $n = 3$ ) para ERp57 no-transgénicos y ( $n = 4$ ) para mutantes de ERp57 transgénicos. ( $p$  value: \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ; comparado con ratones no-transgénicos, prueba  $t$  de Student).



**Figura 8. Niveles de proteína ERp57 en líneas transgénicas que sobreexpresan ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup> en el SNC.** Los niveles de proteína ERp57 de las colonias ERp57<sup>D217N</sup> (**A**) y ERp57<sup>Q481K</sup> (**B**) se analizaron en médula espinal mediante análisis de Western blot utilizando el anticuerpo anti-ERp57 (panel izquierdo). La cuantificación se realizó con respecto al control de carga actina (panel derecho). Se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de (**A**) ( $n = 7$ ) para ERp57 no-transgénicos y ( $n = 7$ ) para ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y (**B**) ( $n = 3$ ) para ERp57 no-transgénicos y ( $n = 7$ ) ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. ( $p$  value: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; comparado con ratones no-transgénicos (No-Tg), prueba  $t$  de Student).

humana y se cuantificó normalizando con respecto a los valores del control de carga. Los resultados se expresaron como porcentajes relativos a los ratones no-transgénicos. De esta forma, se determinó que la sobreexpresión de proteína ERp57<sup>D217N</sup> es de 2,5 veces y de ERp57<sup>Q481K</sup> es de 6 veces en médula espinal (Figura 8B). En conjunto, estos resultados confirmaron la generación de modelos murinos que sobreexpresan formas mutantes de ERp57 en el SNC.

Después de obtener un número suficiente de camadas de ambas colonias, se calcularon las razones de nacimiento y la distribución genotípica (Tabla 1 y 2). En la colonia de ratones ERp57<sup>D217N</sup>, se encontraron proporciones mendelianas normales en los nacimientos. En cuanto a la colonia de ratones ERp57<sup>Q481K</sup>, se encontró que nacieron alrededor de 10% más ratones machos ERp57<sup>Q481K</sup> que sus proporciones mendelianas esperadas. Según la razón de transgénicos/no-transgénicos por sexo existe un 48% más machos transgénicos que machos no-transgénicos y para la razón macho-transgénicos/hembras-transgénicas por genotipo, existió un 57% más machos transgénicos que hembras transgénicas. Esto muestra que existió una mayor proporción general de machos transgénicos para ERp57<sup>Q481K</sup>.

## **7.2. Caracterización del fenotipo patológico y motor de los modelos murinos que sobreexpresan formas mutantes de ERp57.**

Para analizar el posible fenotipo patológico debido a la sobreexpresión de formas mutantes de ERp57 asociadas a la ELA, los modelos se caracterizaron mediante la observación visual, la medición del peso corporal y mediante la prueba motora de Wire hang test, comparándolos con sus hermanos de camada no-transgénicos.

**Tabla 1. Razón de nacimientos de la colonia ERp57<sup>D217N</sup>.** Se calculó la distribución genotípica en porcentajes de las crías obtenidas de las cruzas, llevadas a cabo para amplificar la colonia en estudio.

Colonia ERp57 <sup>D217N</sup>	Hembras ERp57 <sup>D217N</sup> no-transgénicas	Hembras ERp57 <sup>D217N</sup> transgénicas	Machos ERp57 <sup>D217N</sup> no-transgénicos	Machos ERp57 <sup>D217N</sup> transgénicos	Total
Número Observado	67	69	83	67	286
Porcentaje esperado	25%	25%	25%	25%	100%
Porcentaje observado	23,4%	23,4%	29%	24,1%	100%

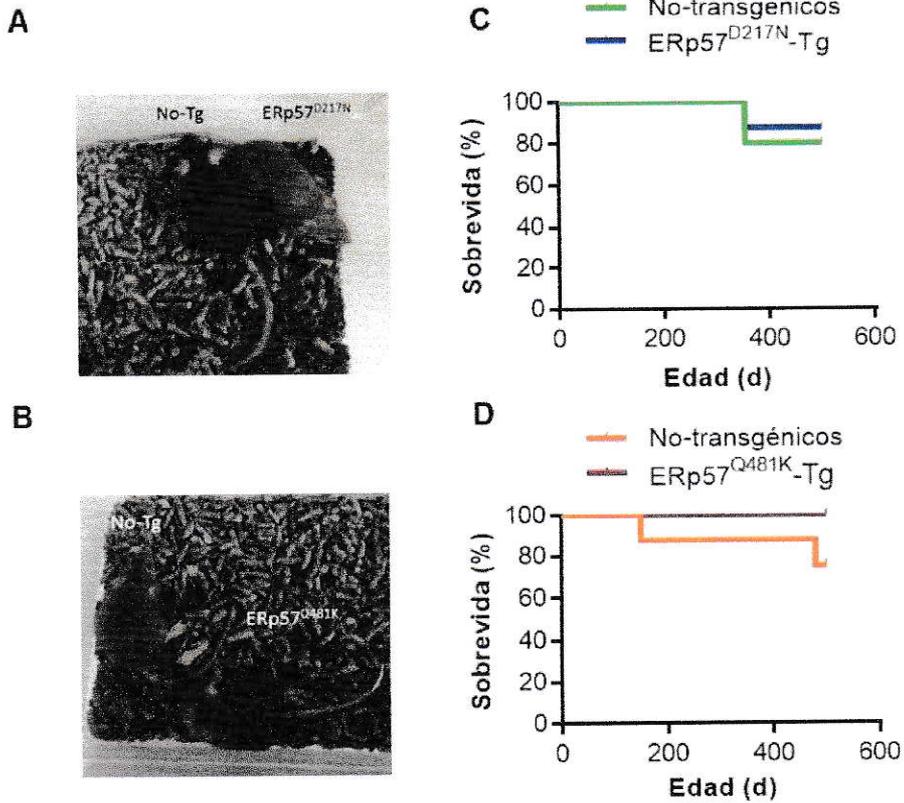
**Tabla 2. Razón de nacimientos de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>.** Se calculó la distribución genotípica en porcentajes de las crías obtenidas de las cruzas, llevadas a cabo para amplificar la colonia en estudio.

Colonia ERp57 <sup>Q481K</sup>	Hembras ERp57 <sup>Q481K</sup> no-transgénicas	Hembras ERp57 <sup>Q481K</sup> transgénicas	Machos ERp57 <sup>Q481K</sup> no-transgénicos	Machos ERp57 <sup>Q481K</sup> transgénicos	Total
Número Observado	46	50	47	74	217
Porcentaje esperado	25%	25%	25%	25%	100%
Porcentaje observado	21,2%	23%	21,7%	34,1%	100%

En edades jóvenes, inmediatamente posterior al destete que se realizó a los 21 días de vida, los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg mostraron una apariencia fenotípica completamente normal, sin diferenciarse de sus hermanos de camada no-transgénicos (Figura 9A y 9C). Un grupo experimental de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> de (n = 5) no-transgénico, y (n = 8) ERp57<sup>D217N</sup>-Tg (Figura 9B), y de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> de (n = 8) no-transgénicos, y (n = 14) ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg (Figura 9D), se dejó envejecer hasta los 15-18 meses de vida con el propósito de realizar una evaluación de aparición de posibles síntomas tipo ELA a lo largo de su vida. Los fenotipos tipo ELA buscados corresponden a curvatura de la columna, caída de extremidades posteriores, dificultad en el desplazamiento y parálisis, como se describen en diferentes modelos murinos de la ELA que sobreexpresan formas mutantes de SOD1 (Gurney y col., 1994; Ripps y col., 1995).

Estos fenotipos no se desarrollaron durante el periodo de observación de estos animales, sugiriendo que los niveles de sobreexpresión de las formas mutantes de ERp57 no alcanzan el umbral para inducir este tipo de deterioro, o simplemente las mutantes no generan discapacidad en el modelo murino. Para la colonia ERp57<sup>D217N</sup>, se presencié la muerte de un macho no-transgénico y un macho ERp57<sup>D217N</sup>-Tg a los 355 días de vida, mientras que para colonia ERp57<sup>Q481K</sup>, se presencié la muerte de un macho no-transgénico a los 150 días de vida y una hembra no-transgénica a los 490 días de vida. Estas muertes ocurridas durante el periodo de observación fueron de forma espontánea, probablemente debido al proceso normal de envejecimiento de estos animales.

La medición del peso corporal de ambas líneas transgénicas se realizó una vez por semana. Este registro comenzó a los 117 días de vida para la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y

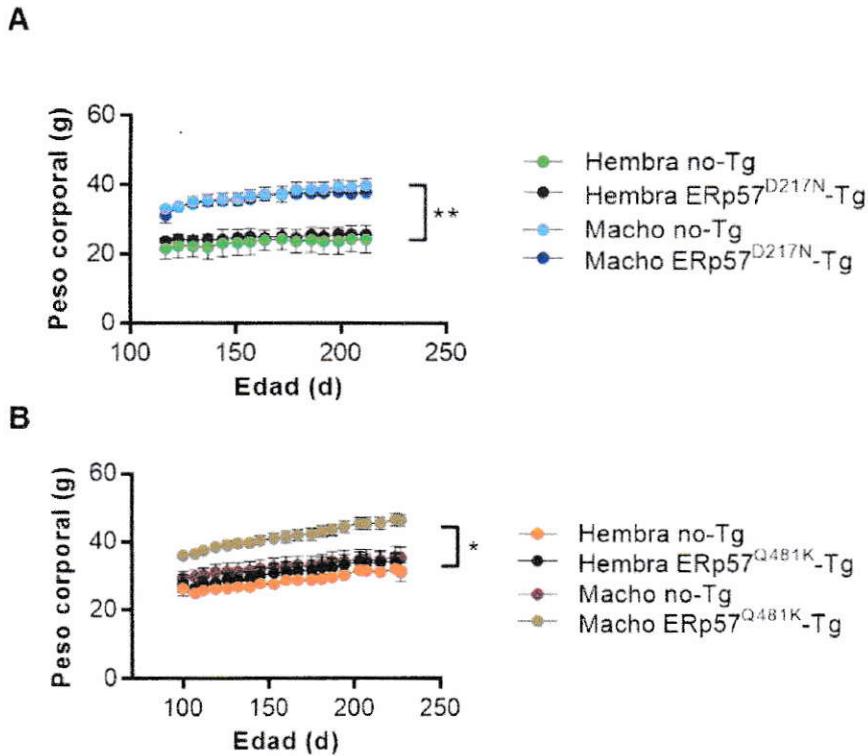


**Figura 9. Fenotipo y sobrevida de las colonias que sobreexpresan ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup>.** (A y B) Fotografías representativas de la colonia de ERp57<sup>D217N</sup> con ratones no-transgénicos (No-Tg) y transgénicos (ERp57<sup>D217N</sup>-Tg) y de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> con ratones no-transgénicos (No-Tg) y transgénicos (ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg). (C y D) Curva de sobrevida para ratones de la colonia de ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup>. Los grupos experimentales de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> poseen un (n = 5) para no-transgénicos y (n = 8) para ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg. Para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> poseen (n = 8) para no-transgénicos y (n = 14) para ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. (p value: C = 0,7261 y D = 0,0623, prueba *Mantel Cox*).

concluyó a los 220 días de vida. Para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>, los registros comenzaron a los 100 días de vidas hasta los 227 días de vida (Figura 10).

En la curva de peso corporal, no se observó una pérdida de peso corporal significativo en ninguna de las dos líneas. Más bien, existió una progresiva ganancia de peso durante todas las mediciones, que es también observada en animales silvestres envejecidos. En la curva de la colonia ERp57<sup>D217N</sup>, ambos grupos de machos (no-transgénicos y transgénicos) pesaron en promedio 50% más que las hembras (Figura 10A), mientras que la curva de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>, los machos no-transgénicos pesaron en promedio 23% menos que los machos transgénicos (Figura 10B). La variable de peso corporal es importante de analizar, ya que la pérdida de peso es un fenotipo característico en modelos murinos de ELA (Gurney y col., 1994; Ripps y col., 1995).

Se realizó la prueba motora de "*Wire hang test*" para analizar el desempeño motor y de coordinación de ambas líneas de ratones transgénicos. Los puntajes obtenidos a lo largo de las mediciones se muestran en la Figura 11 y el promedio de los puntajes obtenidos los últimos meses de registro de la prueba motora se muestran en la Figura 12. En la progresión de registros, para los grupos experimentales de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> (Figura 11B), los machos ERp57<sup>D217N</sup>-Tg mostraron los puntajes más bajos con un promedio 1,5, comparado con los otros tres grupos experimentales, los cuales tuvieron promedios de 3 para machos no-transgénicos, 4 para hembras ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y 5 para hembras no-transgénicas. Estos puntajes se mantuvieron desde el principio de las mediciones y a lo largo de los registros, lo que muestro que existen problemas

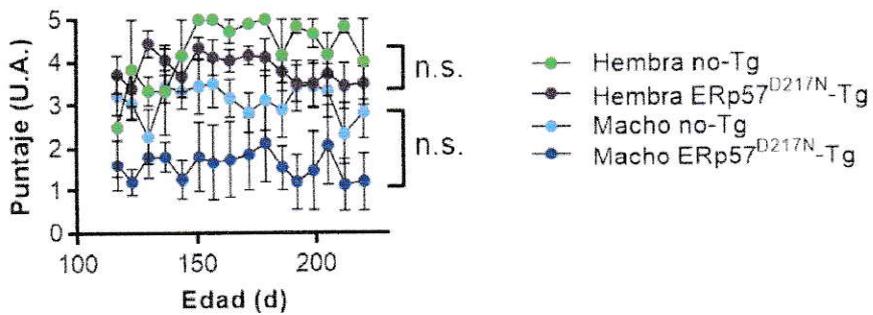


**Figura 10. Curva de progreso de peso corporal de los ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup>.** Las mediciones de peso corporal de las colonias ERp57<sup>D217N</sup> (**A**) y ERp57<sup>Q481K</sup> (**B**) se registraron semanalmente. (**A**) Las mediciones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> comprenden entre los 117 y 220 días de vida. (**B**) Las mediciones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> comprenden entre los 100 y 227 días de vida. Se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio para cada medición. Los grupos experimentales de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> poseen (n = 2) para hembras no-transgénicas, (n = 6) para hembras ERp57<sup>D217N</sup>-Tg, (n = 6) para machos no-transgénicos y (n = 6) para machos ERp57<sup>D217N</sup>-Tg. Los grupos experimentales para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> poseen (n = 3) para hembras no-transgénicas, (n = 2) para hembras ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, (n = 4) para machos no-transgénicos y (n = 7) para machos ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. (*p* value: \*, *p*<0,05; \*\*, *p*<0,01; ANOVA de dos vías y *Bonferroni's post hoc*).

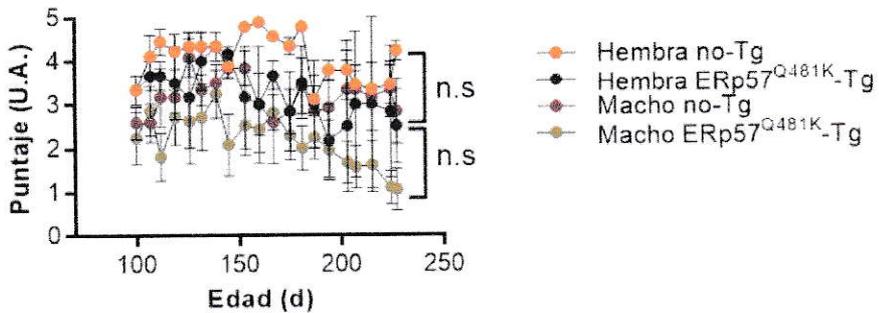
**A**



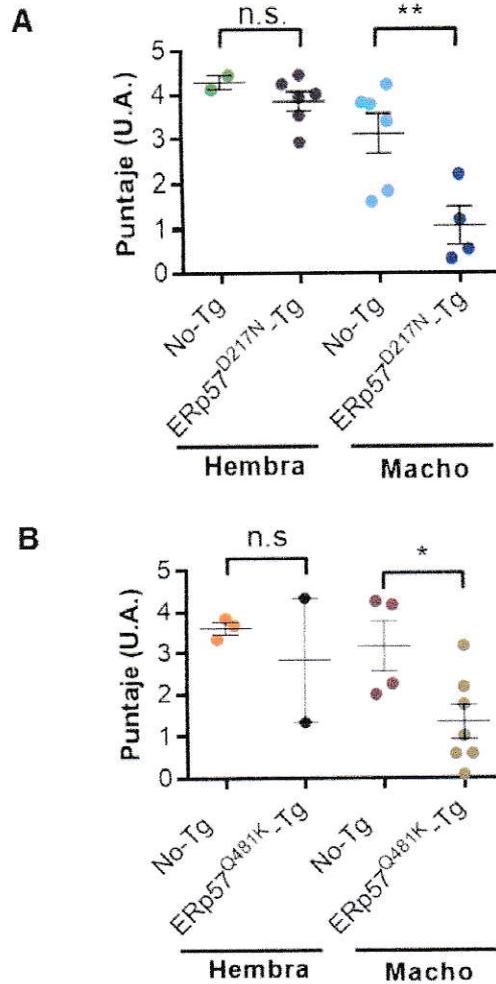
**B**



**C**



**Figura 11. Desempeño en la prueba motora “Wire hang test” de los ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup>.** Las mediciones del desempeño en la prueba de “Wire Hang test” de las colonias ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup> se registraron semanalmente. **(A)** Los ratones se pusieron en una barra horizontal y se grabó su desempeño durante 30 s. **(B)** Las mediciones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> comprenden entre los 117 y 220 días de vida. **(C)** Las mediciones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> comprenden entre los 100 y 227 días de vida. Se muestran como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio para cada medición. Los grupos experimentales de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> poseen (n = 2) para hembras no-transgénicas, (n = 6) para hembras ERp57<sup>D217N</sup>-Tg, (n = 6) para machos no-transgénicos y (n = 4) para machos ERp57<sup>D217N</sup>-Tg. Los grupos experimentales para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> poseen (n = 3) para hembras no-transgénicas, (n = 2) para hembras ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, (n = 4) para machos no-transgénicos y (n = 7) para machos ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. (*p* value: no significativa (n.s), *p* > 0,05; ANOVA de dos vías y Bonferroni's post hoc).



**Figura 12. Promedio del puntaje de desempeño en la prueba motora “Wire Hang test” de los ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup>.** Las mediciones del desempeño en la prueba de “Wire Hang test” de las colonias ERp57<sup>D217N</sup> (A) y ERp57<sup>Q481K</sup> (B) de los últimos meses de registro se promediaron. (A) En el gráfico se muestran los promedios de las mediciones del “Wire Hang test” para los dos últimos meses de registros de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> obtenidos entre los 151 y los 220 días de vida. (B) En el gráfico se muestran los promedios de las mediciones del “Wire Hang test” para el último mes de registro de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> obtenidos entre los 207 y los 227 días de vida. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio para cada medición. Los grupos experimentales de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> poseen (n = 2) para hembras no-transgénicas, (n = 6) para hembras ERp57<sup>D217N</sup>-Tg, (n = 6) para machos no-transgénicos y (n = 4) para machos ERp57<sup>D217N</sup>-Tg. Los grupos experimentales para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> poseen (n = 3) para hembras no-transgénicas, (n = 2) para hembras ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, (n = 4) para machos no-transgénicos y (n = 7) para machos ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. (*p* value: no significativa (n.s), *p* > 0,05; \*, *p* < 0,05; \*\*, *p* < 0,01; comparado con ratones no-transgénicos (No-Tg), prueba *t* de Student).

motores y de coordinación en los ratones machos ERp57<sup>D217N</sup>-Tg. Esto podría ser atribuible a la forma mutante de ERp57<sup>D217N</sup> que sobreexpresan.

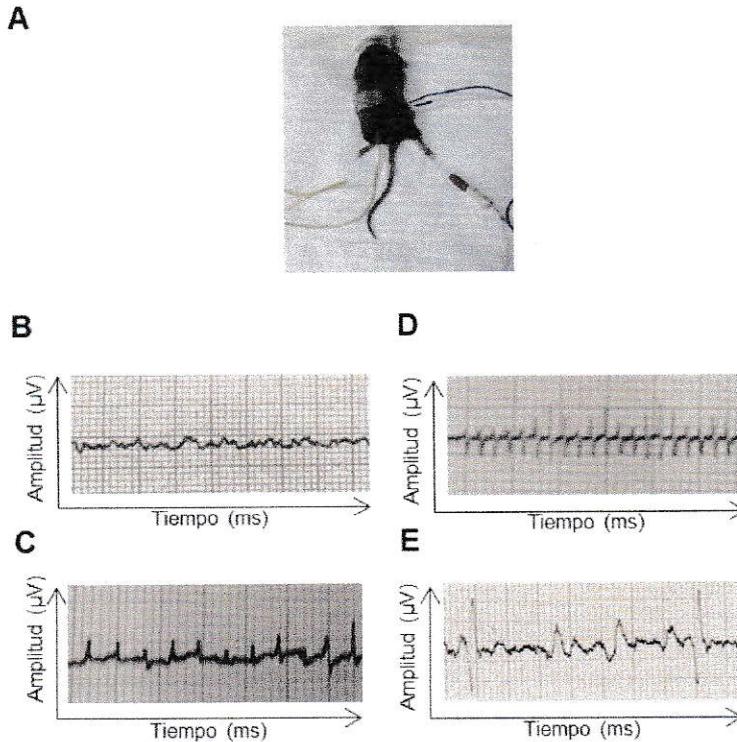
Para los grupos experimentales de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> (Figura 11C), los machos ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg comenzaron con un promedio de puntajes de 2,5 y a partir de los 180 días de vida, comenzaron a disminuir hasta llegar a puntajes cercanos al mínimo (en promedio 1), mientras que en los otros tres grupos experimentales se mantuvieron promedios de puntajes constantes a lo largo de las mediciones, de 3 para machos no-transgénicos, 3 para hembras ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg y 4 para hembras no-transgénicas. Estos resultados mostraron que existe un deterioro progresivo en el desempeño de los machos ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg desde los 180 hasta los 227 días de vida, lo cual podría deberse a procesos degenerativos causados por la forma mutante ERp57<sup>Q481K</sup>.

La Figura 12 muestra los valores promedios de puntaje obtenidos en los últimos dos meses de registros para la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y el último mes de registros para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> ya que este periodo mostró el peor resultado motor, el que luego se mantiene durante el tiempo de evaluación. Para la colonia ERp57<sup>D217N</sup>, las hembras no-transgénicas no presentaron diferencias en comparación a las hembras ERp57<sup>D217N</sup>-Tg, mientras que sí existieron diferencias significativas entre machos no-transgénicos y machos ERp57<sup>D217N</sup>-Tg (Figura 12A). Para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>, las hembras no-transgénicas no presentan diferencias en comparación a las hembras ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, mientras que existieron diferencias significativas entre machos no-transgénicos y machos ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg (Figura 12B).

### 7.3. Inervación muscular en ratones que sobreexpresan formas mutantes de ERp57.

La ELA es considerada como una axonopatía distal, donde las primeras perturbaciones de las motoneuronas ocurren en la UNM (Fischer y col., 2004). Además, el estudio de Woehlbier y col., 2015 mostró que los ratones KO condicionales de ERp57 en el SNC desarrollan problemas motores causados por alteraciones en las UNM. De esta forma, con el objeto de analizar si el peor desempeño motor encontrado durante los registros en ambas líneas de ratones transgénicos era debido a problemas en la sinapsis neuromuscular, se realizaron estudios complementarios con estos animales. La edad de los ratones analizados de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> fue de 220 días de vida, mientras que los de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> fueron de 400 días de vida. En ambos casos se analizaron ratones con bajo desempeño motor.

