



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

SCIENZE MORFOLOGICHE E FUNZIONALI

Ciclo XXVIII

**RUOLO DELLA TDP-43 NELLA FORMAZIONE DEI
GRANULI DA STRESS NELLA SCLEROSI LATERALE
AMIOTROFICA**

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/17

Presentata da: Dott.ssa Paola Coni
Coordinatore Dottorato: Prof.ssa Valeria Sogos
Tutor: Prof.ssa Valeria Sogos
Dott.ssa Carla Brancia

Esame finale anno accademico 2014 – 2015

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a late-onset neurodegenerative disease characterized by the selective loss of upper and lower motor neurons; most ALS cases are sporadic, and only 5-10% are familial. About 4% of familial cases, are due to mutations in *TARDBP*, the gene encoding TDP-43, that is an ubiquitous nuclear protein that regulates mRNA functions and metabolism.

Recent studies suggest that TDP-43 may regulates stress granules dynamics that are cytoplasmic structures composed of non-translating messenger ribonucleoproteins (mRNPs) that rapidly aggregate in cells exposed to adverse environmental conditions. Stress granules function in part to triage RNA and sequester transcripts not needed for coping with the stress.

We evaluated stress granule dynamics in primary fibroblast cultures from skin of ALS patients carrying *TARDBP*^{A382T} mutation, ALS patients without any *TARDBP* mutation and healthy controls. After treatment with sodium arsenite (0,5 mM), for 30 and 60 minutes, we observed a significantly higher number of cells exhibiting stress granules, identified by immunostaining for specific markers (TIA-1 and HuR), in fibroblasts from healthy controls compare with those from ALS patients carrying *TARDBP*^{A382T} mutation. Moreover, fibroblasts from healthy controls showed more stress granules per cell compare with those from ALS patients, while no differences were observed in stress granule size between groups. Fibroblasts from ALS patients without any *TARDBP* mutation, showed the same ability to form stress granules as cells from healthy controls, confirming that the decrease was associated to *TARDBP*^{A382T} mutation rather than other factors attributable to ALS.

In all samples analyzed TDP-43 immunostaining was always observed into the nucleus of all the cells and even after sodium arsenite treatment TDP-43 was never localized in stress granules.

The involvement of TDP-43 in stress granule assembly was confirmed by silencing *TARDBP* gene in fibroblasts from healthy controls. After sodium arsenite treatment, fibroblasts in wich *TARDBP* gene was silenced, showed a significantly lower number of cells exhibiting stress granules compare with unsilenced controls.

Following stress stimuli, we observed, using MTT assay, a significant higher cytotoxicity in fibroblasts from patients carrying *TARDBP*^{A382T} mutation compare with healthy controls. Expression of G3BP, a core stress granule component, was significantly lower after sodium arsenite treatment in fibroblasts from patients carrying *TARDBP*^{A382T} mutation compare with healthy controls.

We can conclude that *TARDBP*^{A382T} mutation caused a reduction in the ability of human fibroblasts to respond to stress through loss of TDP-43 function in stress granule nucleation. The pathogenetic action revealed in our study model does not seem to be mediated by changes in the localization of the TDP-43 protein, but we found that this protein contributes to stress granule formation through a regulatory effect on the G3BP core protein.

These data demonstrate that TDP-43 may modulate stress granule formation contributing to the cellular response to acute stress and suggest that *TARDBP*^{A382T} mutation may compromise the cellular stress response, contributing to neuronal vulnerability in ALS.

INDICE

INTRODUZIONE	pag.1
• La Sclerosi Laterale Amiotrofica	pag.1
• Eziologia e meccanismi patogenetici nella SLA	pag.4
• Basi genetiche della SLA	pag.10
• TDP-43	pag.12
• Granuli da stress	pag.17
SCOPO DEL LAVORO	pag.20
MATERIALI E METODI	pag.21
• Allestimento di colture primarie di fibroblasti	pag.21
• Induzione di stress ossidativo	pag.21
• Immunocitochimica	pag.22
• Quantificazione delle cellule con granuli da stress e misura dei granuli	pag.23
• Transfezione	pag.23
• Western blot	pag.24
• Test di vitalità cellulare (saggio MTT)	pag.25

• Estrazione dell'RNA e qPCR pag.26

• Analisi statistica pag.27

RISULTATI **pag.28**

• Formazione dei granuli da stress pag.28

• Espressione della G3BP pag.39

• Vitalità cellulare pag.40

DISCUSSIONE **pag.41**

BIBLIOGRAFIA **pag.50**

RINGRAZIAMENTI **pag.69**

INTRODUZIONE

La Sclerosi Laterale Amiotrofica

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa che colpisce i motoneuroni, le cellule del Sistema Nervoso Centrale che controllano la muscolatura volontaria. E' conosciuta anche come Malattia dei Motoneuroni, Malattia di Charcot (dal nome del neurologo francese che per primo la diagnosticò e la descrisse nel 1869), Malattia di Lou Gehrig (dal nome di un giocatore di baseball americano che si ammalò all'età di 36 anni). Il medico francese Jean-Martin Charcot, oltre che essere stato il primo a descrivere la malattia fu anche colui che coniò la terminologia utilizzata per indicare la patologia: *Sclerosi* ("indurimento") *Laterale* ("della porzione laterale del midollo spinale") *Amiotrofica* (caratterizzata dall' atrofia muscolare).