Con el fin de evaluar si el impedimento motor generado por las mutaciones en ERp57 era debido a problemas de inervación musculares, se realizó electromiografías (EMG). Para medir la actividad del músculo *gastrocnemius*, se introdujeron electrodos en ratones anestesiados y se registró su actividad espontánea. Se asignaron puntajes de EMG dependiendo de la actividad espontánea encontrada en los músculos (6.4 Electromiografía, Materiales y Métodos). En la Figura 13A se muestra una fotografía representativa del procedimiento utilizado para realizar la medición de EMG, con los electrodos: tierra (amarillo), cátodo (azul), ánodo (blanco) y de registro. La Figura 13B, 13C, 13D y 13E muestran registros representativos de un músculo con puntaje 0 (sin actividad espontánea), + (pequeñas fibrilaciones espontáneas y aisladas), ++ (fibrilaciones con asociación) y +++ (fibrilaciones profusas) respectivamente.



**Figura 13. Registro de EMG de ratones de las colonias mutantes de ERp57 y SOD1<sup>G93A</sup>.** Ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> de 150 días de vida y ERp57<sup>Q481K</sup> de 400 días de vida se anestesiaron y se sometieron a registros de EMG del músculo *gastrocnemius*. **(A)** Fotografía representativa del procedimiento utilizado para realizar la medición de EMG. **(B)** Registro representativo de un músculo sin actividad espontánea con puntaje 0 **(C)** Registro representativo de un músculo con puntaje +. **(D)** Registro representativo de un músculo con puntaje ++. **(E)** Registro representativo de un músculo con puntaje +++

Para la colonia ERp57<sup>D217N</sup> los registros observados para animales no-transgénico y ERp57<sup>D217N</sup>-Tg eran registros planos, sin actividad espontánea (Figura 13B), mientras que en la Figura 13E se muestra un EMG representativo de un animal SOD1<sup>G93A</sup> sintomático, utilizado como un control positivo, en el cual se pudo observar actividad espontánea y fibrilaciones profusas del músculo gastrocnemius. En la Tabla 3 se presenta el resumen de los puntajes asignados a las mediciones obtenidas en los ratones analizados de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y SOD1<sup>G93A</sup> sintomático. Se analizaron 6 ratones no transgénicos y 5 ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg, de los cuales ninguno mostró actividad espontánea en el músculo *gastrocnemius*, lo cual corresponde a una puntuación de 0. En control positivo, ratones SOD1<sup>G93A</sup>, presentan actividad espontánea y fibrilación es profusas, lo cual corresponde a un puntaje de +++.

Para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> los registros observados para animales no-transgénicos y ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg fueron registros planos, con fibrilaciones espontáneas y aisladas y fibrilaciones con asociación, los cuales tienen puntajes 0 (Figura 13B), + (Figura 13C) y ++ (Figura 13D), respectivamente. En la Figura 13E, se muestra un EMG representativo de un animal SOD1<sup>G93A</sup> sintomático, utilizado como un control positivo, en el cual se puede observar actividad espontánea y fibrilaciones profusas del músculo gastrocnemius. En la Tabla 4, se presenta el resumen de los puntajes asignados a las mediciones obtenidas en los ratones analizados de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> y SOD1<sup>G93A</sup> sintomáticos. Se analizaron 6 ratones no transgénicos, de los cuales tres no presentaron actividad espontánea en el músculo *gastrocnemius* con un puntaje 0, dos ratones presentaron un puntaje + y un ratón presentó un puntaje más agresivo de ++. Se analizaron 8 ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, de los cuales tres no presentaron actividad espontánea en el músculo *gastrocnemius* con un puntaje 0, cuatro ratones presentaron

**Tabla 3. Resumen de resultados de EMG de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y SOD1<sup>G93A</sup>.** Se midió el registro de EMG del músculo *gastrocnemius* derecho y se le asignó el puntaje correspondiente (ver materiales y métodos) para lo observado en ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y hermanos de camada no-transgénicos. Como control positivo, se utilizaron ratones SOD1<sup>G93A</sup> sintomáticos.

Genotipo	Puntaje EMG	n
No-transgénico	0	6
ERp57 <sup>D217N</sup> -Tg	0	5
SOD1 <sup>G93A</sup> sintomático	+++	3

**Tabla 4. Resumen de resultados de EMG de ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> y SOD1<sup>G93A</sup>.** Se midió el registro de EMG del músculo *gastrocnemius* derecho y se le asignó el puntaje correspondiente (ver materiales y métodos) para lo observado en ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg y hermanos de camada no-transgénicos. Como control positivo, se utilizaron ratones SOD1<sup>G93A</sup> sintomáticos.

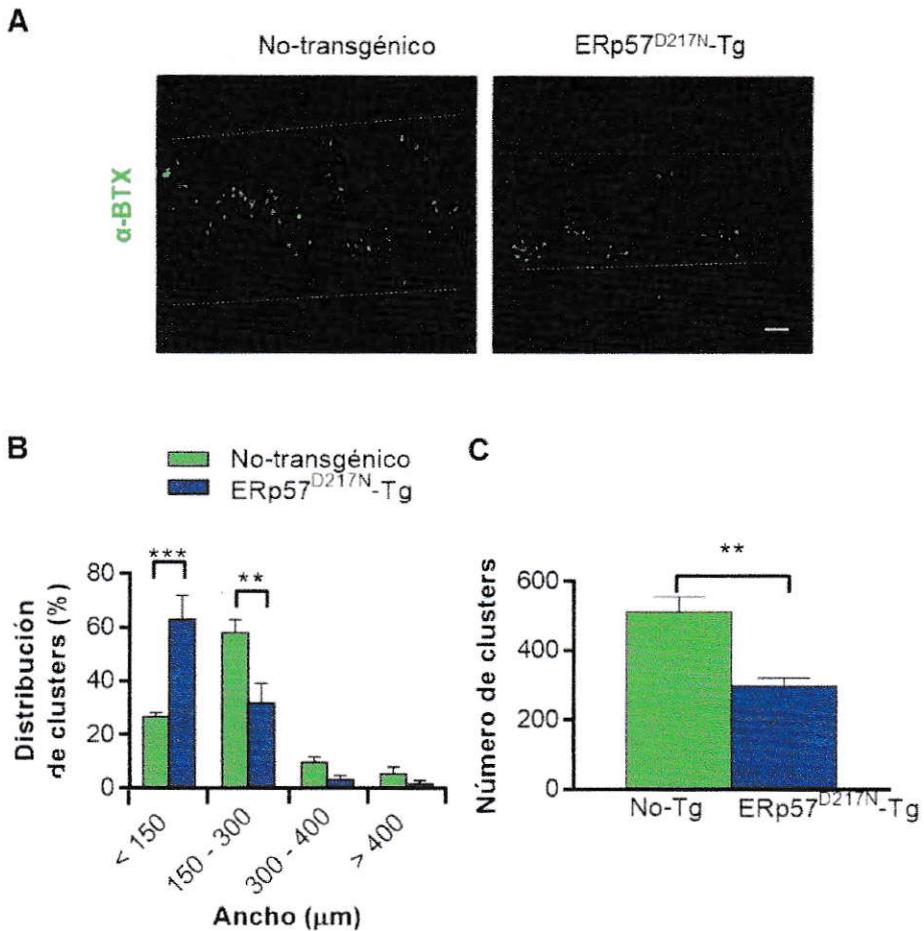
Genotipo	Puntaje EMG			n		
No-transgénico	0	+	++	3	2	1
ERp57 <sup>Q481K</sup> -Tg	0	+	++	3	4	1
SOD1 <sup>G93A</sup> sintomático	+++			3		

un puntaje + y un ratón presentó un puntaje más agresivo de ++. En cuanto a los controles positivos, ratones SOD1<sup>G93A</sup>, se observó una actividad espontánea y fibrilación profusa, lo cual corresponde a un puntaje de +++.

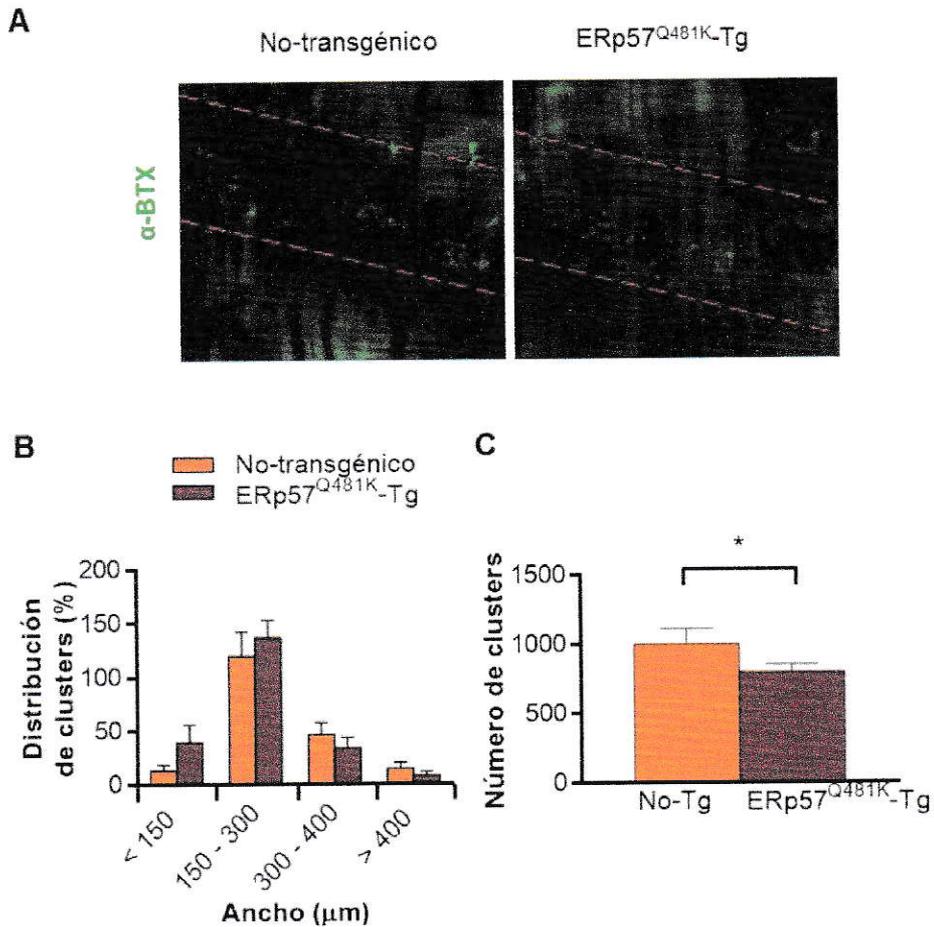
Estos resultados muestran que la mutación D217N en ERp57 no generó efectos adversos a nivel funcional de la UNM del músculo *gastrocnemius*, ya que los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg no presentaron actividad espontánea en el músculo. Para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>, se observó que en ambos genotipos de ratones, no-transgénicos y ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, existen puntajes 0, + y ++. Esto se puede deber a la avanzada edad donde se analizaron (400 días de vida), donde existen procesos que afectan la funcionalidad muscular por el envejecimiento (Harwood y col., 2011), lo que no estaría ligado a la expresión de la mutación en ERp57.

Otra aproximación para estudiar la causa de los problemas motores desarrollados en la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup>, se realizó a través de la medición de la sinapsis neuromuscular de estos ratones. Para esto, se analizó la UNM del músculo del diafragma (músculo relevante que pierde inervación en el curso de la ELA) (Perezgarcía y Burden, 2012; Dupuis y col., 2009; Liu y col., 2013). Para esto se utilizó  $\alpha$ -bungarotoxina (BTX)-Alexa-488, molécula que se une los receptores de acetil colina (AChR) presentes en el aparato post-sináptico (Figura 14 y 15). La Figura 14A y 15A muestran fotos representativas de la banda de racimos o “clusters” de AChR a lo largo del diafragma obtenidos para los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg y ratones controles respectivos.

La mutación D217N en ERp57 generó una banda más angosta de “clusters” de AChR en comparación con los animales controles (no-transgénicos). Se cuantificó el ancho de las bandas de AChR (Figura 14B) y se obtuvo que los ratones transgénicos



**Figura 14. Análisis del ancho de banda de los terminales post-sinápticos en ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup>.** Músculos diafragmas de ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y de sus hermanos de camada no-transgénicos se tiñeron con  $\alpha$ -BTX (verde) para analizar el ancho de banda de “clusters” de AChR. **(A)** Imágenes representativas de del ancho de banda de “clusters” de AChR en diafragmas de ambos genotipos. **(B)** Cuantificación de ancho de banda cada 134  $\mu\text{m}$  a lo largo de toda la extensión dorsoventral de los diafragmas. Se realizó entre 60 a 80 mediciones por diafragma. **(C)** Cuantificación del número total de aparatos post-sinápticos en la sección medial 3/5 de los diafragmas. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de ( $n = 4$ ) ratones por genotipo. ( $p$  value: \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; comparado con ratones no-transgénicos (No-Tg), ANOVA de una vía).Escala de barra:100 $\mu\text{m}$ .

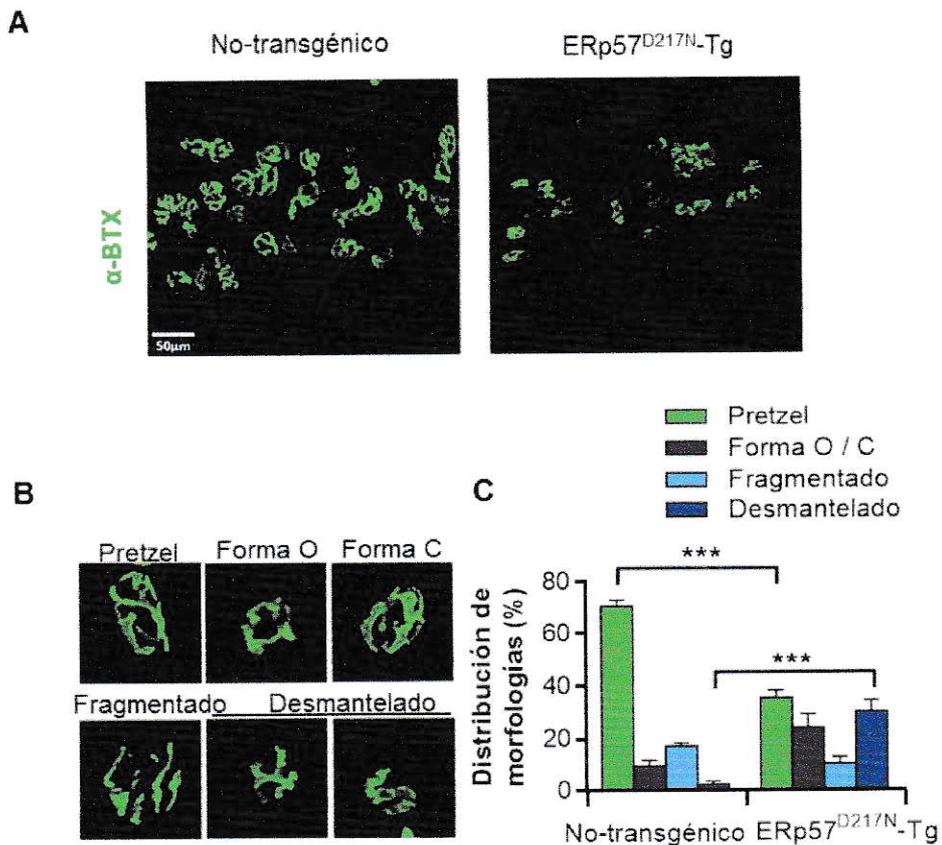


**Figura 15. Análisis del ancho de banda de los terminales post-sinápticos en ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>.** Músculos diafragmas de ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg y de sus hermanos de camada no-transgénicos se tiñeron con  $\alpha$ -BTX (verde) para analizar el ancho de banda de "clusters" de AChR. **(A)** Imágenes representativas del ancho de banda de "clusters" de AChR en diafragmas de ambos genotipos. **(B)** Cuantificación de ancho de banda cada 134  $\mu$ m a lo largo de toda la extensión dorsoventral de los diafragmas. Se realizó entre 60 a 80 mediciones por diafragma. **(C)** Cuantificación del número total de aparatos post-sinápticos en la sección medial 3/5 de los diafragmas. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de ( $n = 4$ ) ratones por genotipo. ( $p$  value: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; comparado con ratones no-transgénicos (No-Tg), ANOVA de una vía). Escala de barra: 100 $\mu$ m.

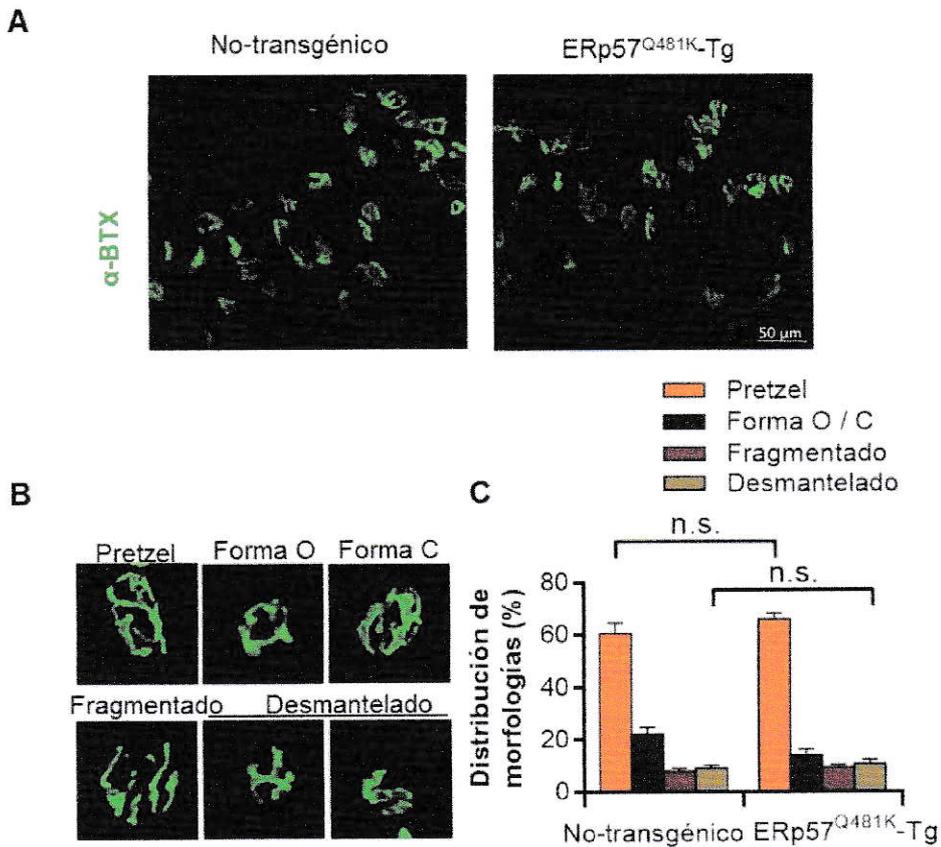
presentan un perfil de bandas más angosto, donde cerca de un 60% presenta un ancho menor a 150µm, mientras que los hermanos no-transgénicos presentan un perfil de banda más ancho, en donde un 60% de las bandas miden entre 150 y 300 µm. Además, se cuantificó el número total de “clusters” de AChR (Figura 14C), el cual resultó significativamente menor en animales ERp57<sup>D217N</sup>-Tg en comparación con ratones controles. La mutación Q481K en ERp57 no generó diferencias en cuanto al ancho de banda de “clusters” de AChR en comparación con los animales controles (no-transgénicos). Se cuantificó el ancho de las bandas de AChR (Figura 15B) y se obtuvo que los ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg no presentaban diferencias en el perfil de bandas, en comparación con los hermanos no-transgénicos. Además, se cuantificó el número total de “clusters” de AChR (Figura 15C), el cual disminuye significativamente en animales ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg en comparación con ratones controles.

También se analizaron las morfologías de las UNM. Se realizaron reconstrucciones tridimensionales (3D) de las UNM a partir imágenes de secciones transversales o “z-stacks” de diafragmas completos montados y teñidos con αBTX. Las Figuras 16A y 17A muestran imágenes representativas de UNM de ambos genotipos analizados. En la colonia ERp57<sup>D217N</sup> se observó que los ratones no-transgénicos presentaron una mayor proporción de UNM con forma madura tipo “pretzel”, mientras que los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg presentaron UNM con morfologías alteradas. En la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> se observó que no existen grandes diferencias entre los ratones no-transgénicos y los ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg ya que ambos tienen mayores proporciones de UNM con forma madura tipo “pretzel”.

A modo de referencia, las Figuras 16B y 17B muestran imágenes representativas de mayor magnificación de todos los tipos de morfología encontrados en los diafragmas estudiados, los cuales comprenden forma madura tipo “pretzel” (altamente



**Figura 16. Análisis de las morfologías de UNM de los ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup>.** Músculos diafragmas completos de ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y sus hermanos de camada no-transgénicos se tiñeron con  $\alpha$ -BTX (verde) para analizar la morfología de las UNM mediante las proyecciones de los "z-stacks". **(A)** Imágenes representativas de diafragmas ratones no-transgénicos y ERp57<sup>D217N</sup>-Tg. **(B)** Las diferentes morfologías de las UNM observadas se agruparon en 5 categorías: Madura tipo "pretzel", con forma de C/O, fragmentado y desmantelado. **(C)** Cuantificación de la distribución de la frecuencia de las diferentes morfologías de 50-70 UNM diferentes por animal y por genotipo. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de (n = 4) ratones por genotipo. (*p* value: \*\*\*, *p* < 0,001; comparado con ratones no-transgénicos, ANOVA de una vía). Escala de barra: 50  $\mu$ m.



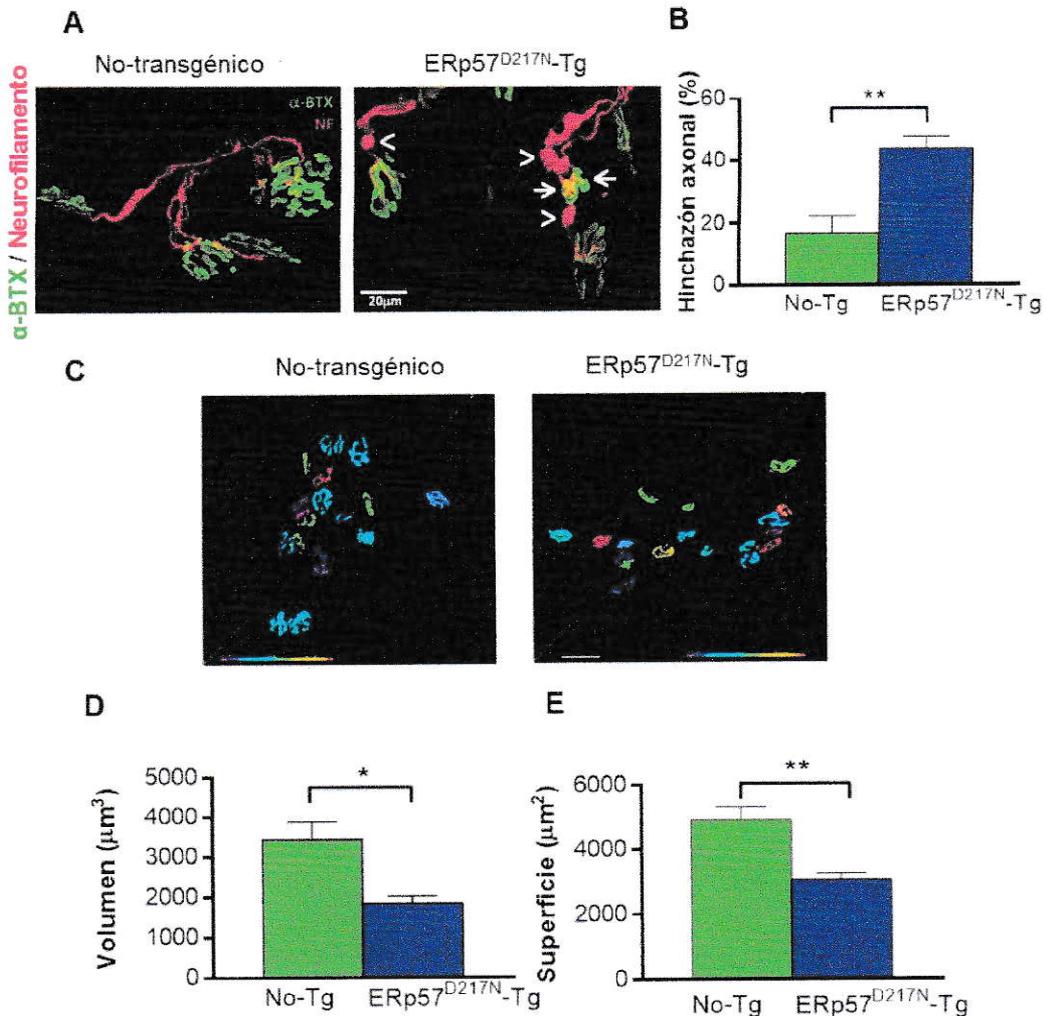
**Figura 17. Análisis de las morfologías de UNM de los ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>.** Músculos diafragmas completos de ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg y sus hermanos de camada no-transgénicos se tiñeron con  $\alpha$ -BTX (verde) para analizar la morfología de las UNM mediante las proyecciones de los "z-stacks". **(A)** Imágenes representativas de diafragmas de ratones no-transgénicos y ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. **(B)** Las diferentes morfologías de las UNM observadas se agruparon en 5 categorías: Madura tipo "pretzel", con forma de C, con forma de O, fragmentado y desmantelado. **(C)** Cuantificación de la distribución de la frecuencia de las diferentes morfologías de 50-70 UNM diferentes por animal y por genotipo. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de (n = 4) ratones por genotipo. (*p* value: no significativa (n.s), *p* > 0,05; comparado con ratones no-transgénicos, ANOVA de una vía). Escala de barra: 50  $\mu$ m.

complejos y ramificados que poseen parte de su interior con una baja densidad de agregados del AChR), la forma C/O (estructura con una o más perforaciones grandes que tienen sólo una abertura en su borde,) la forma fragmentada (formados por la disgregación en segmentos de agregados del AChR en un número mayor a 4 fragmentos) y forma desmantelada (estructura que se ve de menor complejidad y tamaño, además de una morfología irregular respecto de un “pretzel”).

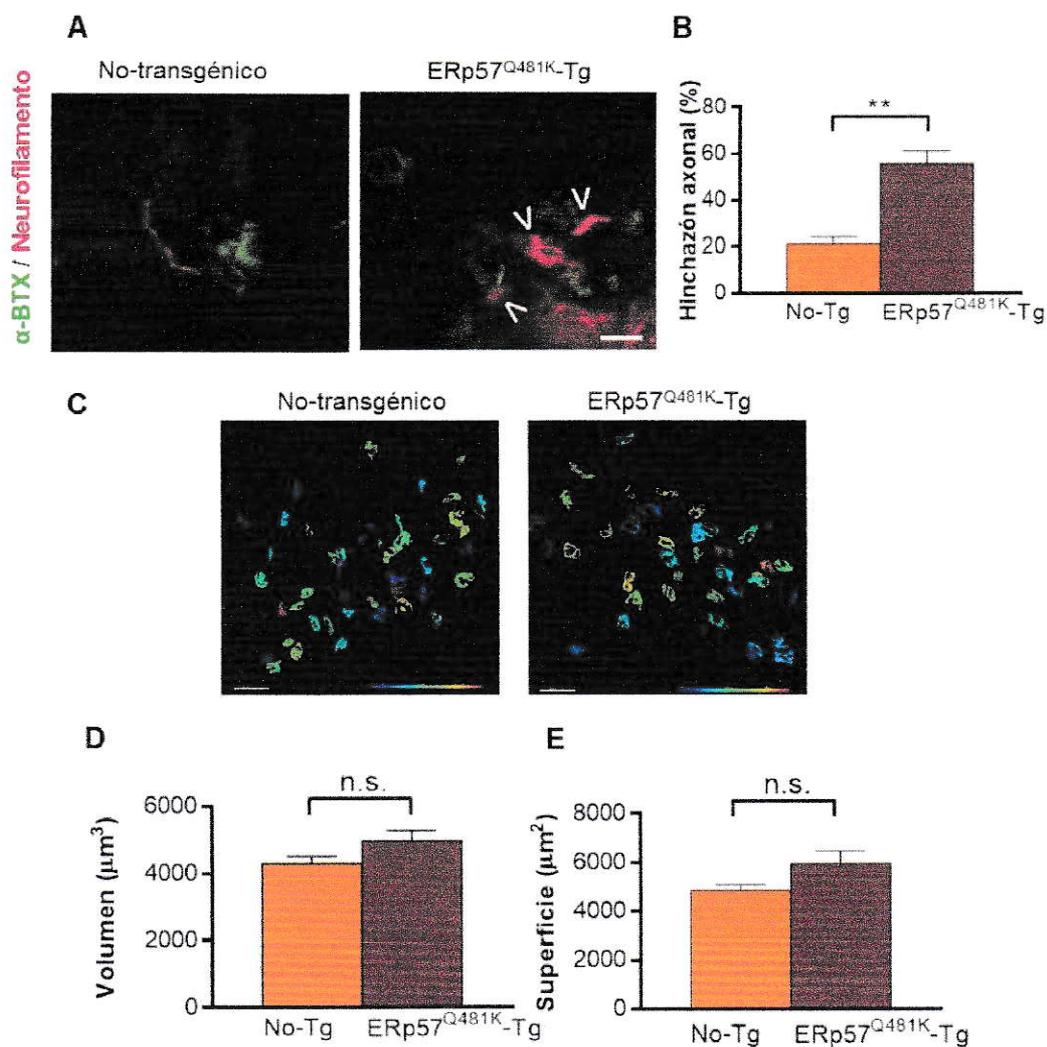
Cuando se analizó el patrón de UNM encontrado en ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg, se obtuvo que existe un aumento significativo de morfologías desmanteladas y una tendencia al aumento de las formas C/O, mientras que la forma madura tipo “pretzel” disminuye significativamente, al compararlos con ratones controles (Figura 16C), mientras que en las UNM de los ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg no se observaron cambios significativos en las morfologías si se comparan con ratones controles (Figura 17C).

A continuación, para observar los patrones de inervación presentes en ambos genotipos se realizó el análisis de los aparatos pre- y post-sinápticos de las UNM. Para esto, diafragmas completos se montaron y tiñeron con un anticuerpo anti-neurofilamento (de color rojo) para marcar el aparato pre-simpático y con  $\alpha$ BTX (de color verde) para marcar el aparato post-sináptico. Mediante proyecciones de “z-stacks”, se logró visualizar ambos aparatos en las UNM, en la Figura 18A y 19A se muestran imágenes representativas de las UNM para ambos genotipos.

Para la colonia ERp57<sup>D217N</sup>, los animales no-transgénicos presentaron UNM íntegras, en las cuales el aparato pre-sináptico inerva completamente el aparato post-sináptico, que a su vez presentó formas maduras tipo “pretzel”. En cambio, los animales ERp57<sup>D217N</sup>-Tg presentaron UNM alteradas, en las cuales el aparato post-sináptico presentó morfologías anormales y poco complejas. La inervación del aparato pre-sináptico presentó hinchazón axonal, que está relacionado con la retracción del



**Figura 18. Análisis de los aparatos pre- y post-sináptico de las UNM de los ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup>.** Diafragmas completos de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> se tiñieron con el anti-cuerpo anti-neurofilamento (rojo), para visualizar los aparatos pre-sinápticos, y con  $\alpha$ -BTX (verde), para visualizar los aparatos post-sinápticos, para analizar las estructuras de las UNM mediante proyecciones de "z-stacks". **(A)** Imágenes representativas de los aparatos pre- y post-sinápticos. Se muestran ejemplos de densidades post-sinápticas (flechas) e hinchazón axonal (punta de flecha). **(B)** Cuantificación de la hinchazón axonal. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de  $n = 4$  ratones por genotipo. ( $p$  value: \*\*,  $p < 0.01$ ; comparado con animales no-transgénicos (No-Tg); prueba  $t$  de Student). **(C)** Mapas de calor de las reconstrucciones 3D de los aparatos post-sinápticos de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup>. El mapa de calor representa la distribución de las UNM de mayor volumen (hacia colores morado) hasta las de menor volumen (hacia colores rojos). **(D, E)** Morfometría cuantitativa de  $> 60$  aparatos post-sinápticos estudiados. Se muestran los resultados como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de ( $n = 4$ ) ratones por genotipo. ( $p$  value: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; comparado con ratones no-transgénicos, ANOVA de una vía). Escala de barra: **(A)** 20  $\mu\text{m}$  y **(C)** 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 19. Análisis de los aparatos pre- y post-sináptico de las UNM de los ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>.** Diafragmas completos de ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> se tiñeron con el anti-cuerpo anti-neurofilamento (rojo), para visualizar los aparatos pre-sinápticos, y con α-BTX (verde), para visualizar los aparatos post-sinápticos, para analizar las estructuras de las UNM mediante proyecciones de "z-stacks". **(A)** Imágenes representativas de los aparatos pre- y post-sinápticos. Se muestran ejemplos de hinchazón axonal (punta de flecha). **(B)** Cuantificación de la hinchazón axonal. Los resultados se presentan como el promedio ± el error estándar del promedio de n = 4 ratones por genotipo. (p value: \*\*, p < 0.01; comparado con animales no-transgénicos (No-Tg); prueba t de Student). **(C)** Mapas de calor de las reconstrucciones 3D de los aparatos post-sinápticos de ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>. El mapa de calor representa la distribución de las UNM de mayor volumen (hacia colores morado) hasta las de menor volumen (hacia colores rojos). **(D, E)** Morfometría cuantitativa de > 60 aparatos post-sinápticos estudiados. Se muestran los resultados como el promedio ± el error estándar del promedio de (n = 4) ratones por genotipo. (p value: no significativa (n.s.), p > 0,05; comparado con ratones no-transgénicos, ANOVA de una vía). Escala de barra: **(A)** 20 μm y **(C)** 50 μm

terminal, un fenotipo característico de ratones envejecidos y que también se observa en modelos murinos de la ELA (Valdez y col., 2012; Valdez y col., 2010). Este fenotipo patológico se cuantificó (Figura 18B) y se observó que los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg presentan porcentajes de aparatos pre-sinápticos con hinchazón axonal significativamente mayores que sus hermanos de camada no-transgénicos.

Para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>, se encontró entre ratones no-transgénicos y ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg en cuanto a los aparatos pre-sinápticos. Los terminales axonales presentaron elevado porcentaje de hinchazón axonal (Figura 19B). Esto mostró que existen diferencias por genotipo al expresar la forma mutante Q481K en ERp57 en este parámetro.

Otro parámetro de las UNM que fue analizado en ratones mutantes de ERp57 correspondió a la superficie y los volúmenes totales de los aparatos post-sinápticos. En las Figuras 18C y 19C se muestran mapas de calor de la reconstrucción 3D de los aparatos post-sinápticos de ratones de ambos genotipos y sus hermanos de camada no-transgénicos correspondientes. El mapa de calor representa la distribución de las UNM de mayor volumen (hacia colores morado), hasta las UNM de menor volumen (hacia colores rojos).

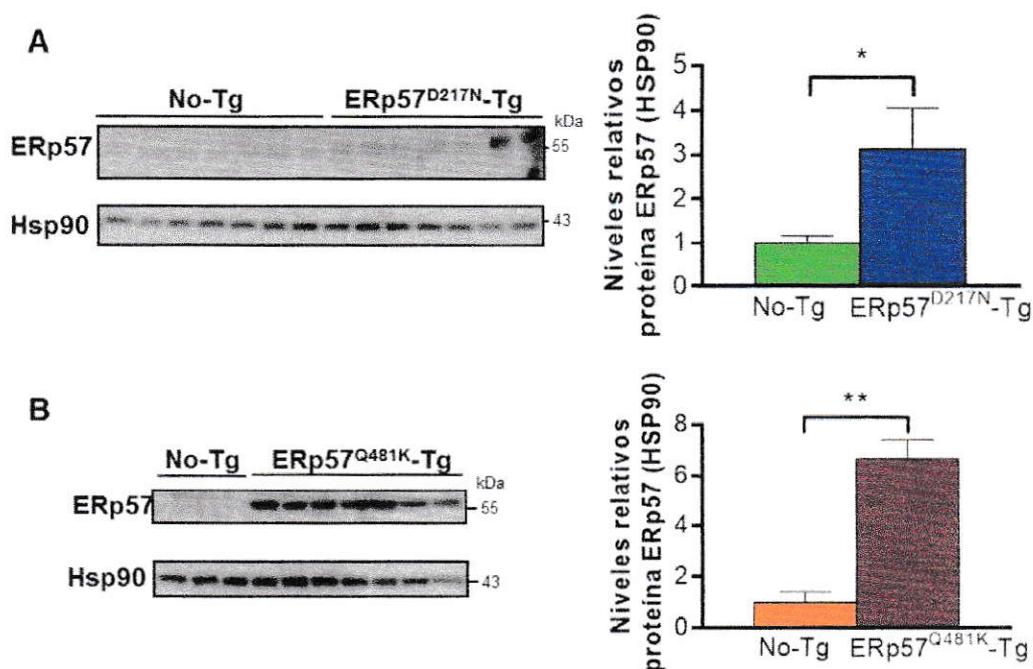
Los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg presentaron colores de las UNM que representan volúmenes menores, comparados con los ratones no-transgénicos. Las cuantificaciones mostraron una disminución en el volumen total (Figura 18D) y en la superficie (Figura 18E) de las UNM de ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg en comparación con ratones controles. Los ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg y sus controles presentaron colores de las UNM que representan volúmenes altos para los dos genotipos. Las cuantificaciones mostraron que no varían los volúmenes totales (Figura 19D), ni en la superficie (Figura 19E) de las UNM de ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, en comparación con ratones controles.

#### **7.4. Análisis de músculo esquelético de ratones ERp57 mutantes.**

En la ELA, diferentes grupos de motoneuronas son vulnerables a sufrir degeneración en diferentes etapas de la enfermedad (Saxena y Caroni, 2011), por lo que analizar las fibras musculares inervadas por las motoneuronas es un parámetro importante de estudiar. Además, el estudio de Woehlbier y col., 2015 determinó que los ratones KO condicionales de ERp57 presentaron alteraciones del músculo esquelético. Por lo tanto, con el objetivo de estudiar las posibles consecuencias a nivel muscular debido a las alteraciones de las UNM encontradas en ratones de ambas colonias, se realizó un análisis bioquímico e histopatológico del músculo esquelético.

Es importante analizar si se expresan las formas mutantes de ERp57 en el músculo esquelético, ya que si esto ocurre, las mutantes de ERp57 podrían tener efectos fuera del SNC. Existen estudios que muestran que la expresión de genes bajo el promotor de prion puede ocurrir fuera del SNC (Borchelt y col., 1996). Además el músculo es un tejido vulnerable y afectado durante la progresión de la ELA (Valdez y col., 2012). Para confirmar si existe sobreexpresión de las formas mutantes de ERp57 en músculo esquelético, se analizó los niveles proteína mediante análisis de Western blot del tejido muscular.

Se detectó la proteína de ERp57 utilizando un anticuerpo anti-ERp57 (Figura 20). Los resultados mostraron que ERp57 se expresa en los animales transgénicos. De esta forma, se determinó que la sobreexpresión de proteína ERp57<sup>D217N</sup> es de 3 veces y de ERp57<sup>Q481K</sup> es de 7 veces la proteína endógena en el músculo esquelético en comparación con sus hermanos de camada no-transgénicos.

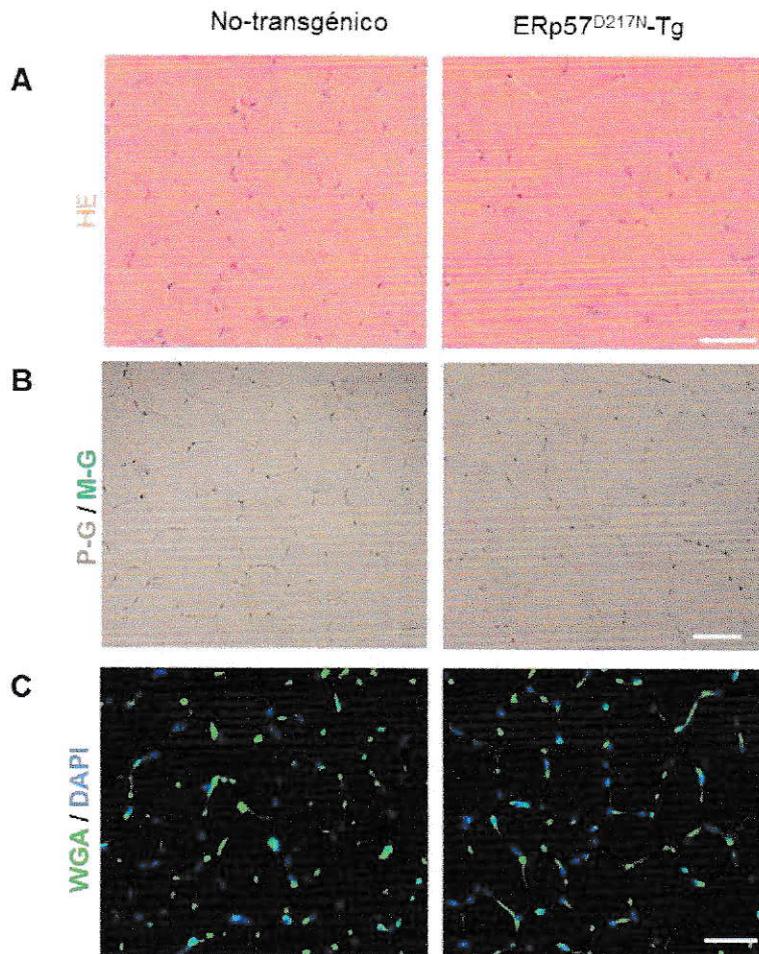


**Figura 20. Niveles de la proteína ERp57 en líneas transgénicas que sobreexpresan ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup> en el músculo esquelético.** Los niveles de proteína ERp57 de las colonias ERp57<sup>D217N</sup> (A) y ERp57<sup>Q481K</sup> (B) se analizaon en músculo esquelético mediante análisis de Western blot utilizando el anticuerpo anti-ERp57 (panel izquierdo). La cuantificación se realizó con respecto al control de carga HSP90 (panel derecho). Se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de (n = 7) para ERp57 no-transgénicos y (n = 7) para ERp57<sup>D217N</sup>-Tg (A) y (n = 3) para ERp57 no-transgénicos y (n = 7) ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg (B). (p value: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; comparado con ratones no-transgénicos (No-Tg), prueba *t* de Student).

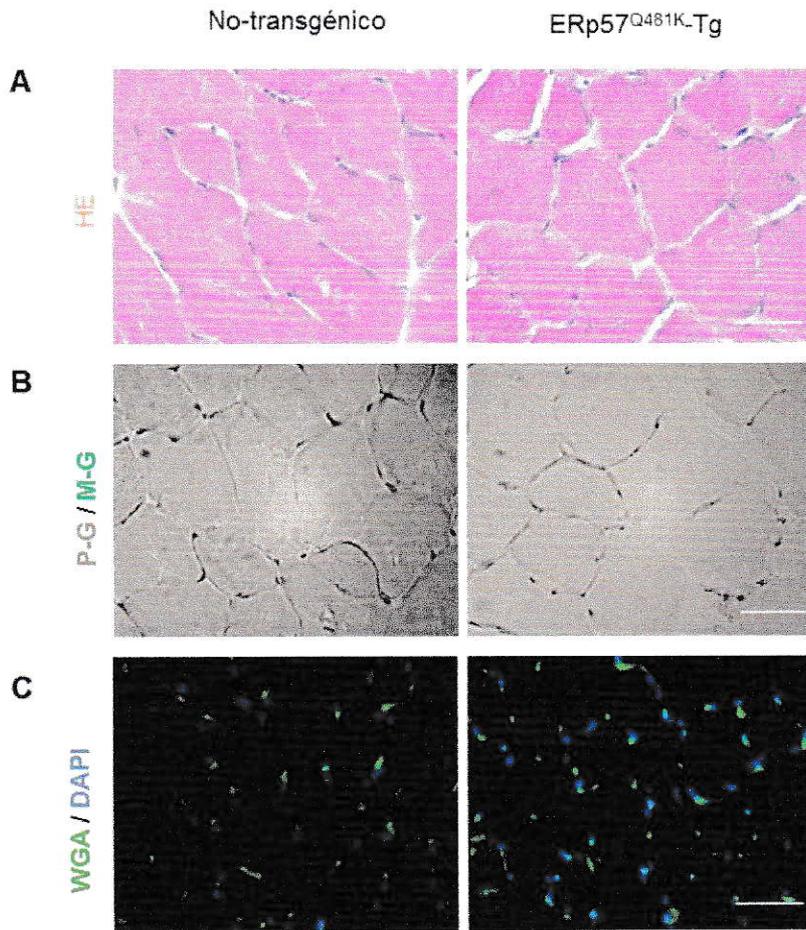
También se analizaron las fibras musculares de ambas colonias (Figura 21 y 22). Este análisis se realizó en el músculo *Tibialis anterior* (TA), que se diseccionó desde ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg y desde sus hermanos de camada no transgénicos respectivos, los que luego se cortó en un criostato en secciones de 20 µm de espesor.

Primero se analizó la morfología de fibras musculares mediante la tinción de hematoxilina-eosina (Figura 21A y 22A), la cual mostró que está no se encuentra afectada por la mutación D217N ni por Q481K en ERp57. A continuación, se co-tiñó con Pardo Bismarck y verde metil los depósitos de colágeno que se encuentran en los músculos y se observó que las muestras de tejido provenientes de ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg no presentaron fibrosis del músculo esquelético (Figura 21B y 22B).

Finalmente, se analizó la presencia de centronucleación en miofibras, conformación que usualmente se encuentra en músculos con distrofia (Totsuka y col., 1998). La centronucleación ocurre durante la regeneración y reparación de las miofibras después de una lesión y su abundancia está corelacionada con problemas en los ciclos de degeneración/regeneración (Goetsch y col., 2003). Las secciones de tejido muscular se co-tiñeron con aglutinina de germen de trigo conjugado con Alexa-488 para marcar la membrana plasmática y además DAPI para los núcleos. La ausencia de núcleos centrales sugirió que la mutación D217N y Q481K en ERp57 no afectó los ciclos de degeneración/regeneración del músculo esquelético (Figura 21C y 22C).



**Figura 21. Análisis del músculo esquelético de la colonia de ratones ERp57<sup>D217N</sup>.** El músculo *Tibialis anterior* (TA) de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> se diseccionó y tiñó con diferentes marcadores de integridad de las fibras musculares. **(A)** Tinción de hematoxilina-eosina (HE) muestra la morfología de fibras musculares. **(B)** La tinción con Pardo Bismarck-verde metil (P-G/M-G) muestra si existe fibrosis del músculo esquelético. **(C)** La co-tinción con aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugado con Alexa-488 y DAPI muestra si hay efectos en los ciclos de degeneración/regeneración. Para todas las tinciones realizadas se muestran imágenes representativas para cada genotipo adquiridas en la misma región anatómica del músculo TA (n = 4 por genotipo). Escala de barra: 50  $\mu$ m.

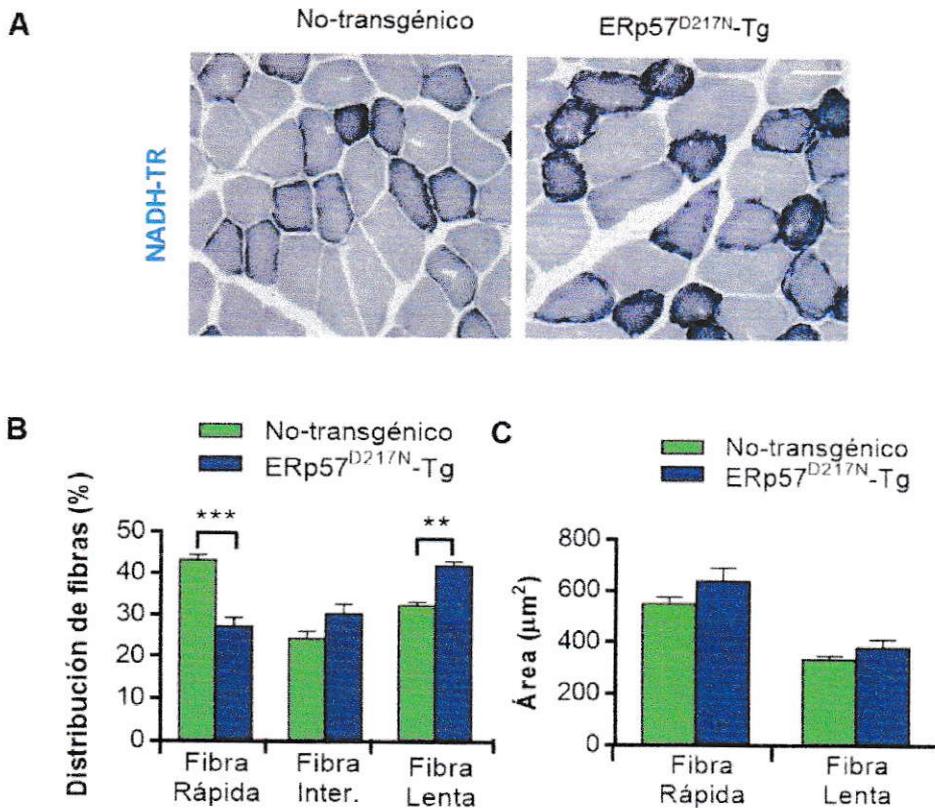


**Figura 22. Análisis del músculo esquelético de la colonia de ratones ERp57<sup>Q481K</sup>.** El músculo *Tibialis anterior* (TA) de ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> se diseccionó y tiñó con diferentes marcadores de integridad de las fibras musculares. **(A)** Tinción de hematoxilina-eosina (HE) muestra la morfología de fibras musculares. **(B)** La tinción con Pardo Bismarck-verde metil (P-G/M-G) muestra si existe fibrosis del músculo esquelético. **(C)** La co-tinción con aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugado con Alexa-488 y DAPI muestra si hay efectos en los ciclos de degeneración/regeneración. Para todas las tinciones realizadas se muestran imágenes representativas para cada genotipo adquiridas en la misma región anatómica del músculo TA (n = 4 por genotipo). Escala de barra: 50  $\mu$ m.

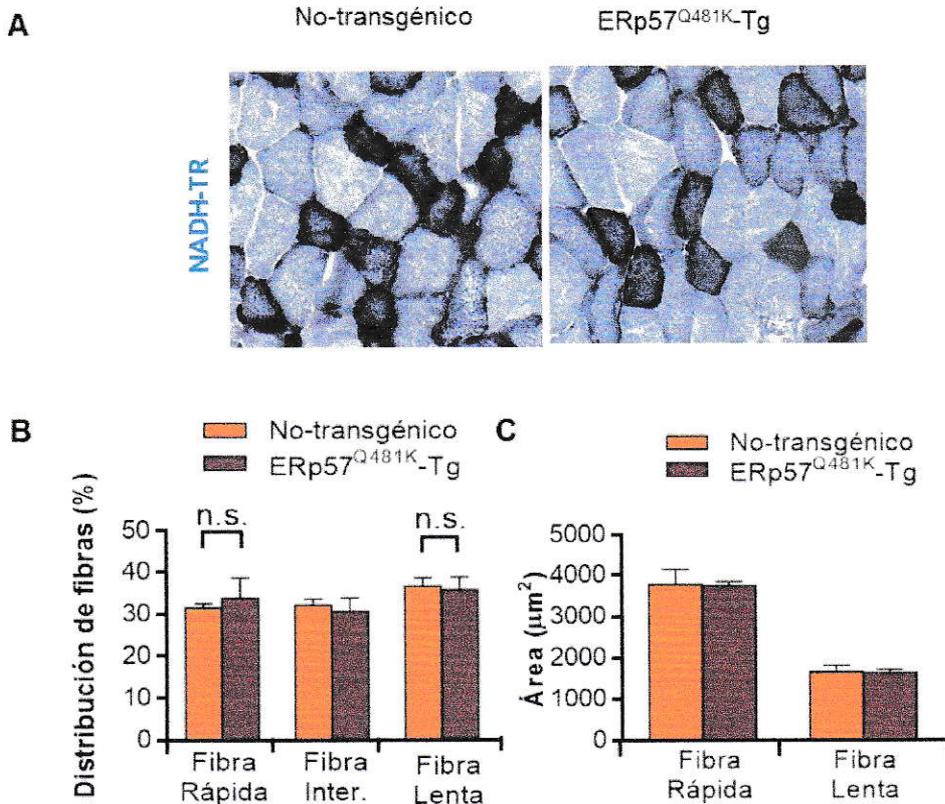
Las propiedades funcionales y estructurales del músculo esquelético dependen de la innervación de las motoneuronas, por lo que también se analizó la morfología y distribución de miofibras en el músculo TA, utilizando una tinción que permite determinar la actividad NADH-TR con el fin de identificar miofibras oxidativas. La Figura 23A y 24A muestra imágenes representativas de secciones transversales de ambos genotipos.

Para la colonia ERp57<sup>D217N</sup> se observó que existen proporciones variables de tinciones positivas (azul oscuro), tinciones intermedias (azul) y tinciones negativas (azul claro) en los diferentes genotipos. Los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg mostraron mayor cantidad de miofibras con actividad NADH-TR positiva (fibras de contracción lentas) y menor cantidad de negativa (fibras de contracción rápida) (Figura 23B). Estos análisis mostraron que existe un perfil de tipos de miofibras oxidativas alterado generado por la mutación D217N en ERp57, ya que hay una disminución en el tipo de fibra muscular que es inervada por las motoneuronas vulnerables durante la ELA. Por otra parte el análisis del área de estas fibras musculares (Figura 23C) mostró que no existe variación en el área de las fibras de contracción rápida ni lentas.

Para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> se observó que no existen proporciones variables de tinciones positivas (azul oscuro), tinciones intermedias (azul) y tinciones negativas (azul claro) en los diferentes genotipos. Los tres tipos de miofibras oxidativas mostraron similares niveles entre ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg y sus hermanos de camada no-transgénicos (Figura 24B). La cuantificación del área de las fibras rápidas y lentas mostró que no existen diferencias entre ambos genotipos (Figura 24C).



**Figura 23. Composición y tamaño de las fibras musculares en los ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup>.** El músculo *Tibialis anterior* (TA) de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> se diseccionó y tiñó para detectar la actividad NADH-TR de las miofibras oxidativas. **(A)** Imágenes representativas de secciones transversales de ambos genotipos, donde se observan proporciones variables de tinciones positivas (azul oscuro), tinciones intermedias (azul) y tinciones negativas (azul claro). **(B)** Cuantificación del perfil de distribución de miofibras oxidativas de contracción rápidas, intermedias (inter.) y lentas. **(C)** Cuantificación del diámetro promedio de las fibras de contracción rápidas y lentas. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio de  $> 300$  fibras por animal de ( $n = 4$ ) ratones por genotipo. ( $p$  value: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; comparado con ratones no-transgénicos, ANOVA de una vía). Escala de barra: 50  $\mu\text{m}$ .

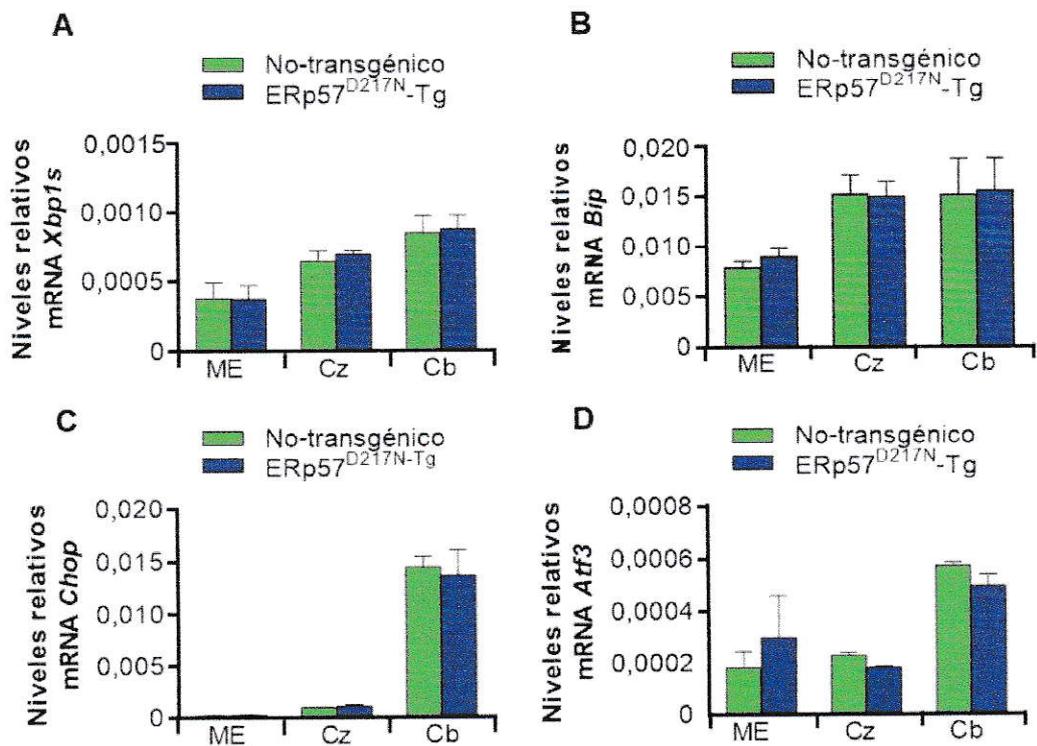


**Figura 24. Composición y tamaño de las fibras musculares en los ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>.** El músculo *Tibialis anterior* (TA) de ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> se diseccionó y tiñó para detectar la actividad NADH-TR de las miofibras oxidativas. **(A)** Imágenes representativas de secciones transversales de ambos genotipos, donde se observan proporciones variables de tinciones positivas (azul oscuro), tinciones intermedias (azul) y tinciones negativas (azul claro). **(B)** Cuantificación del perfil de distribución de miofibras oxidativas de contracción rápidas, intermedias (inter.) y lentas. **(C)** Cuantificación del diámetro promedio de las fibras de contracción rápidas y lentas. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio de > 300 fibras por animal de (n = 4) ratones por genotipo. (p value: no significativa (n.s),  $p > 0,05$ ; comparado con ratones no-transgénicos, ANOVA de una vía). Escala de barra: 50  $\mu$ m.

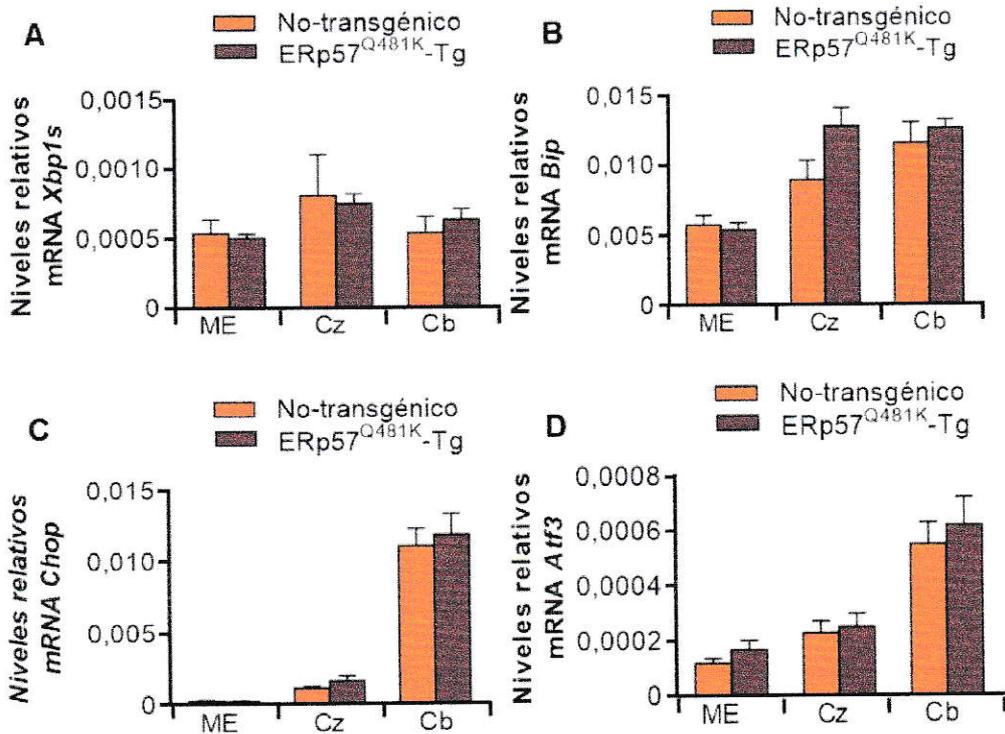
En conjunto, estos resultados indicaron que la mutación D217N en ERp57 en el SNC producen problemas motores en ratones, posiblemente debido a alteraciones en la fisiología muscular resultado de una disrupción de las UNM. Mientras tanto, el bajo desempeño motor encontrado en ratones con la mutación Q481K en ERp57 no estaría relacionado con alteraciones en la fisiología muscular, ya que no presentaron diferencias con sus controles.

#### **7.5. Evaluación de la activación de la UPR en el SNC en los modelos murinos que sobreexpresan las formas mutantes de ERp57.**

Para estudiar la posible generación de estrés de RE y la activación de la respuesta de proteínas mal plegadas en los ratones que sobreexpresan las formas mutantes de ERp57 D217N y Q481K, se evaluó los niveles de expresión de algunos de los marcadores de esta vía de señalización mediante qPCR y mediante análisis de Western blot, en muestras provenientes de médula espinal, corteza y cerebelo. En las Figuras 25 y 26 se muestran las cuantificaciones de los niveles de expresión de mRNA obtenidos en los tres tejidos analizados mediante qPCR y normalizados con respecto a *actina* y con respecto a cada uno de los tejidos provenientes de animales no-transgénico. Los marcadores de la UPR analizados corresponden a *Xbp1s* (Figura 25A y 26A), *Bip* (Figura 25B y 26B) y *Chop* (Figura 25C y 26C) para las colonias ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup> respectivamente. También se analizó los niveles de *Atf3* (Figura 25D y 26D), marcador general de estrés, que se utilizó como un parámetro adicional para el estudio de estos modelos. No se observó una activación de la UPR al analizar los resultados de los marcadores estudiados en los tres tejidos estudiados. Solamente se observó tendencias de aumento de los mRNAs de *BiP* y *Chop* en la



**Figura 25. Niveles de mRNA de marcadores de estrés de RE en ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> en el SNC.** Los niveles de relativos de expresión de mRNAs de marcadores de estrés celular de los tejidos del SNC de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> se analizaron mediante qPCR. Se registraron los niveles de *Xbp1s* (A), *Bip* (B), *Chop* (C) y *Atf3* (D). Se normalizo con respecto a los niveles de mRNA de *actina*. Los tejidos analizados corresponden a médula espinal (ME), corteza (Cz) y cerebelo (Cb). Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de (n = 3) para ERp57 no-transgénico y (n = 4) para ERp57<sup>D217N</sup>-Tg. (*p* value: no significativa (n.s) *p* > 0,05; comparado con ratones no-transgénicos, prueba *t* de Student).



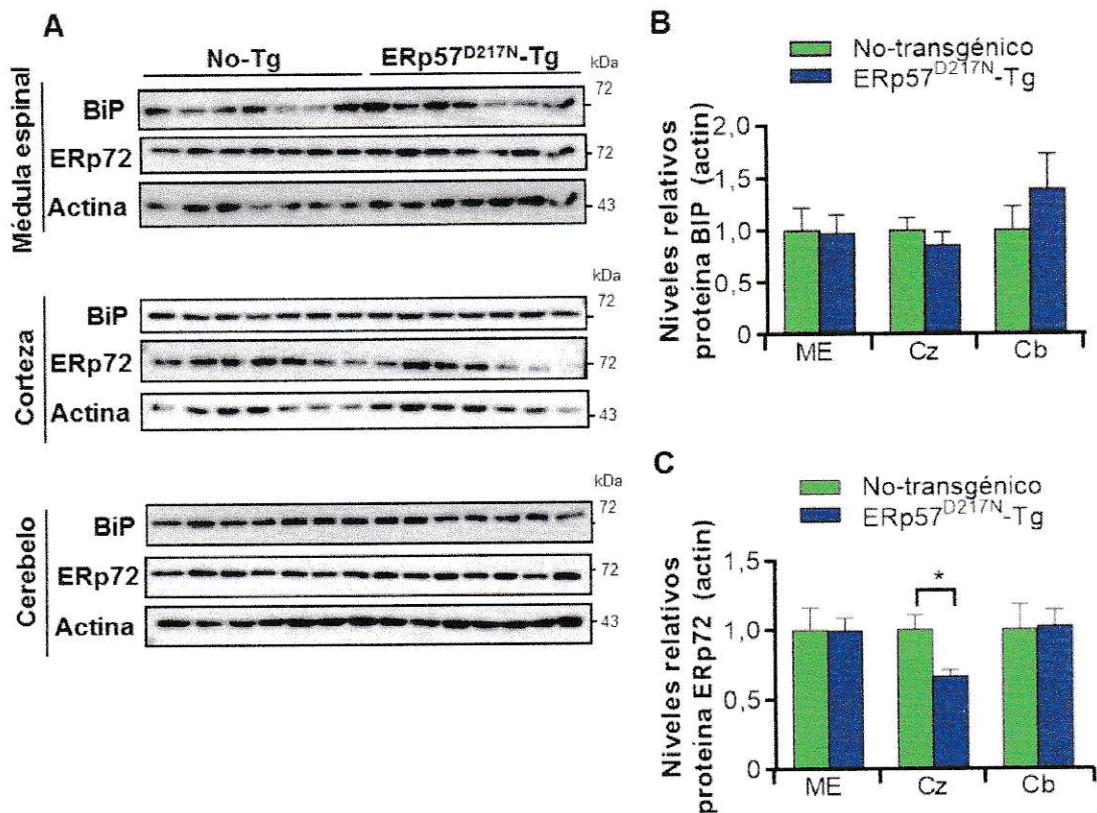
**Figura 26. Niveles de mRNA de marcadores de estrés de RE en ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> en el SNC.** Los niveles de sobreexpresión de mRNA de marcadores de estrés celular de los tejidos del SNC de ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> se analizaron mediante qPCR. Se registraron los niveles de *Xbp1s* (A), *Bip* (B), *Chop* (C) y *Atf3* (D). Se cuantificó con respecto a los niveles de mRNA de *actina*. Los tejidos analizados corresponden a médula espinal (ME), corteza (Cz) y cerebelo (Cb). Se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de (n = 3) para ERp57 no-transgénico y (n = 4) para ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. (p value: no significativa (n.s)  $p > 0,05$ ; comparado con ratones no-transgénicos, prueba *t* de Student).

médula espinal de los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y en la corteza de los ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg.

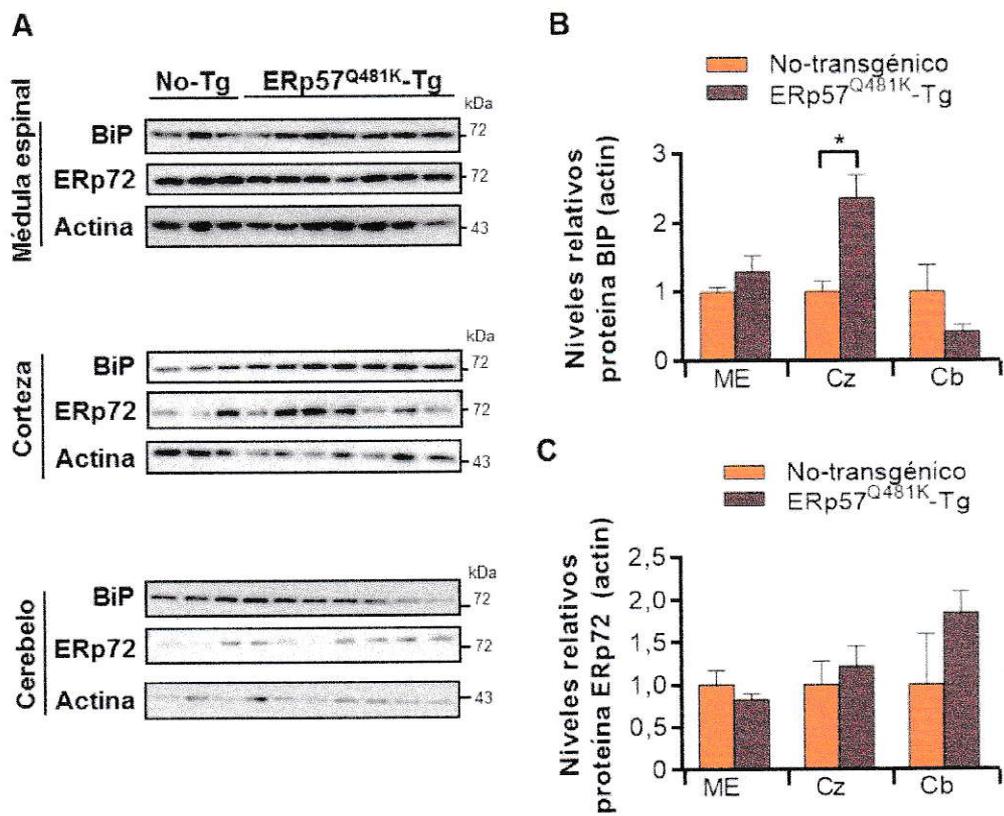
Adicionalmente, se analizaron los niveles de expresión proteica en médula espinal, corteza y cerebelo de dos chaperonas del RE: BiP y ERp72, las cuales pertenece a la familia de las PDI. Esto se realizó mediante el análisis de Western blot en tejidos provenientes del sistema nervioso central y que se muestran en la Figura 27A para la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y en la Figura 28A para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>. Se realizó cuantificaciones de los niveles de expresión de estas proteínas obtenidos mediante Western blot y se normalizaron con respecto a actina y a cada tejido proveniente desde animales no-transgénicos para las colonia ERp57<sup>D217N</sup> (Figura 27B y 28C) y ERp57<sup>Q481K</sup> (Figura 27B y 28C).

En el caso de los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg, no se observaron grandes variaciones en los niveles de las chaperonas analizadas en los diferentes tejidos. Solamente se registró una disminución significativa de ERp72 en la corteza y un leve aumento de BiP en el cerebelo. Para los ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, BiP aumentó levemente sus niveles en la médula espinal y significativamente en la corteza, mientras que disminuyó levemente en el cerebelo. El aumento de BiP en corteza se correlaciona con los resultados obtenidos en la Figura 26B para los niveles de mRNA de *Bip* en este mismo tejido. En el caso de ERp72, esta disminuyó levemente en la médula espinal y aumentó en la corteza y en el cerebelo.





**Figura 27. Análisis de Western blot de chaperonas del RE en los tejidos del SNC de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup>.** Los niveles de proteína de las chaperonas del RE BiP y ERp72 de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> se analizaron mediante Western blot. **(A)** Se analizaron los tejidos médula espinal (ME) (panel superior), corteza (Cz) (panel intermedio) y cerebelo (Cb) (panel inferior) del sistema nervioso central. **(B y C)** Cuantificación de los niveles de BiP y ERp72 respectivamente. La cuantificación se realizó con respecto al control de carga actina. Se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de (n = 7) para ERp57 no-transgénicos y (n = 7) para ERp57<sup>D217N</sup>-Tg. ( $p$  value: \*,  $p < 0,05$ ; comparado con ratones no-transgénicos, prueba  $t$  de Student).



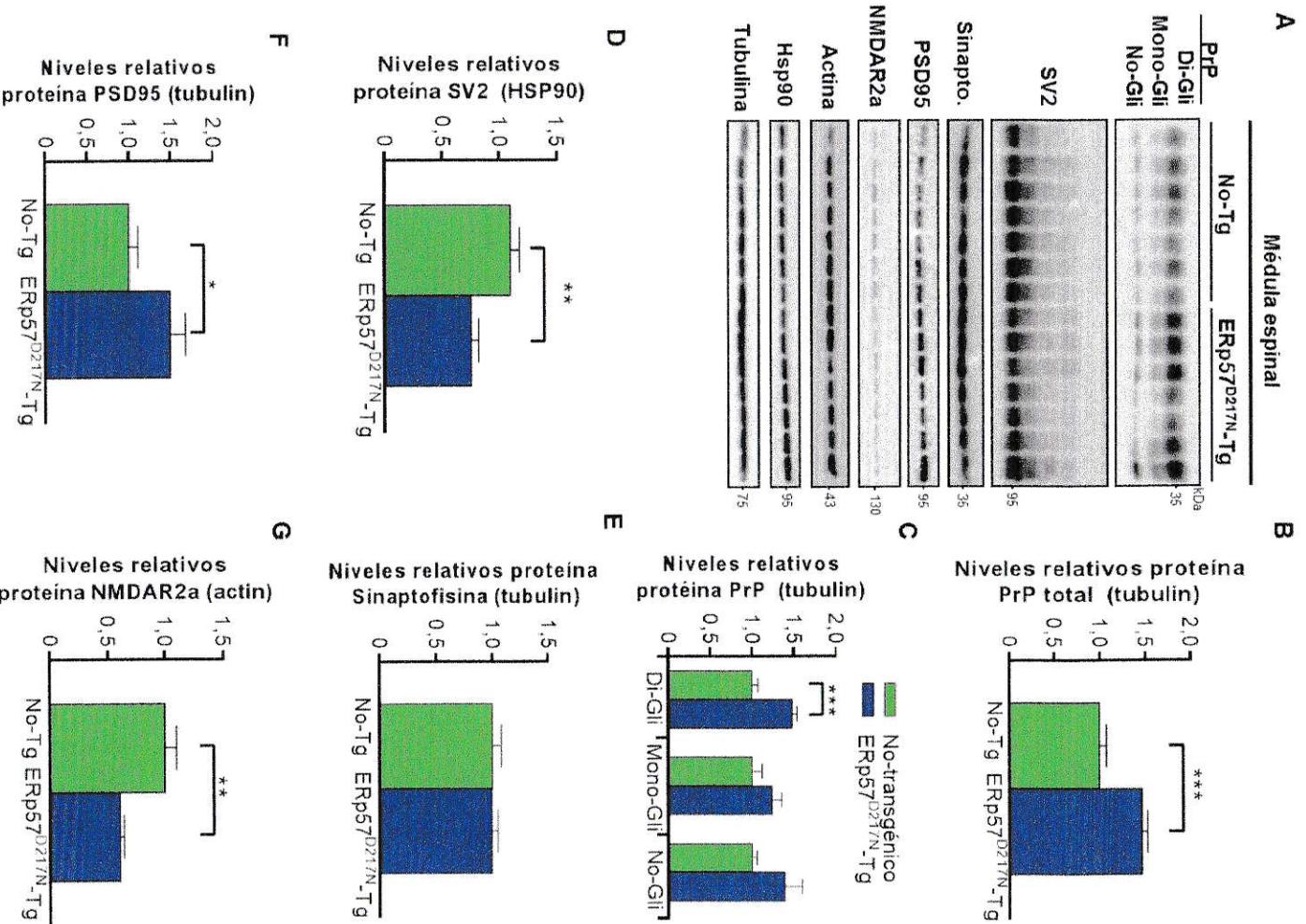
**Figura 28. Análisis de Western blot de chaperonas del RE en los tejidos del SNC de ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>.** Los niveles de proteínas de las chaperonas del RE BiP y ERp72 de ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> se analizaron mediante Western blot. **(A)** Se analizaron los tejidos médula espinal (ME) (panel superior), corteza (Cz) (panel intermedio) y cerebelo (Cb) (panel inferior) del sistema nervioso central. **(B y C)** Cuantificación de los niveles de BiP y ERp72 respectivamente. La cuantificación se realizó con respecto al control de carga actina. Se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de (n = 3) para ERp57 no-transgénicos y (n = 7) para ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. (p value: \*, p < 0,05; comparado con ratones no-transgénicos, prueba t de Student).

## **7.6. Determinación del posible efecto de la sobreexpresión de las formas mutantes de ERp57 sobre proteínas sinápticas.**

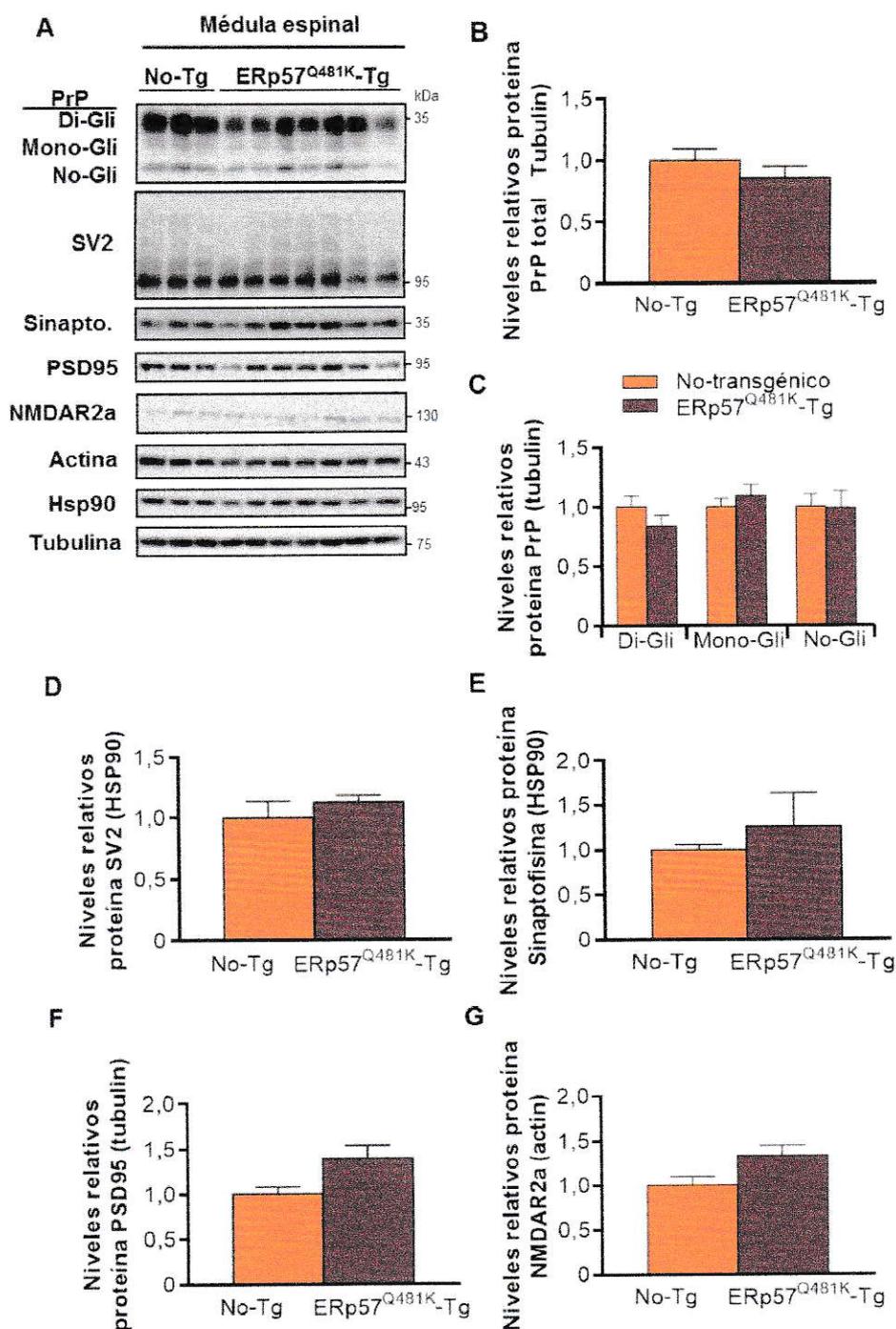
Las proteínas sinápticas cumplen un rol en la mantención de la estabilidad e integridad de la UNM (Moloney y col., 2014). Recientes investigaciones han mostrado que ERp57 estaría catalizando el plegamiento de proteínas sinápticas (Almeida y col., 2011; Torres y col., 2015), junto con el estudio de Woehlbier y col., 2015, donde se determinó que los ratones KO condicionales de ERp57 en el SNC presentaron alteraciones en el perfil de proteínas sinápticas. De esta forma, debido a que los ratones que sobreexpresan formas mutantes de ERp57 presentan aparatos sinápticos anormales en las uniones neuromusculares del diafragma, se analizó mediante Western blot la expresión de un conjunto de proteínas sinápticas que son sustratos putativos de la chaperona ERp57 en tejido de médula espinal, corteza y cerebelo.

Las proteínas analizadas fueron la proteína de Prion (PrP) la cual se puede encontrar de forma di-glicosilada, mono-glicosilada y no-glicosilada, Glicoproteína de vesícula sináptica 2 (SV2), sinaptofisina, proteína de densidad post-sináptica 95 (PSD95) y el receptor de NMDA 2a (NMDAR2a). Las Figuras 29A, 31A y 33A correspondientes a la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y las Figuras 30A, 32A, 34A correspondientes a la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> muestran los niveles de proteínas sinápticas en médula espinal, corteza y cerebelo respectivamente.

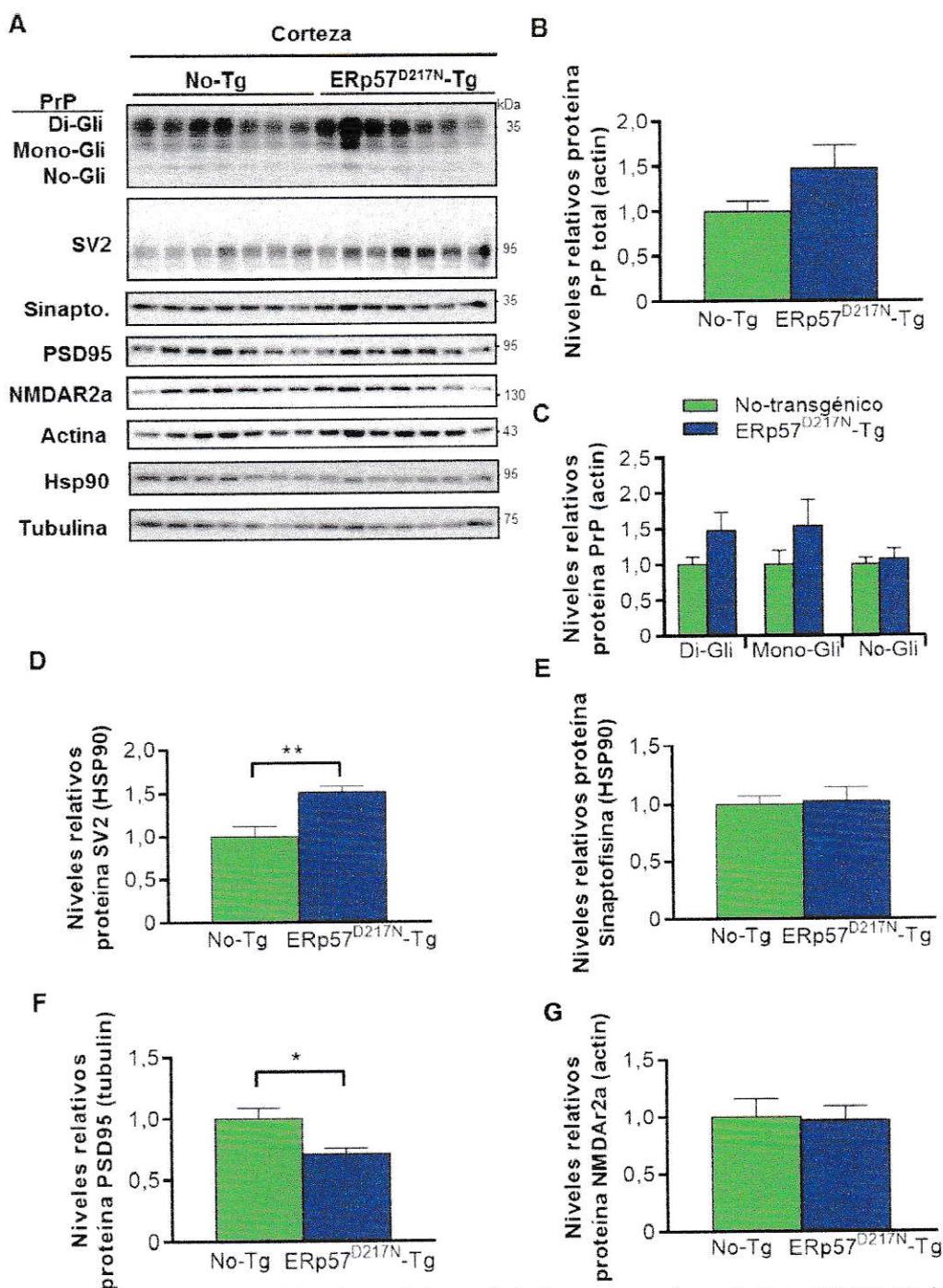
Se realizaron cuantificaciones de los niveles de expresión de proteína obtenidos mediante Western blot y normalizados con respecto a actina, HSP90 o tubulina y a cada tejido proveniente de animales no-transgénicos para las colonias ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q418K</sup>. Las cuantificaciones de las proteínas sinápticas de médula espinal se muestran en la Figura 29B-G para la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y la Figura 30B-G para la



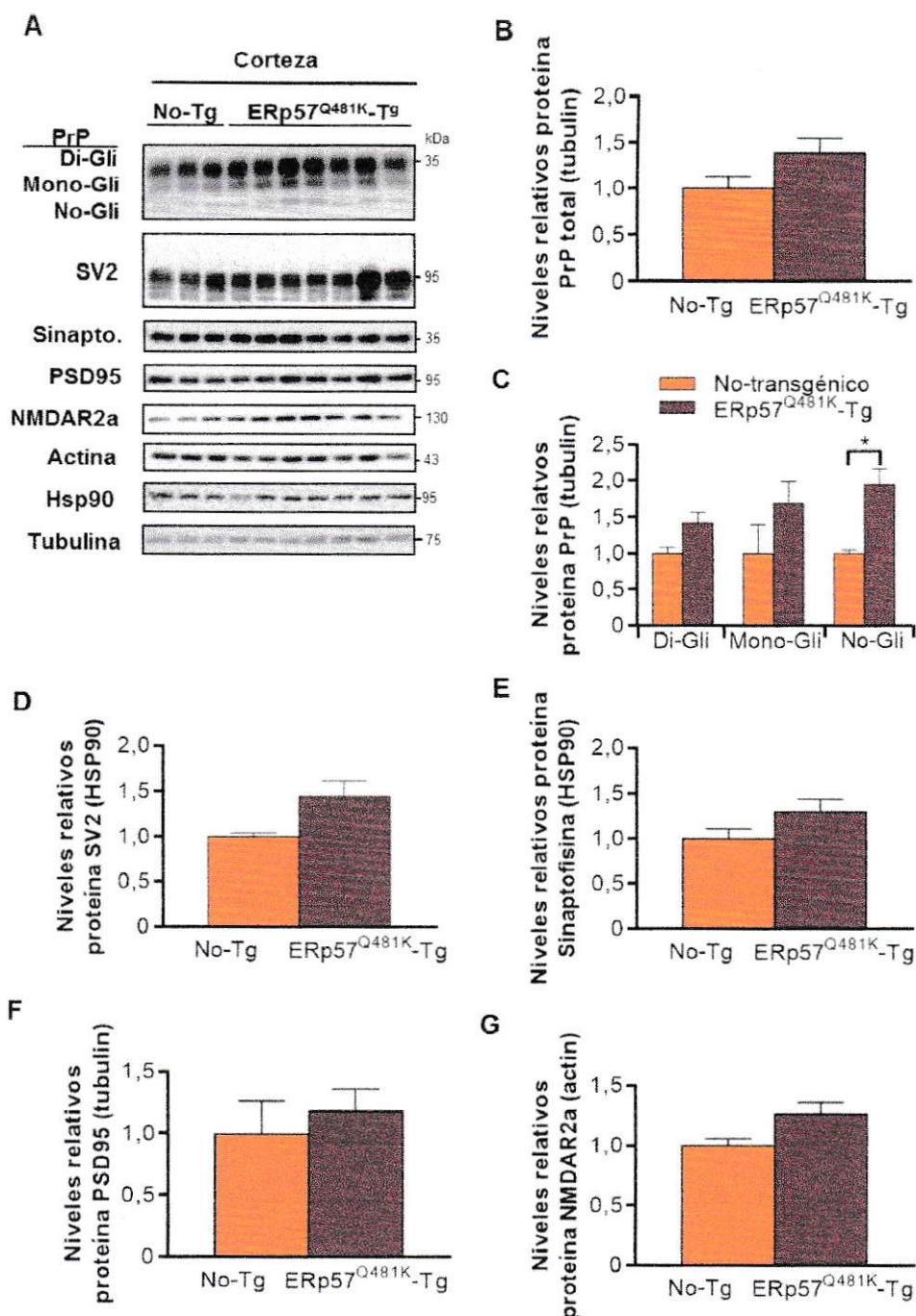
**Figura 29. Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de médula espinal de los ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup>.** (A) Los niveles de proteínas sinápticas de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> se analizaron mediante Western blot. Se analizaron los niveles de PrP total (B) y las formas glicosiladas (C), SV2 (D), Sinaptofisina (E), PSD95 (F) y NMDAR2a (G) en médula espinal. Las cuantificaciones se realizaron con respecto al control de carga de actina, HSP90 o tubulina. Las cuantificaciones se presentan como promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de ( $n = 7$ ) para ERp57 no-Tg y ( $n = 7$ ) para ERp57<sup>D217N</sup>-Tg. ( $p$  value: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; comparado con ratones no-transgénicos, prueba  $t$  de Student).



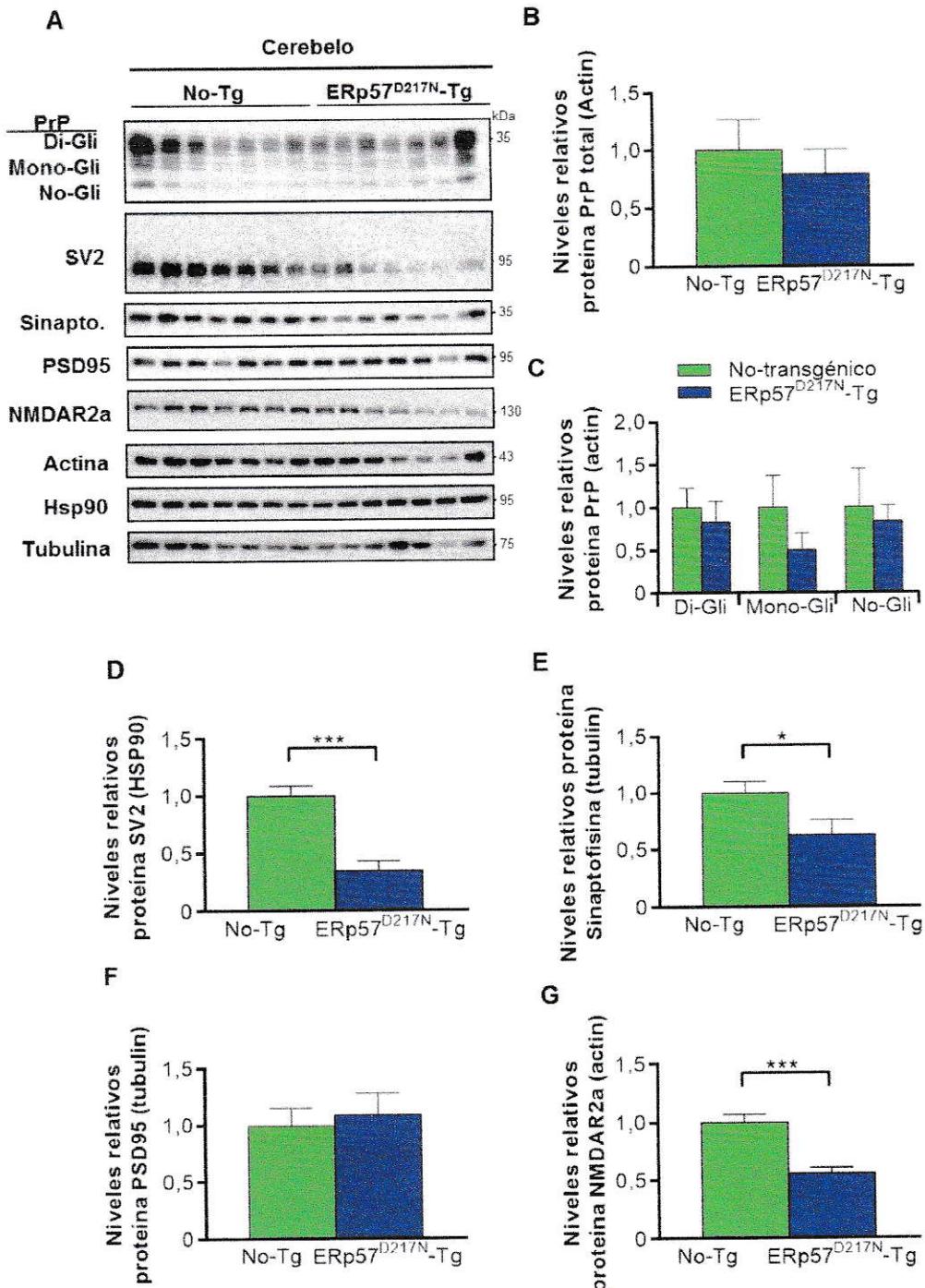
**Figura 30. Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de médula espinal de los ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>.** (A) Los niveles de proteínas sinápticas de ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> se analizaron mediante Western blot. Se analizaron los niveles de PrP total (B) y las formas glicosiladas (C), SV2 (D), Sinaptofina (Sinapto.) (E), PSD95 (F) y NMDAR2a (G) en médula espinal. La cuantificación se realizó con respecto al control de carga actina, HSP90 o tubulina. Las cuantificaciones se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de (n = 3) para ERp57 no-transgénicos y (n = 7) para ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. (p value: no significativa (n.s),  $p > 0,05$ ; comparado con ratones no-transgénicos, prueba *t* de Student).



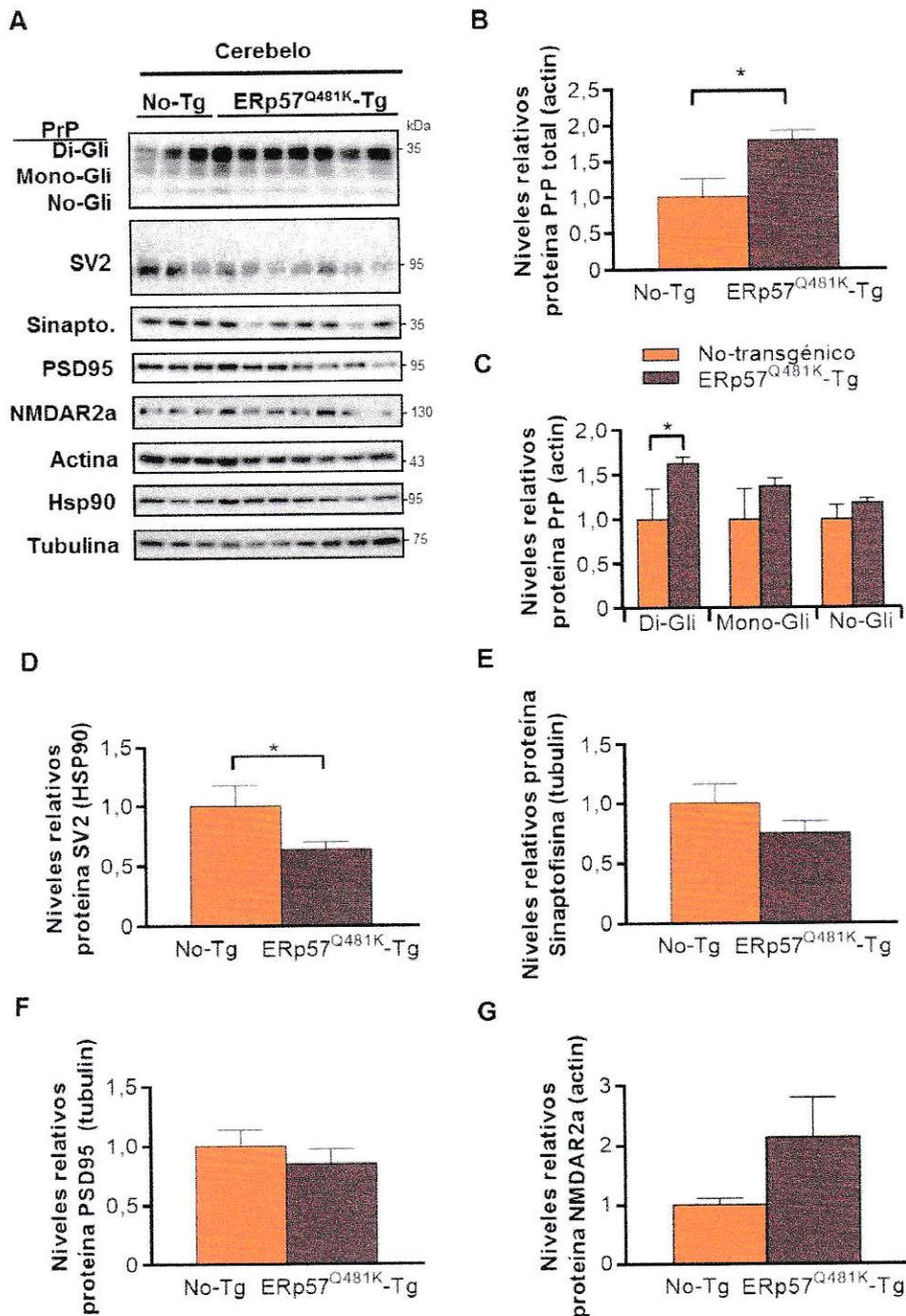
**Figura 31. Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de corteza de los ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup>.** (A) Los niveles de proteínas sinápticas de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> se analizaron mediante Western blot. Se analizaron los niveles de PrP total (B) y las formas glicosiladas (C), SV2 (D), Sinaptofisina (Sinapto.) (E), PSD95 (F) y NMDAR2a (G) en corteza. La cuantificación se realizó con respecto al control de carga actina, HSP90 o tubulina. Las cuantificaciones se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de ( $n = 7$ ) para ERp57 no-transgénicos y ( $n = 7$ ) para ERp57<sup>D217N</sup>-Tg. ( $p$  value: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; comparado con ratones no-transgénicos (No-Tg), prueba  $t$  de Student).



**Figura 32. Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de corteza de los ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>.** (A) Los niveles de proteínas sinápticas de ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> se analizaron mediante Western blot. Se analizaron los niveles de PrP total (B) y las formas glicosiladas (C), SV2 (D), Sinaptofisina (Sinapto.) (E), PSD95 (F) y NMDAR2a (G) en corteza. La cuantificación se realizó con respecto al control de carga actina, HSP90 o tubulina. Las cuantificaciones se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de (n = 3) para ERp57 no-transgénicos y (n = 7) para ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. (*p* value: no significativa (n.s); comparado con ratones no-transgénicos (No-Tg), prueba *t* de Student).



**Figura 33. Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de cerebelo de los ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup>.** (A) Los niveles de proteínas sinápticas de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> se analizaron mediante Western blot. Se analizaron los niveles de PrP total (B) y las formas glicosiladas (C), SV2 (D), Sinaptofisina (Sinapto.) (E), PSD95 (F) y NMDAR2a (G) en cerebelo. La cuantificación se realizó con respecto al control de carga actina, HSP90 o tubulina. Las cuantificaciones se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de (n = 7) para ERp57 no-transgénicos y (n = 7) para ERp57<sup>D217N</sup>-Tg. (*p* value: \*, *p* < 0.05; \*\*\*, *p* < 0.001; comparado con ratones no-transgénicos (No-Tg), prueba *t* de Student).



**Figura 34. Análisis de Western blot de proteínas sinápticas de cerebelo de los ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>.** (A) Los niveles de proteínas sinápticas de ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> se analizaron mediante Western blot. Se analizaron los niveles de PrP total (B) y las formas glicosiladas (C), SV2 (D), Sinaptofisina (Sinapto.) (E), PSD95 (F) y NMDAR2a (G) en cerebelo. La cuantificación se realizó con respecto al control de carga actina, HSP90 o tubulina. Las cuantificaciones se presentan como el promedio ± el error estándar del promedio de (n = 3) para ERp57 no-transgénicos y (n = 7) para ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. (p value: no significativa (n.s); comparado con ratones no-transgénicos (No-Tg), prueba t de Student).

colonia ERp57<sup>Q481K</sup>. Las cuantificaciones de las proteínas sinápticas de corteza se muestran en la Figura 31B-G para la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y la Figura 32B-G para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>. Las cuantificaciones de las proteínas sinápticas de cerebelo se muestran en la Figura 33B-G para la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y la Figura 34B-G para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>.

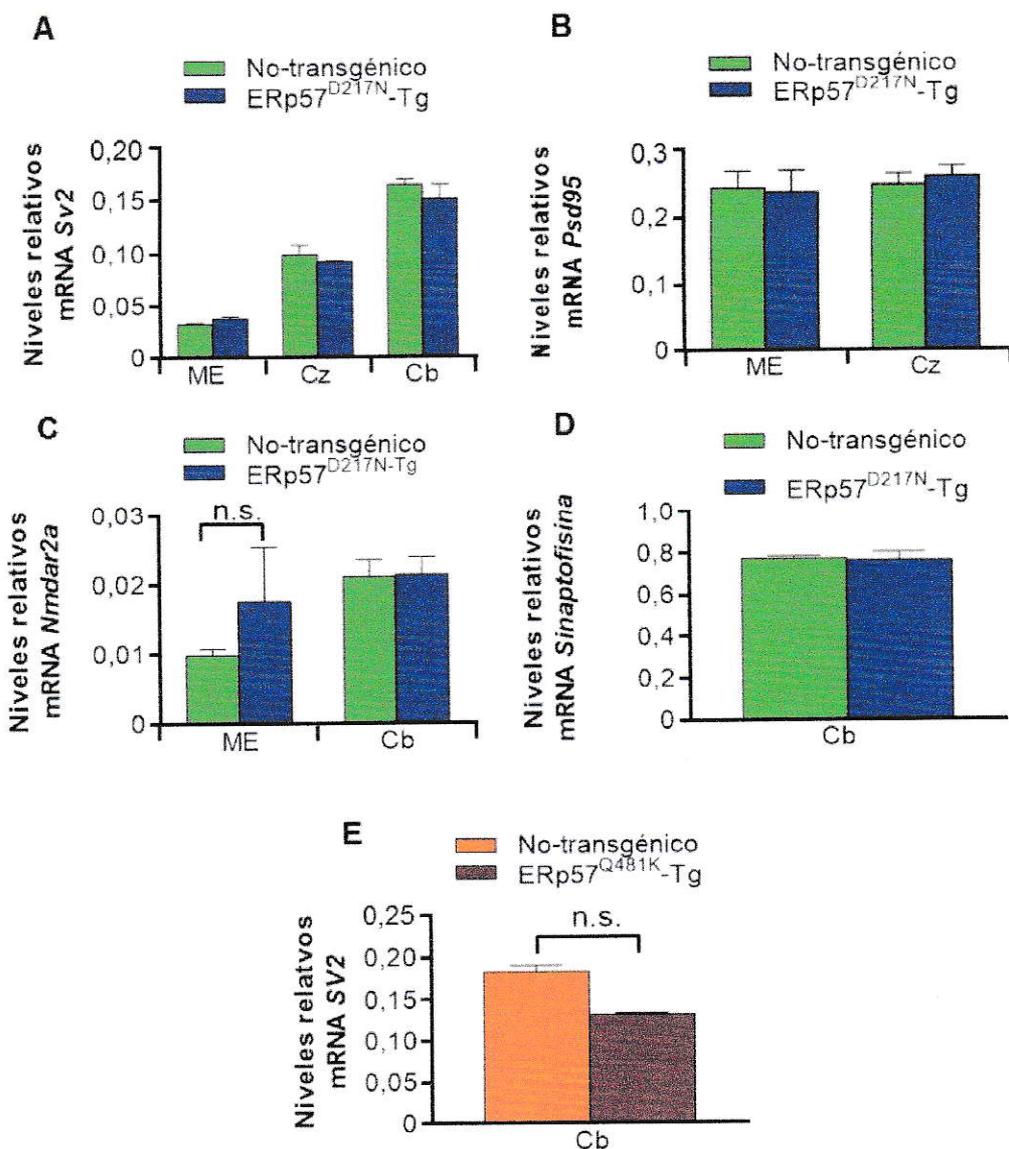
Para ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg, se observó alteraciones en los niveles de la mayoría de las proteínas estudiadas en médula espinal, donde aumentan los niveles de PrP total, PrP di-glicosilado y PSD95, mientras que disminuyen los niveles de NMDAR2a y SV2. En la corteza cerebral, se mantuvieron constantes los niveles, con excepción de una disminución de PSD95 y un aumento de SV2, mientras que en cerebelo hubo tendencia en la disminución de todas las proteínas, siendo mayor en SV2, sinaptofisina y NMDAR2a.

Para ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, en médula espinal se mantuvieron relativamente constantes los niveles de proteínas, en corteza existió tendencias del aumento de todas las formas de PrP y SV2, mientras que en cerebelo se encontró aumentado las formas de PrP total y di-glicosilada y disminuyó SV2. Los resultados obtenidos con las mutaciones D217N y Q481K en ERp57 mostraron que existen alteraciones en el perfil de los niveles de estas proteínas sinápticas en los diferentes tejidos analizados, siendo mayor para el caso de la mutante D217N.

Debido a que se encontró un perfil de proteínas sinápticas alterado en los diferentes tejidos del SNC de los ratones mutantes de ERp57, se analizaron los niveles de mRNA de cada proteína con diferencias significativas, con respecto a sus hermanos

de camada no-transgénicos, para determinar si la alteración ocurre a nivel de transcrito o de proteínas.

La Figura 35 muestra los niveles de mRNA cuantificados con respecto a *actina*. Para la colonia ERp57<sup>D217N</sup> los niveles de transcrito de *Sv2* no variaron en médula espinal, corteza o cerebelo (Figura 35A), *Psd95* no varió en médula espinal y corteza (Figura 35B), *Nmdar2a* no varió en médula espinal y cerebelo (Figura 35C) y *Sinaptofisina* no varió en cerebelo (Figura 35D). Para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>, los niveles de mRNA de *SV2* no variaron en el cerebelo (Figura 35E). De esta forma, las diferencias en el perfil de proteínas sinápticas encontradas en los tejidos del SNC ocurren a nivel de proteína y no de mRNA. Debido a que ERp57 cataliza el plegamiento de un subconjunto de glicoproteínas (Rutkevich y col., 2010; Almeida y col., 2011), las mutaciones en ERp57 podrían estar afectando el correcto plegamiento de sustratos, alterando el perfil global de proteínas sinápticas en el SNC.



**Figura 35. Niveles de mRNA de proteínas sinápticas en ratones ERp57 mutantes en el SNC.** Los niveles de sobreexpresión de mRNA de proteínas sinápticas de los tejidos del SNC de ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y ERp57<sup>Q481K</sup> se analizaron mediante qPCR. Se analizaron los niveles de Sv2 (A), Psd95 (B), Nmdar2a (C) y Sinaptofisina (D) para la colonia ERp57<sup>D217N</sup> y Sv2 (E) para la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>. Se cuantificó con respecto a los niveles de mRNA de *actina*. Los tejidos analizados corresponden a médula espinal (ME), corteza (Cz) y cerebelo (Cb). Se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de ( $n = 3$ ) para ERp57 no-transgénico y ( $n = 3$ ) para ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. ( $p$  value: no significativa (n.s.)  $p > 0,05$ ; comparado con ratones no-transgénicos, prueba  $t$  de Student).

## 8. DISCUSIÓN.

ERp57 es una chaperona y foldasa residente del RE que participa en el ciclo de plegamiento de proteínas de CNX/CRT. El mal plegamiento de proteínas y la formación de agregados tóxicos están involucrados en la etiología de un gran número de enfermedades neurodegenerativas como la EA, la EP y la ELA. Múltiples evidencias sugieren que las PDI juegan un rol importante en atenuar el estrés de RE y la agregación de proteínas mutantes (Andreu y col., 2012). Así es, que las PDI son consideradas como blancos de investigación por su posible modulación y neuroprotección en desordenes relacionados a proteínas mal plegadas.

En este Seminario de título se caracterizaron dos nuevos modelos de ratones transgénicos, que sobreexpresan las formas mutantes de ERp57 D217N y Q481K asociadas a la ELA en el SNC. Estos ratones desarrollaron deterioro motor, alteraciones en las UNM y fisiología muscular, siendo más agresivo en el caso de la mutación D217N en ERp57. Estos fenotipos son generados probablemente por una alteración en el perfil de proteínas sinápticas y alteraciones el plegamiento de posibles sustratos de ERp57.

### **8.1. Modelos transgénicos que sobreexpresan formas mutantes de ERp57 D217N y Q481K.**

Los modelos murinos caracterizados sobreexpresan las formas mutantes de ERp57 en el SNC con un marcador FLAG-tag en su extremo C-terminal. El promotor utilizado es de la proteína prion murina, que se expresa en altos niveles y de forma ubicua en tejidos nerviosos desde edades embrionarias tempranas y continúa durante toda la vida (Borchelt y col., 1996; Ford y col., 2002; Linden y col., 2008). Este promotor ha

sido ampliamente usado para dirigir la expresión de genes específicamente en el cerebro y la médula espinal en animales transgénicos (Waldron-Roby y col., 2012).

Cabe destacar que para analizar las colonias de ERp57 mutantes, es importante realizar comparaciones con el modelo murino de ganancia de función de ERp57<sup>WT</sup> en el SNC, la cual fue descrita por Castillo y col., 2015, para determinar que el fenotipo encontrado se debe a la mutación presente en ERp57 y no a la presencia de ERp57 *per se*. De esta forma, se realizaron observaciones visuales de ambas colonias mutantes y no se encontraron diferencia entre los animales transgénicos y sus hermanos de camada no-transgénicos, lo que se comparte en el caso de las colonias ERp57<sup>WT</sup> (Castillo y col., 2015). De esta forma, no se encuentran fenotipos causados por las mutaciones en ERp57 a simple vista.

Análisis bioquímico mediante qPCR y Western blot determinó que los ratones de la colonia ERp57<sup>D217N</sup> tienen bajos niveles de sobreexpresión, lo cual podría deberse a un bajo de numero de inserción de copias del transgen, mientras que los ratones de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> tienen alto niveles de sobreexpresión, lo cual podría deberse a un mayor número de inserción de copias del transgen. Modelos transgénicos con bajos niveles de expresión están relacionados con niveles semejantes a los rangos fisiológicos y recapitularían la patogénesis de forma similar a los pacientes, pero con fenotipos menos agresivos. En cambio, altos niveles de sobreexpresión, como los encontrados en la colonia Q481K están asociados a fenotipos más agresivos (Alexander y col., 2004). Cabe destacar que la colonia de ratones ERp57<sup>D217N</sup> desarrolló características más agresivas y presentó los niveles de sobreexpresión más bajos, lo que sugiere que la mutación D217N en ERp57 genera fenotipos más adversos en el modelo

Un grupo experimental de ambas colonias mutantes se dejó envejecer hasta los 15-18 meses de vida, con el objetivo de visualizar la posible aparición de fenotipos característicos de la ELA como la curvatura de la columna, parálisis de extremidades posteriores, dificultad de desplazamiento y parálisis completa, como se describen en diferentes modelos murinos de ELA<sup>f</sup> que sobreexpresan formas mutantes de SOD1 (Gurney y col., 1994; Ripps y col., 1995). Ninguna de las colonias estudiadas presentó fenotipos tipo ELA a lo largo de su envejecimiento, lo que podría deberse a diferentes factores, como el hecho que las mutantes simplemente no provocan el fenotipo por compensaciones de ERp57 endógena, provocan un fenotipo más sutil o que lo provoquen en etapas más avanzadas de vida. Un estudio reciente mostró el efecto que posee el *knockin* de una forma mutante de BiP en un modelo murino (Jin y col., 2014), donde se obtuvo ratones que presentaron fenotipos patogénicos en etapas avanzadas de su vida, presentándose a los 21 meses, lo que muestran que fenotipos patológicos podrían aparecer más adelante.

La medición del peso corporal en la colonia ERp57<sup>D217N</sup> mostró una distribución común de peso a lo largo de los registros, donde los machos pesaron más que las hembras. Para el caso de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>, se observó que los machos no-transgénicos presentaron levemente más peso que las hembras, pero los machos transgénicos presentaron en promedio 35% más peso que el resto de los grupos, lo que podría deberse a la mutación confiere un aumento de peso por sobre el resto de los ratones. Se ha descrito que el estrés de RE y la vía de la UPR en hipotálamo poseen un rol en la señalización de leptina, una hormona proteica que regula el apetito y crecimiento (Ozcan y col., 2009), la cual podría estar afectada por la mutación Q481K. De esta forma, se han mostrado ERp57 y leptina podrían interactuar para la

mantención de la homeostasis energética de las células (Bravo y col., 2011), por lo que la mutación Q481K en ERp57 podría explicar un aumento en el peso corporal por cambios en la regulación de leptina. También existe la posibilidad de que los ratones machos no-transgénicos desarrollaran menores pesos corporales, lo cual podría deberse a problemas específicos en la camada obtenida para la realización de este estudio.

### **8.2. Problemas motores encontrados en los modelos animales generados.**

Para estudiar el desempeño motor presente en ambas colonias, se realizó la prueba motora *Wire Hang test*, con el fin de observar si desarrollan problemas motores y de coordinación. Cabe destacar que los ratones que sobreexpresan la forma ERp57<sup>WT</sup> no presentan diferencias con sus hermanos de camada no-transgénicos en esta prueba motora (Castillo y col., 2015), lo que sugiere que no desarrollan problemas motores.

Los ratones machos ERp57<sup>D217N</sup>-Tg presentan un peor desempeño motor desde el inicio del tiempo de análisis, el que se mantuvo por todo el periodo de registro comparándolos con los otros 3 grupos experimentales. Los problemas motores durante los dos últimos meses de registros llegan a ser significativas. Esto sugiere que la mutación D217N produce efectos negativos, los que se traducen en problemas motores o de coordinación en los machos transgénicos al menos a partir de los 117 días de vida (inicio de registros). El fenotipo observado en esta colonia es similar al encontrado en los ratones KO condicionales de ERp57 en el SNC, ya que desde el principio de los registros, presentan deterioro motor (Woehlbier y col., 2015). También cabe destacar que en el caso de ERp57<sup>D217N</sup>, existe un sitio de N-glicosilación artificial generado por el PNS, lo que se ha descrito que ocurre en diferentes enfermedades,

donde mutaciones en genes patogénicos generan proteínas glicosiladas, las cuales son necesarias y suficientes para generar un impacto negativo (Vogt y col., 2007). Esto podría explicar el peor desempeño motor encontrado en esta colonia desde etapas tempranas, donde la presencia del sitio de N-glicosilación podría generar ganancia o pérdida de función de la chaperona debido al N-glicano presente en ERp57 (Vogt y col., 2007).

En el caso de la colonia ERp57<sup>Q481K</sup>, los registros comenzaron similares para todos los animales, pero a partir de los 180 días de vida, los machos transgénicos comenzaron a disminuir su desempeño motor, llegando a valores mínimos. Este resultado muestra que existe un empeoramiento progresivo del desempeño motor en los machos ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg el cual es significativo en el último mes de registro, esto podría deberse a procesos acumulativos y degenerativos causados por la mutación Q481K. Este tipo de curva con una disminución de desempeño motor es común para modelos de la ELAf, como por ejemplo los ratones que sobreexpresan SOD1 mutante (Gurney y col., 1994; Ripps y col., 1995) y TDP-43 mutante (Wegorzewska y col., 2009), donde además se observa una disminución del peso corporal y una parálisis progresiva. Otra explicación puede deberse a que los machos transgénicos pesan más, por lo que el peor desempeño motor podría estar relacionado con la incapacidad de soportar su propio peso corporal en la prueba del "Wire Hang test".

En ambas colonias, se observó que los ratones machos transgénicos son lo que presentan mayores problemas motores y debido a que no existe diferencias en la expresión de ERp57 entre sexos, estas observaciones podrían ser atribuidas 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 la ELA en mujeres, y se ha propuesto que esto puede deberse a un posible efecto protector de las hormonas reproductivas femeninas (De Jong y col., 2013), dándole de esta forma un carácter multifactorial a la fisiopatología de la ELA.

En el estudio realizado por Woehlbier y col., 2015, se sugieren que las formas mutantes de ERp57 generan efectos adversos en la conectividad neuromuscular y extensión de neuritas, demostrado en diferentes líneas de cultivos celulares *in vitro* y en modelos *in vivo* de pez cebra. De esta forma, con el fin de evaluar si el impedimento motor generado por las mutaciones en ERp57 era debido a problemas en la innervación muscular, se realizó electromiografía (EMG). Tanto los ratones Erp57<sup>D217N</sup>-Tg como los no-transgénicos no presentaron actividad espontánea en la EMG, lo cual si se observó en los controles positivos ratones transgénicos sintomáticos SOD1<sup>G93A</sup>. Esto puede deberse a que la carga de UNM maduras tipo “pretzel” que presentaron los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg, aunque menor que las presentes en animales no-transgénicos, logra mantener el normal funcionamiento electrofisiológico de las motoneuronas.

En la colonia ERp57<sup>Q481K</sup> también se analizó la EMG y se encontró que sin importar el genotipo, presentaban músculos sin actividad espontánea, con fibrilaciones aisladas y con fibrilaciones asociadas. Esto sugiere que existen problemas de innervación y funcionalidad en ratones no-transgénicos y ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. Debido a que la actividad espontánea no distingue entre genotipos, la expresión de la forma mutante de ERp57 no sería la causa del fenotipo. Estos ratones fueron analizados a los 400 días de vida, por lo que se propone que la actividad espontánea sería debido a eventos de envejecimientos. Con el envejecimiento, existe deterioro de la actividad muscular y coordinación, lo que resulta en la aparición de actividad espontánea en los músculos

(Laursen y col., 2001; Polotsky y col., 2011; Wimmer y col., 2013). De esta forma, la mutación Q481K en ERp57 no tendría efecto sobre la funcionalidad de la actividad motora.

Cabe destacar que la realización de EMG en ratones KO de ERp57 en el SNC también presentaron actividad espontánea y también fenotipos motores más agresivos que los observados en ratones ERp57 mutantes (Woehlbier y col. 2015). La actividad espontánea en EMG es un indicador de pérdida de inervación muscular, lo cual es comúnmente observado en pacientes con ELA (Inghilleri y Iacovelli, 2011) y en modelos transgénicos que desarrollan fenotipos tipo ELA (Wegorzewska y col., 2009), lo que sugiere que la UNM de los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg son funcionales.

La pérdida de la sinapsis neuromuscular es uno de los primeros signos de la ELA, la cual conlleva a la pérdida del control muscular progresivo (Inghilleri y Iacovelli, 2011) y a denominar a esta enfermedad como una axonopatía distal, donde la patología de la motoneurona comienza en la sinapsis muscular y procede en un patrón de degeneración retrograda hacia el soma (*“dying back”*, en inglés). Debido al bajo desempeño motor encontrado en ratones de ambas colonias, se analizaron extensivamente las UNM del diafragma, uno de los músculos relevantes que pierden inervación durante el curso de la ELA (Perez-garcia y Burden, 2012; Dupuis y Loeffler, 2009; Liu y col., 2013). El análisis de la distribución de las UNM de los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg reveló un ancho de banda más angosto de *“clusters”* de AChR en el diafragma y cerca de un 50% menos números totales de *“clusters”*, lo que se ha reportado como consecuencia de problemas en la maduración y mantención de las UNM (Caillol y col., 2012; Okada y col., 2006). Mientras tanto, en los ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg no se encontraron diferencias en el ancho de banda de *“clusters”* de

AChR, comparándolo con ratones controles, pero sí se encontró un menor número total de “clusters”. Aunque la diferencia es significativa, corresponde solamente a una disminución de cerca de un 10% en el número total de “clusters”.

La conformación de las UNM de los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg también se vio afectada, ya que la innervación por parte de los aparatos pre-sinápticos presentan hinchazón axonal, un fenotipo característico de ratones envejecidos y también presentes en modelos murinos de la ELA, lo que se ha descrito como la retracción del terminal axonal (Valdez y col., 2012). En los ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg también se encontraron niveles elevados de hinchazón axonal, comparándolos con sus hermanos de camada no-transgénicos. Esto toma importancia con respecto a la progresión del fenotipo generado por la mutaciones en ERp57, ya que estos ratones presentan solamente hinchazón axonal y menor número de “cluster” de AChR, que cronológicamente podrían desarrollarse primero.

También se encontraron morfologías anormales de los aparatos post-sinápticos de ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y no así, en ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. Los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg presentaron aumentados los niveles de las UNM de tipo desmantelados, mientras las UNM maduras tipo “pretzel” se encontraron disminuidas, fenotipos que es comúnmente reportado en etapas pre-sintomáticas de modelos murinos de ELAf (Vinsant y col., 2013a; Vinsant y col., 2013b; Perez-garcia y Burden, 2012).

Finalmente, se analizó el volumen de las UNM y se encontraron volúmenes menores en el caso de los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg pero no así en ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. La disminución del volumen de la UNM también ha sido descrito en modelos murinos de ELAf y representa etapas de maduración tempranas de las UNM (McGown

et al. 2013; Duval et al. 2014). Resultados similares fueron descritos para los ratones KO de ERp57 en el SNC, los cuales presentan fenotipos más agresivos con alteraciones drásticas en las inervaciones al igual que en la funcionalidad.

Estos resultados demuestran que los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg desarrollan conectividad neuromuscular anormal, debido a que la conexión entre el nervio y el músculo esta alterada. Esto llevaría a los ratones a tener un peor desempeño motor. Mientras tanto para los ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, se encontraron algunos parámetros de las UNM anormales, por lo que su bajo desempeño motor puede explicarse en parte por problemas en la sinapsis muscular.

La causa de la alteración de las UNM puede indicar estados de disfunción o de enfermedad en el SNC, sistema nervioso periférico o a nivel muscular. Una posible explicación puede deberse a alteraciones en el terminal sináptico del nervio, que pueden modificar los niveles de expresión de proteínas sinápticas o receptores sinápticos y pueden causar la pérdida y cambios morfológicos de la sinapsis y/o comunicación entre el nervio y el músculo por la pérdida de su integridad. Estos resultados concuerdan con recientes estudios de motoneuronas derivadas de células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC) que expresan diferentes mutaciones relacionadas con la ELA, en donde alteraciones morfológicas de la motoneurona son los principales fenotipos encontrados (Kiskinis y col., 2014; Chen y col., 2014).

Basados en las alteraciones encontradas en las UNM de ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg, se analizaron las posibles consecuencias en la fisiología muscular. Es importante analizar si se expresan las formas mutantes de ERp57 en el músculo esquelético, ya que si esto ocurre, las mutantes de ERp57 podrían tener efectos fuera del SNC. Existen

estudios que muestran que la expresión de genes bajo el promotor de prion puede ocurrir fuera del SNC (Borchelt y col., 1996). Se confirmó la sobreexpresión de ambas mutantes en músculos esqueléticos de ratones transgénicos, siendo de 3 veces en ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y de 7 veces en ratones ERp57<sup>Q418K</sup>-Tg en comparación con sus hermanos de camada no-transgénicos. De esta forma, las proteínas mutantes pueden tener efectos fuera del SNC. Diferentes líneas de investigación han mostrado que existen mecanismos no-autónomos de la célula que pueden contribuir a la patogénesis de la ELA. La expresión de SOD1 mutante en músculo esquelético genera atrofia muscular progresiva y pérdida de fuerza muscular (Dobrowolny y col., 2008). Esto muestra que la expresión de proteínas mutantes en músculo también posee un rol en la patogénesis de la enfermedad.

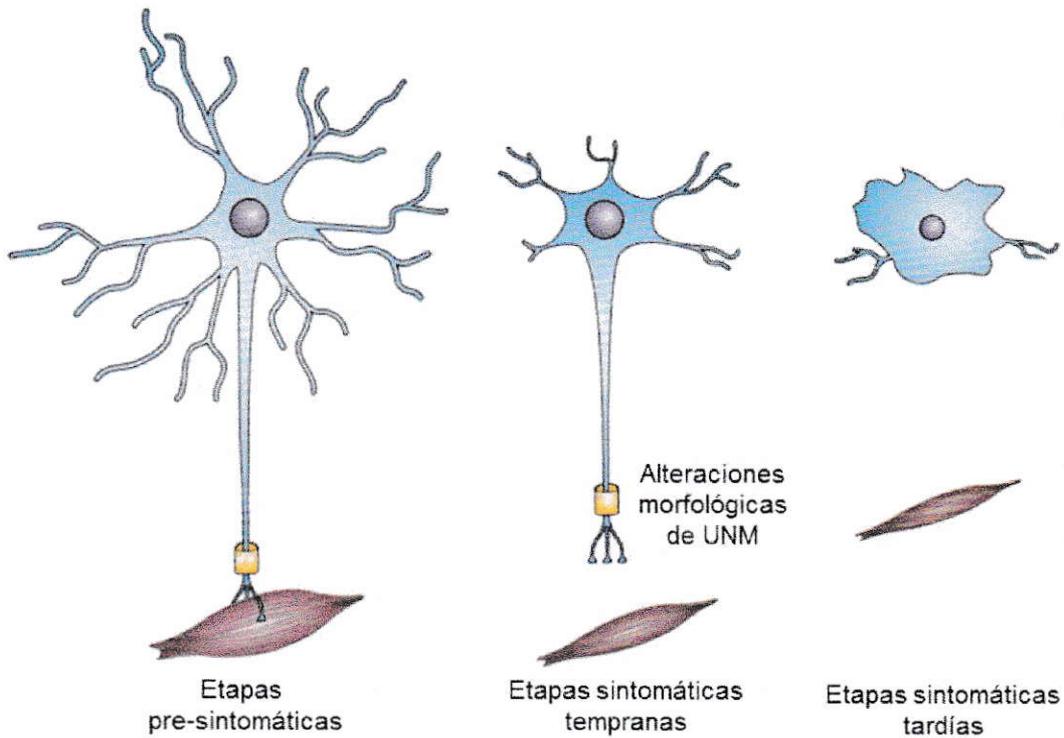
Basados en la alteración a nivel de las UNM que se observaron en ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, se analizaron las posibles consecuencias en la histopatología muscular del músculo TA. A este nivel, no se encontraron cambios en la morfología de fibras musculares, fibrosis del músculo esquelético ni presencia de centronucleación, por lo que se concluye que no existen alteraciones en los ciclos de degeneración/regeneración del músculo esquelético. Estos resultados muestran una integridad general del músculo en los animales que expresan las mutaciones de ERp57.

Las propiedades funcionales y estructurales del músculo esquelético dependen de la inervación de las motoneuronas, por lo que para estudiar este parámetro se analizó la morfología y distribución de miofibras en el músculo TA para determinar la actividad NADH-TR e identificar miofibras oxidativas. La cuantificación de las miofibras de ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg muestran que las fibras de contracción rápida (NADH-TR

negativo) se encuentran disminuidas y fibras de contracción lenta (NADH-TR positivo) se encuentran aumentadas, lo que muestra que presentan un perfil de tipos de miofibras alterado. Esto podría explicar el peor desempeño motor presente en estos ratones. Los ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg presentan un perfil de miofibras oxidativas semejante al de sus hermanos de camada no-transgénicos, lo que muestra que no existe alteración o deterioro por la sobreexpresión de la mutante Q481K en ERp57.

Un gran número de estudios han mostrado que existe un subtipo de motoneuronas vulnerables en la ELA, que son las primeras en presentar alteraciones durante etapas pre-sintomáticas y durante el transcurso de la enfermedad (Saxena y col., 2009; Filézac de L'Etang y col., 2015). Estas motoneuronas son denominadas fatigables-rápidas, inervan los músculos esqueléticos de contracción rápida mediante UNM y son selectivamente las primeras sinapsis en degenerar durante periodos previos a la aparición de los síntomas clínicos (Frey y col., 2000). De esta forma, se podría explicar el cambio en el perfil de fibras musculares esqueléticas presente en los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg, donde las motoneuronas fatigables-rápidas también serían más vulnerables a los cambios proteostáticos causados por la mutación D217N en ERp57, teniendo un impacto negativo en la estabilidad e integridad de las fibras musculares de contracción rápida, disminuyendo su abundancia en el músculo. Este cambio de perfil de miofibras también es característico en una condición denominada sarcopenia, la cual está relacionada con el envejecimiento muscular, donde existe pérdida de masa y fuerza muscular (Kwan, 2013).

Un esquema de la progresión de la enfermedad la ELA se muestra en la Figura 36, la cual comienza con una UNM estable, luego en etapas sintomáticas tempranas existe un desequilibrio en la UNM y la motoneurona se retracta desde el músculo, en esta



**Figura 36. Progresión y patogénesis de la enfermedad ELA.** En etapas pre-sintomáticas tempranas, la motoneurona inerva fibras musculares con UNM que se encuentran estables e integra. En etapas sintomáticas tempranas, existe un desequilibrio en la UNM y la motoneurona se retracta desde el músculo, afectando su fisiología. En etapas sintomáticas tardías, la motoneurona degenera y los músculos se atrofian, llevando a parálisis completa. La mutación D217N en ERp57 genera fenotipos característicos de etapas sintomáticas tempranas. Modificado de Paez-Colasante y col., 2015.

etapa los músculos también se ven alterados. En etapas sintomáticas tardías, la motoneurona es degenerada y los músculos se atrofian, llevando a parálisis completa del paciente (Paez-Colasante y col., 2015)

En resumen, los resultados de este Seminario de Título indican que la mutación D217N de ERp57 en el SNC produce deterioro motor en los ratones, posiblemente causado por la disrupción de la sinapsis neuromuscular debido a perturbaciones en la síntesis de proteínas sinápticas y como consecuencia, una alteración en la fisiología muscular. El fenotipo global de los ratones ERp57<sup>D217N</sup> simulan etapas sintomáticas tempranas de la ELA y otros desordenes neuromusculares.

### **8.3. Posibles mecanismos de la disfunción motora encontrado en los modelos estudiados.**

Para analizar si la expresión de las mutaciones de ERp57 relacionadas a la ELA resultan en una alteración de la proteostasis y en una posible activación de la UPR, se evaluaron los niveles de expresión de algunos de los marcadores de esta vía de señalización y de chaperonas del RE en la médula espinal, corteza y cerebelo. Se midieron los niveles de XBP1s, el factor de transcripción activado por la vía IRE1 $\alpha$  que activa la expresión de genes relacionados a la UPR (Hetz y col., 2015), el factor de transcripción CHOP, que está relacionado con la activación de apoptosis en estrés de RE crónico (Hetz y col., 2015), el factor de transcripción ATF3, que es inducido en diferentes tejidos en respuesta a estrés (Chen y col., 1994). También se analizaron las chaperonas de RE BiP y ERp72, las cuales son reguladas positivamente durante la UPR (Hetz, 2012).

Para el caso de XBP1s, ATF3 y ERp72 en los tres tejidos analizados, los niveles no se encontraron regulados positivamente, mientras que los niveles de BiP y CHOP

poseen tendencias de aumentar en médula espinal de ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y en corteza de ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg. Los niveles proteicos de BiP son significativamente mayores en la corteza de ratones ERp57<sup>Q481K</sup>, lo que podría estar relacionado con mecanismos compensatorios en este tejido y se correlacionan con lo obtenido en niveles de mRNA de BiP. Estos resultados muestran que no se encuentra activada la UPR en los tejidos analizados por causa de las formas mutantes de ERp57 relacionadas a la ELA, a diferencia de lo que se observa en otros modelos de ELA<sup>f</sup> en los cuales si se ha observado una activación de la UPR (Hetz y col., 2009; Matus y col., 2013). Resultados similares fueron descritos *in vitro* en líneas celulares de motoneuronas que sobreexpresan las formas mutantes de ERp57 (Woehlbier y col., 2015) y en los modelos animales de sobreexpresión de ERp57<sup>WT</sup> y en el ratón KO condicional de ERp57 en el SNC (Torres y col., 2015), donde no presentaron activación de la UPR ni estrés de RE. Esto podría deberse a que ERp57 solamente cataliza el plegamiento de un subconjunto de glicoproteínas y debido a que las mutaciones en ERp57 le confieren una mayor afinidad por CNX/CRT (Woehlbier y col., 2015) lo que se traduce en ciclos de plegamiento de CNX/CRT alterados, lo cual conllevaría a variaciones en los niveles de este subconjunto de glicoproteínas. De esta forma, no existirían grandes alteraciones en la proteostasis general de la célula.

La UNM es una sinapsis que mantiene su estabilidad e integridad gracias a un conjunto de factores, como lo son: proteínas del citoesqueleto, factores neurotróficos, moléculas de guía axonal y glicoproteínas sinápticas (Moloney y col., 2014). Debido a la función de ERp57 en el plegamiento de proteínas, se analizaron los niveles de expresión de glicoproteínas sinápticas en los ratones que sobreexpresan formas mutantes de ERp57 relacionadas a la ELA en la médula espinal, corteza y cerebelo. Se midieron los niveles de PrP dado que tiene 2 glicosilaciones y un puente disulfuro

(Prusiner, 1998) y que es considerada como un sustrato de ERp57 (Torres y col., 2015), los niveles de NMDAR2a, glicoproteína de membrana que posee 6 glicosilaciones y un puente disulfuro, que también es considerada un posible sustrato de ERp57. NMDAR2a ha sido relacionada con la inactivación de PDIs mediante la sobreactivación de la producción de NO (Nakamura y Lipton, 2008).

Otras proteínas analizadas fueron SV2 y sinaptofisina, las cuales son glicoproteínas integrales de membranas de vesículas sinápticas. SV2 tiene 3 sitios de glicosilaciones (Buckley y Kelly, 1985) y es un marcador pre-sináptico que disminuye con la degeneración de las UNM (Narai y col., 2009), mientras que sinaptofisina, posee un sitio de glicosilación y es considerado como un marcador del funcionamiento de las UNM, ya que se encuentra concentrada en zonas activas de las UNM (Lupa y Hall, 1989). Ratones KO de ERp57 en el SNC muestran menores niveles de SV2 en corteza, lo cual reafirma la importancia de ERp57 en el posible plegamiento de estas glicoproteínas (Woehlbier y col., 2015). Por último, se analizó PSD95, una proteína sináptica que se ha descrito que interactúa con NMDAR2a potenciando la activación de la síntesis de NO (Luo y col., 2005).

Los resultados obtenidos con las mutaciones D217N y Q481K en ERp57 mostraron que existen alteraciones en el perfil de los niveles de estas proteínas sinápticas en los diferentes tejidos analizados, siendo mayor para la mutación D217N en ERp57. Es importante enfatizar que SV2 disminuye significativamente en la médula espinal de ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg y no así en la médula de ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, lo cual se correlaciona con que los ratones ERp57<sup>D217N</sup>-Tg presentan un peor desempeño motor desde etapas tempranas, comparado con ratones ERp57<sup>Q481K</sup>-Tg, los cuales empeoran su desempeño motor con el tiempo. SV2 es considerado como un marcador de funcionamiento de terminales pre-sinápticos, por lo que su disminución tendría

relación con peores desempeños motores. Los patrones de NMDAR2a, PSD95 y Sinaptofisina también se ven alterado en los diferentes tejidos del SNC. Estos resultados mostraron que existe un cambio en el perfil de expresión proteica de las proteínas analizadas en el SNC para ambas mutaciones y estos a su vez, dependen también del nivel de sobreexpresión de ERp57 en los tejidos analizados. En ambos casos, el cerebelo es el tejido que presentan más consistencia en mostrar niveles alterados de las proteínas sinápticas analizadas, lo que se condice con estudios recientes que muestran que el cerebelo es un tejido que presenta grandes alteraciones en pacientes con ELA (Prudencio y col., 2015).

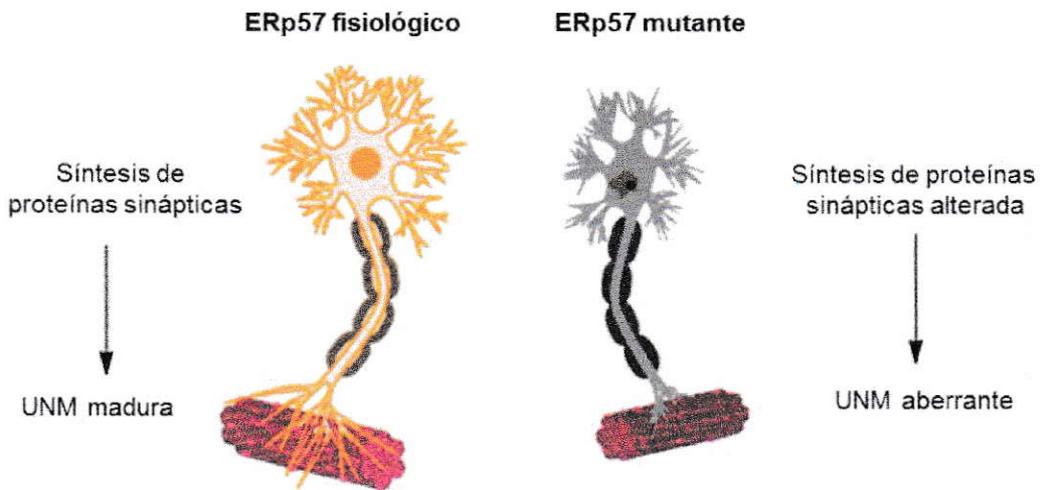
También se analizaron los niveles de mRNA de las proteínas sinápticas que presentaron cambios significativos en los diferentes tejidos del SNC y en ambos genotipos. Esto se realizó debido a que es importante analizar si la alteración del perfil de proteínas sinápticas, ocasionado por las mutantes de ERp57, ocurre a nivel de transcritos o proteínas. Todos los mRNA que se analizaron no presentaron diferencias entre los animales transgénicos y sus hermanos de camada no-transgénicos. Esto reafirma que hay un efecto a nivel de proteínas, que podría estar ligado a problemas en su plegamiento y la alteración en sus niveles relativos.

Una posible explicación para el cambio en el perfil de proteínas sinápticas encontrado puede deberse al efecto que poseen las mutaciones de ERp57 en cuanto a su interacción con CNX y CRT. En el estudio de Woelhbier y col., 2015, se analizaron los cambios generados por los PNS en su secuencia, y ambas mutaciones generan un aumento de afinidad por estas lectinas, siendo mayor para la mutación D217N y menor para Q481K. Estas mutaciones pueden alterar los ciclos de unión y liberación de sustrato, teniendo un efecto generalizado en los niveles del subconjunto de glicoproteínas sinápticas que son sustrato de ERp57.



Las alteraciones de proteínas sinápticas están tomando importancia ya que estudios recientes de las UNM de modelos de ELAf muestra una variación en los contenidos de proteínas sinápticas durante el proceso de denervación (Liu y col., 2013), y en otras enfermedades neurodegenerativas como en las enfermedades relacionadas a Prion (Moreno y col., 2012) y la EA (Ma y col., 2013) donde se ha sugerido que perturbaciones crónicas de la función correcta del RE pueden desencadenar una reducción en la síntesis de proteínas sinápticas dando como resultado un empeoramiento cognitivo o motor durante el proceso neurodegenerativo. De esta forma, perturbaciones en la red de plegamiento de las PDI pueden ser consideradas como factores de riesgo para la ELA más que un factor causal.

Estos resultados muestran que existe una alteración en la proteostasis normal de glicoproteínas sinápticas en ratones que sobreexpresan formas mutantes de ERp57 relacionadas a la ELA. Esta alteración podría generar efectos tóxicos en los terminales neuronales originados por la falla del plegamiento eficiente y correcto de glicoproteínas que transitan por el RE, como lo son receptores o proteínas terminales sinápticas. Como consecuencia, las UNM entre neuronas y músculos pierden su integridad y equilibrio y son degeneradas, llevando a problemas de conectividad generalizada. Este fenotipo simula etapas tempranas sintomáticas de ELA, donde existe impedimento motor evidente, disrupción de la sinapsis neuromuscular y como consecuencia, una alteración en la fisiología muscular (Figura 37). De esta forma, estos modelos analizados serían considerados como modelos de Chaperonopatías, debido a que la condición patológica posee como factor causal una chaperona mutante, la cual ejerce una influencia autosómico dominante, los que pueden generar ganancias de funciones tóxicas, o pérdidas de función fisiológica.



**Figura 37. Efecto de las mutaciones de ERp57 relacionadas a la ELA en las motoneuronas.** En condiciones de ERp57 fisiológico, esta proteína juega un rol en el plegamiento de un subconjunto de glicoproteínas sinápticas en las motoneuronas, las cuales mantienen la estabilidad e integridad de las UNM. La expresión de mutantes de ERp57 relacionadas a la ELA genera alteraciones en el perfil de síntesis de glicoproteínas sinápticas, las cuales generan efectos nocivos para las UNM, su degeneración y en consecuencia, alteración de la fisiología muscular.

#### **8.4. Proyecciones.**

Este Seminario de Título constituye la generación y caracterización de modelos que sobreexpresan formas mutantes de ERp57 asociados a la ELA. Más estudios son necesarios para realizar una caracterización completa de los modelos, como el análisis completo de cerebro mediante histología y analizar los posibles niveles de neurodegeneración y apoptosis.

Para entender lo que ocurre en las UNM de una forma global, es importante realizar estudios de caracterización de las cargas proteicas presentes en las sinapsis, lo cual se puede realizar mediante estudios proteómicos de las glicoproteínas sinápticas presentes en las sinapsis y análisis de ultra-estructura mediante microscopía electrónica. Además, las líneas de ratones transgénicos de ERp57<sup>WT</sup> y mutantes pueden actuar como “modificadores” de la enfermedad al cruzarse con modelos murinos de ELA<sub>f</sub>, como las que sobreexpresan formas mutantes de SOD1 y TDP-43. El análisis del desarrollo de la enfermedad en estos modelos permitirá dilucidar si confieren protección o generan empeoramiento del desarrollo y/o progresión de la enfermedad.

Este estudio contribuye en el contexto de la enfermedad neurodegenerativa ELA, ya que presenta dos nuevos modelos de etapas sintomáticas tempranas de la enfermedad, lo cual no se había descrito hasta la fecha. Estos modelos pueden ayudar a entender los desbalances que ocurren durante la degeneración de las UNM y las fibras musculares esqueléticas, y por ende, contribuir al estudio del patrón de degeneración retrogrado hacia el soma “dying back”. Finalmente estos modelos también podrían ser utilizados para probar nuevas posibles terapias, tanto

farmacológicas como terapias génicas, que actúen en etapas tempranas de la enfermedad confiriendo neuroprotección.

## 9. CONCLUSIONES.

- Se generaron dos modelos murinos que sobreexpresan formas mutantes de ERp57 relacionadas a la ELA, D217N y Q481K en el SNC bajo el promotor PrP, los cuales no presentaron fenotipos característicos de la ELA durante el envejecimiento.
- Ambos modelos presentaron un peor desempeño motor. Para la mutación D217N, esto se observó desde el comienzo de los registros, mientras que para la mutación Q481K el empeoramiento del desempeño motor fue progresivo.
- La mutación de ERp57 D217N genera alteración en las UNM y alteración en la fisiología muscular, pero debido a que no se encuentra actividad espontánea en la EMG las UNM alteradas serían funcionales.
- La mutación de ERp57 Q481K no genera alteraciones significativas en las UNM ni alteración en la fisiología muscular,
- La sobreexpresión de formas mutantes de ERp57 relacionadas a la ELA no generan una activación de la UPR en el SNC.
- La sobreexpresión de formas mutantes de ERp57 relacionadas a la ELA genera alteraciones en el perfil de expresión de proteínas sinápticas en el SNC, lo cual estaría relacionado con la pérdida de integridad de las UNM.
- El fenotipo observado en estos animales simula etapas tempranas sintomáticas de la ELA donde existe impedimento motor leve, causado por anomalías en la sinapsis neuromuscular.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, G.M. et al., 2004. Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Molecular Brain Research*, 130(1-2), pp.7–15.
- Almeida, S., Zhou, L. & Gao, F.B., 2011. Progranulin, a glycoprotein deficient in frontotemporal dementia, is a novel substrate of several protein disulfide isomerase family proteins. *PLoS ONE*, 6(10).
- Amm, I., Sommer, T. & Wolf, D.H., 2014. Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(1), pp.182–196. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.031>.
- Andreu, C.I. et al., 2012. Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: From disease mechanisms to biomedical applications. *FEBS Letters*, 586(18), pp.2826–2834. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.07.023>.
- Appenzeller-Herzog, C. & Ellgaard, L., 2008. The human PDI family: Versatility packed into a single fold. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(4), pp.535–548.
- Atkin, J.D. et al., 2008. Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 30(3), pp.400–407.
- Atkin, J.D. et al., 2006. Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), pp.30152–30165.
- Balch, W.E. et al., 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5865), pp.916–919.
- Benham, A.M., 2012. The Protein Disulfide Isomerase Family: Key Players in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(8), pp.781–789.
- Bernard-Marissal, N. et al., 2015. Calreticulin levels determine onset of early muscle denervation by fast motoneurons of ALS model mice. *Neurobiology of Disease*, 73, pp.130–136. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996114002812>.
- Bernard-Marissal, N. et al., 2012. Reduced Calreticulin Levels Link Endoplasmic Reticulum Stress and Fas-Triggered Cell Death in Motoneurons Vulnerable to ALS. *Journal of Neuroscience*, 32(14), pp.4901–4912.

- Bolte, S. & Cordelières, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(3), pp.213–232.
- Borchelt, D.R. et al., 1996. A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 13, pp.159–163.
- Bravo, S.B. et al., 2011. Leptin and fasting regulate rat gastric glucose-regulated protein 58. *International journal of peptides*, 2011(10), p.969818. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3205658&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Buckley, K. & Kelly, R.B., 1985. Identification of a transmembrane glycoprotein specific for secretory vesicles of neural and endocrine cells. *The Journal of cell biology*, 100(4), pp.1284–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2113776&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Caillol, G. et al., 2012. Motor endplate disease affects neuromuscular junction maturation. *European Journal of Neuroscience*, 36(4), pp.2400–2408.
- Castillo, V. et al., 2015. Functional Role of the Disulfide Isomerase ERp57 in Axonal Regeneration. *Plos One*, 10(9), p.e0136620. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0136620>.
- Chen, B.P. et al., 1994. ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *The Journal of biological chemistry*, 269(22), pp.15819–15826.
- Chen, H. et al., 2014. Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell*, 14(6), pp.796–809. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.004>.
- Coe, H. et al., 2010. ERp57 modulates STAT3 signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 285(9), pp.6725–6738.
- Colla, E. et al., 2012. Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of  $\alpha$ -synucleinopathy in vivo. *Journal of Neuroscience*, 32(10), pp.3306–3320.
- Cresswell, P. et al., 2005. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunological Reviews*, 207, pp.145–157.
- Delom, F. et al., 2001. Role of extracellular molecular chaperones in the folding of oxidized proteins. Refolding of colloidal thyroglobulin by protein disulfide isomerase and immunoglobulin heavy chain-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), pp.21337–21342.

- Denzel, A. et al., 2002. Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression. *Molecular and cellular biology*, 22(21), pp.7398–7404.
- Dobrowolny, G. et al., 2008. Skeletal Muscle Is a Primary Target of SOD1G93A-Mediated Toxicity. *Cell Metabolism*, 8(5), pp.425–436. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413108002866>.
- Dupuis, L. et al., 2009. Muscle Mitochondrial Uncoupling Dismantles Neuromuscular Junction and Triggers Distal Degeneration of Motor Neurons. *PLoS ONE*, 4(4), p.e5390. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0005390>.
- Dupuis, L. & Loeffler, J.P., 2009. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(3), pp.341–346.
- Duval, M.G. et al., 2014. Growth differentiation factor 6 as a putative risk factor in neuromuscular degeneration. *PloS one*, 9(2), p.e89183. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3938462&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Eilgaard, L. & Ruddock, L.W., 2005. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO reports*, 6(1), pp.28–32.
- Feige, M.J. & Hendershot, L.M., 2011. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(2), pp.167–175. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2010.10.012>.
- Ferrari, D.M. & Söling, H.D., 1999. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *The Biochemical journal*, 339 ( Pt 1, pp.1–10.
- Filézac de L'Etang, A. et al., 2015. Marinesco-Sjögren syndrome protein SIL1 regulates motor neuron subtype-selective ER stress in ALS. *Nature Neuroscience*, 18(2), pp.227–238. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.3903>.
- Fischer, L.R. et al., 2004. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: Evidence in mice and man. *Experimental Neurology*, 185(2), pp.232–240.
- Ford, M.J. et al., 2002. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience*, 113(1), pp.177–192.
- Frey, D. et al., 2000. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(7), pp.2534–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729333>.
- Furukawa, Y. et al., 2006. Disulfide cross-linked protein represents a significant fraction

- of ALS-associated Cu, Zn-superoxide dismutase aggregates in spinal cords of model mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), pp.7148–7153.
- Glick, D., Barth, S. & Macleod, K.F., 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology*, 221(1), pp.3–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20225336>.
- Goetsch, S.C. et al., 2003. Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiological genomics*, 14(3), pp.261–271.
- Gonzalez-Perez, P. et al., 2015. Identification of rare protein disulfide isomerase gene variants in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Gene*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111915004448>.
- Gurney, M.E. et al., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5166), pp.1772–1775.
- Harwood, B., Edwards, D.L. & Jakobi, J.M., 2011. Age- and sex-related differences for electromyography gaps during daily activity and a discrete task. *Gait and Posture*, 34(1), pp.6–12. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gaitpost.2011.02.013>.
- Hess, D.T. et al., 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(2), pp.150–166.
- Hetz, C., 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(2), pp.89–102. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3270>.
- Hetz, C. et al., 2009. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes and Development*, 23(19), pp.2294–2306.
- Hetz, C., Chevet, E. & Oakes, S.A., 2015. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nature Cell Biology*, 17(7), pp.1–10.
- Hetz, C. & Mollereau, B., 2014. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience*, 15(4), pp.233–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24619348>.
- Honjo, Y. et al., 2011. Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis*, 12, pp.444–450. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21745122>.
- Huang, Q. & Figueiredo-Pereira, M.E., 2010. *Ubiquitin/proteasome pathway impairment in neurodegeneration: therapeutic implications*,

- Ilieva, E. V. et al., 2007. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 130(12), pp.3111–3123.
- Ilieva, H., Polymenidou, M. & Cleveland, D.W., 2009. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of Cell Biology*, 187(6), pp.761–772. Available at: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200908164>.
- Inghilleri, M. & Iacovelli, E., 2011. Clinical neurophysiology in ALS. *Archives Italiennes de Biologie*, 149, pp.57–63.
- Jaronen, M. et al., 2013. Protein disulfide isomerase in ALS mouse glia links protein misfolding with NADPH oxidase-catalyzed superoxide production. *Human Molecular Genetics*, 22(4), pp.646–655. Available at: <http://www.hmg.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/dd5472>.
- Jaronen, M., Goldsteins, G. & Koistinaho, J., 2014. ER stress and unfolded protein response in amyotrophic lateral sclerosis—a controversial role of protein disulphide isomerase. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(December), pp.2010–2015. Available at: <http://journal.frontiersin.org/journal/10.3389/fncel.2014.00402/abstract>.
- Jin, H. et al., 2014. Late-Onset of Spinal Neurodegeneration in Knock-In Mice Expressing a Mutant BiP. *PLoS ONE*, 9(11), p.e112837. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0112837>.
- De Jong, S. et al., 2013. Endogenous female reproductive hormones and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 260(2), pp.507–512.
- Julien, J.P. & Kriz, J., 2006. Transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1762, pp.1013–1024.
- Kabashi, E. et al., 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics*, 40(5), pp.572–574.
- Kakkar, V. et al., 2014. Barcoding heat shock proteins to human diseases: looking beyond the heat shock response. *Disease models & mechanisms*, 7(4), pp.421–34. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3974453&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kiskinis, E. et al., 2014. Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell*, 14(6), pp.781–795. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.03.004>.
- Kozlov, G. et al., 2006. Crystal Structure of the bb??? Domains of the Protein Disulfide Isomerase ERp57. *Structure*, 14(8), pp.1331–1339.

- Kwan, P., 2013. Sarcopenia, a neurogenic syndrome? *Journal of Aging Research*, 2013, pp.1–10.
- Kwiatkowski, T.J. et al., 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5918), pp.1205–1208.
- Kwok, C.T. et al., 2013. Association studies indicate that protein disulfide isomerase is a risk factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Free radical biology & medicine*, 58, pp.81–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23337974>.
- Labbadia, J. & Morimoto, R.I., 2015. The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), pp.435–464. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biochem-060614-033955>.
- Laursen, B., Jensen, B. & Ratkevicius, A., 2001. Performance and muscle activity during computer mouse tasks in young and elderly adults. *European Journal of Applied Physiology*, 84(4), pp.329–336.
- Leblond, C.S. et al., 2014. Dissection of genetic factors associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 262(0), pp.91–101. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488614001150>.
- Lee, S.-O. et al., 2010. Protein disulphide isomerase is required for signal peptide peptidase-mediated protein degradation. *The EMBO journal*, 29(2), pp.363–375. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.359>.
- Li, Y. & Camacho, P., 2004. Ca<sup>2+</sup>-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *Journal of Cell Biology*, 164(1), pp.35–46.
- Lilienbaum, A., 2013. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 4(1), pp.1–26.
- Linden, R. et al., 2008. Physiology of the prion protein. *Physiological reviews*, 88(2), pp.673–728.
- Lindquist, J. a. et al., 1998. ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO Journal*, 17(8), pp.2186–2195.
- Ling, S., Polymenidou, M. & D.W., C., 2013. Converging mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*, 79(3), pp.416–438.
- Liu, J.-X. et al., 2013. Distinct Changes in Synaptic Protein Composition at Neuromuscular Junctions of Extraocular Muscles versus Limb Muscles of ALS Donors. *PLoS ONE*, 8(2), p.e57473. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0057473>.
- Lori A. Rutkevich, Myrna F. Cohen-Doyle, U.B. & Williams, and D.B., 2010. Functional

Relationship between Protein Disulfide Isomerase Family Members during the Oxidative Folding of Human Secretory Proteins. *Molecular biology of the cell*, 21(24), pp.3093–3105.

- Lu, J. & Holmgren, A., 2014. The Thioredoxin Superfamily in Oxidative Protein Folding. *Antioxidants & redox signaling*, 00(00), pp.1–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24483600>.
- Luo, S. et al., 2006. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Molecular and cellular biology*, 26(15), pp.5688–5697.
- Luo, S. et al., 2005.  $\alpha$ -syn trophin regulates ARMS localization at the neuromuscular junction and enhances EphA4 signaling in an ARMS-dependent manner. *Journal of Cell Biology*, 169(5), pp.813–824. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2171611&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lupa, M.T. & Hall, Z.W., 1989. Progressive restriction of synaptic vesicle protein to the nerve terminal during development of the neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 9(11), pp.3937–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2511281>.
- Ma, T. et al., 2013. Suppression of eIF2 $\alpha$  kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nature neuroscience*, 16(9), pp.1299–305. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3756900&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Macario, a. J.L. & De Macario, E.C., 2002. Sick chaperones and ageing: A perspective. *Ageing Research Reviews*, 1(2), pp.295–311.
- Macario, A.J.L. & De Macario, E.C., 2007. Chaperonopathies by defect, excess, or mistake. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113, pp.178–191.
- Massignan, T. et al., 2007. Proteomic analysis of spinal cord of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis G93A SOD1 mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(3), pp.719–725.
- Matus, S. et al., 2013. ER dysfunction and protein folding stress in ALS. *International Journal of Cell Biology*, 2013.
- McGown, A. et al., 2013. Early interneuron dysfunction in ALS: Insights from a mutant sod1 zebrafish model. *Annals of Neurology*, 73(2), pp.246–258.
- Mesaeli, N. et al., 1999. Calreticulin is essential for cardiac development. *Journal of Cell Biology*, 144(5), pp.857–868.

- Millecamps, S. & Julien, J.-P., 2013. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(3), pp.161–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23361386>.
- Moloney, E.B., de Winter, F. & Verhaagen, J., 2014. ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Frontiers in neuroscience*, 8(August), p.252. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4132373&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Moreno, J. a et al., 2012. Sustained translational repression by eIF2 $\gamma$  – P mediates prion neurodegeneration. *Nature*, 485(7399), pp.507–511.
- Naidoo, N. et al., 2008. Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(26), pp.6539–6548.
- Nakamura, T. & Lipton, S. a, 2008. Emerging roles of S-nitrosylation in protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 10(1), pp.87–101.
- Narai, H. et al., 2009. Early detachment of neuromuscular junction proteins in ALS mice with SODG93A mutation. *Neurology international*, 1(1), p.e16.
- Nardo, G. et al., 2011. Amyotrophic lateral sclerosis multiprotein biomarkers in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS ONE*, 6(10).
- Noack, J., Brambilla Pisoni, G. & Molinari, M., 2014. Proteostasis: Bad news and good news from the endoplasmic reticulum. *Swiss medical weekly*, 144(August), p.w14001. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144910>.
- Oakes, P. & Papa, F., 2015. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annual Review of Pathology*, 10, pp.173–194.
- Okada, K. et al., 2006. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5781), pp.1802–1805.
- Ozcan, L. et al., 2009. Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Central Role in Development of Leptin Resistance. *Cell Metabolism*, 9(1), pp.35–51. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413108003896>.
- Paez-Colasante, X. et al., 2015. Amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and therapeutics in the epigenomic era. *Nature reviews. Neurology*, 11(5), pp.266–279. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25896087>.
- Pasinelli, P. & Brown, R.H., 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis:

- insights from genetics. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(9), pp.710–723.
- Perez-garcia, M.J. & Burden, S.J., 2012. Increasing MuSK Activity Delays Denervation and Improves Motor Function in ALS Mice. , 2(3), pp.497–502.
- Pollock, S. et al., 2004. Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system. *The EMBO journal*, 23(5), pp.1020–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=380975&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Polotsky, M. et al., 2011. Effect of age and weight on upper airway function in a mouse model. , 21224, pp.696–703.
- Prudencio, M. et al., 2015. Distinct brain transcriptome profiles in C9orf72-associated and sporadic ALS. *Nature Neuroscience*, 18(8), pp.1175–1182. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.4065>.
- Prusiner, S.B., 1998. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), pp.13363–13383. Available at: <http://www.pnas.org/content/95/23/13363.abstract>.
- Ripps, M.E. et al., 1995. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3), pp.689–693.
- Ron, D. & Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(7), pp.519–529.
- Rosen, D.R., Siddique, T. & Patterson, D., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362, pp.59–62.
- Santana-Codina, N. et al., 2013. A transcriptome-proteome integrated network identifies endoplasmic reticulum thiol oxidoreductase (ERp57) as a hub that mediates bone metastasis. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 12(8), pp.2111–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23625662>.
- Saxena, S., Cabuy, E. & Caroni, P., 2009. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nature neuroscience*, 12(5), pp.627–636.
- Saxena, S. & Caroni, P., 2011. Selective Neuronal Vulnerability in Neurodegenerative Diseases: From Stressor Thresholds to Degeneration. *Neuron*, 71(1), pp.35–48.
- Schröder, M. & Kaufman, R.J., 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry*, 74, pp.739–789.

- Shishkin, S.S. et al., 2013. AGR2, ERp57/GRP58, and Some Other Human Protein Disulfide Isomerases. *Biochemistry. Biokhimiia*, 78(13), pp.1415–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24490732>.
- Silvennoinen, L. et al., 2004. Identification and Characterization of Structural Domains of Human ERp57: Association with Calreticulin requires several domains. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), pp.13607–13615. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M313054200>.
- Soto, C., 2003. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(1), pp.49–60.
- Van Spronsen, M. & Hoogenraad, C.C., 2010. Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 10(3), pp.207–214.
- Sreedharan, J. et al., 2008. TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*, 319(5870), pp.1668–1672. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1154584>.
- Su, B. et al., 2010. Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochemical and Biophysical Acta*, 19802(1), pp.135–142.
- Sun, S. et al., 2015. Translational profiling identifies a cascade of damage initiated in motor neurons and spreading to glia in mutant SOD1-mediated ALS.
- Teske, B.F. et al., 2011. The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell*, 22(22), pp.4390–4405. Available at: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E11-06-0510>.
- Torres, M. et al., 2015. The Protein-disulfide Isomerase ERp57 Regulates the Steady-state Levels of the Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 290(39), pp.23631–23645. Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.635565>.
- Totsuka, T. et al., 1998. Muscular dystrophy: centronucleation may reflect a compensatory activation of defective myonuclei. *Journal of biomedical science*, 5, pp.54–61.
- Tu, B.P. & Weissman, J.S., 2002. The FAD- and O<sub>2</sub>-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 10(5), pp.983–994.
- Turano, C. et al., 2011. ERp57/GRP58: A protein with multiple functions. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 16(4), pp.539–563.

- Uehara, T., 2007. Accumulation of misfolded protein through nitrosative stress linked to neurodegenerative disorders. *Antioxidants & redox signaling*, 9(5), pp.597–601.
- Uttara, B. et al., 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7, pp.65–74.
- Valdez, G. et al., 2010. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), pp.14863–14868. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1002220107>.
- Valdez, G. et al., 2012. Shared resistance to aging and als in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS ONE*, 7(4).
- Vance, C. et al., 2006. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain*, 129(4), pp.868–876. Available at: <http://www.brain.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/awl030>.
- Vance, C. et al., 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5918), pp.1208–1211.
- Vinsant, S. et al., 2013a. Characterization of early pathogenesis in the SOD1G93A mouse model of ALS: Part I, background and methods. *Brain and Behavior*, 3(4), pp.431–457.
- Vinsant, S. et al., 2013b. Characterization of early pathogenesis in the SOD1G93A mouse model of ALS: Part II, results and discussion. *Brain and Behavior*, 3(4), pp.431–457.
- Vogt, G. et al., 2007. Gain-of-glycosylation mutations. *Current Opinion in Genetics and Development*, 17(3), pp.245–251.
- Waldron-Roby, E. et al., 2012. Transgenic mouse model expressing the Caspase 6 fragment of mutant Huntingtin. *Journal of Neuroscience*, 32(1), pp.183–193.
- Walker, A.K. & Atkin, J.D., 2011. Mechanisms of neuroprotection by protein disulphide isomerase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology Research International*, 2011.
- Wang, M. et al., 2010. Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis. *Cell death and differentiation*, 17(3), pp.1–20.
- Wegorzewska, I. et al., 2009. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of*

*Sciences of the United States of America*, 106(44), pp.18809–18814.

Wimmer, M.E. et al., 2013. Aging in mice reduces the ability to sustain sleep/wake states. *PLoS ONE*, 8(12), pp.4–12.

Winklhofer, K.F., Tatzelt, J. & Haass, C., 2008. The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *The EMBO Journal*, 27(2), pp.336–349. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7601930>.

Woehlbier, U. et al., 2015, ALS-linked Protein Disulfide Isomerase Variants cause motor dysfunction. *EMBO J*.

Yang, Q. & Guo, Z., 2015. Polymorphisms in protein disulfide isomerase are associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis in the Chinese Han population. *International Journal of Neuroscience*, pp.1–19. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/00207454.2015.1050098>.

Yoo, B.C. et al., 2002. Overexpressed protein disulfide isomerase in brains of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience letters*, 334(3), pp.196–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453628>.