La SLA è caratterizzata da una progressiva perdita e morte dei motoneuroni inferiori del tronco encefalico e del midollo spinale e di quelli superiori della corteccia motoria. Questo porta alla denervazione dei muscoli e alla loro atrofia, con conseguente paralisi muscolare e morte del paziente entro 3-5 anni circa per blocco della muscolatura respiratoria (Leigh, 2007)

L'esordio della malattia e il suo decorso possono variare molto da individuo ad individuo. Nel 75% dei casi la SLA ha un esordio di tipo spinale. In tale forma la neurodegenerazione inizia nei motoneuroni del midollo spinale ed è caratterizzata inizialmente dalla riduzione della capacità di effettuare movimenti fini delle dita, debolezza e ipertrofia della piccola muscolatura delle dita, crampi muscolari a livello degli arti inferiori, fascicolazioni (movimenti involontari di fibre muscolari percepite sotto pelle) inizialmente a livello degli arti superiori ma che col tempo tendono a diffondersi ad altri gruppi muscolari, ma non viene comunque compromessa la sensibilità. Con il progredire della patologia, peggiora il quadro di debolezza e atrofia muscolare, vengono avvertite fascicolazioni a livello della lingua, e compaiono altri disturbi quali disfagia (difficoltà nella deglutizione) e disfonia (difficoltà nella fonazione e alterazione del tono della voce), difficoltà a trattenere il riso e il pianto, peggioramento della spasticità, disfunzioni sfinteriche e difficoltà respiratorie, infatti alla fine i malati necessitano della ventilazione meccanica.

Il restante 25% dei casi di SLA ha invece un esordio detto bulbare, in quanto la lesione è legata ai motoneuroni del midollo allungato. Questa si manifesta inizialmente con difficoltà nella parola fino alla perdita della capacità di comunicare verbalmente e difficoltà di deglutizione. Tuttavia, questa distinzione di carattere clinico, utile per definire la comparsa della malattia, non appare sempre così netta nell'evoluzione della stessa, in quanto le due forme possono sovrapporsi.

In passato si riteneva che il malato, pur perdendo progressivamente la capacità di muoversi, parlare, deglutire e spesso anche respirare autonomamente, mantenesse pressoché intatte le proprie capacità cognitive. Tuttavia studi recenti condotti con tecniche di imaging mostrano come in alcuni casi la SLA possa determinare atrofia fronto-temporale accompagnandosi così a demenza (Kiernan et al, 2011).

La degenerazione dei motoneuroni avviene in maniera progressiva nel giro di mesi o anni, ma la malattia ha comunque un esito fatale, e il farmaco più usato e che ha permesso di rallentare il decorso della patologia è il riluzolo, un antagonista del glutammato. Nelle fasi presintomatiche della patologia i motoneuroni non danneggiati sopperiscono, in parte, alle funzioni di quelli che sono andati incontro a degenerazione e i sintomi della SLA infatti insorgono quando viene meno questa capacità dei neuroni non ancora distrutti. La sopravvivenza media dall'insorgenza dei sintomi è di circa 3 anni, tuttavia in una parte degli individui affetti da SLA, la patologia ha un decorso più lento (Wood-Allum and Shaw, 2010) anche se comunque, raramente si sopravvive più di 3-5 anni dopo una diagnosi di SLA.

Nel 90% dei casi la SLA si presenta in forma sporadica, mentre per il restante 10% si parla di SLA familiare, in cui sono individuabili parenti affetti ed è stata quindi documentata una trasmissione della patologia per via ereditaria.

La SLA è considerata una patologia ad insorgenza nell'età adulta e colpisce più comunemente gli uomini che le donne (Ferraiuolo et al, 2011). La fascia d'età in cui si registra il picco d'esordio della patologia è quella compresa fra i 47 e 52 anni per quanto riguarda la SLA familiare, mentre per la SLA sporadica è quella compresa fra 58 e 63 (Kiernan et al, 2011). In realtà esistono anche dei casi di SLA giovanile il cui esordio si verifica prima dei 25 anni (Bäumer et al, 2010; Zou et al, 2015).

L'incidenza mondiale di questa patologia è di circa 2 individui per 100.000 abitanti, ed è abbastanza uniforme, tranne che per la penisola di Kii (Giappone) e per l'isola di Guam (Oceano Pacifico Occidentale), dove è stata registrata un'incidenza più elevata rispetto a quanto osservato a livello mondiale (Ferraiuolo et al, 2011).

Sono stati riportati dati epidemiologici sulla SLA in Europa relativi al biennio 1998-1999 basandosi su sei registri compilati in Irlanda, Regno Unito e Italia. Questo studio ha riportato che l'incidenza della SLA in Europa è piuttosto uniforme e corrisponde a 2,1 casi per 100.000 persone/anno; inoltre è stata registrata un'incidenza più elevata tra gli uomini (3 casi per 100.000 persone/anno) che nelle donne (2,4 casi per 100.000 persone/anno) (Logroscino et al, 2010).

Eziologia e meccanismi patogenetici nella SLA

Le cause della SLA non sono state ancora identificate ma è comunque ormai accertato che si tratta di una malattia multifattoriale, la cui insorgenza è determinata dall'interazione fra fattori genetici e ambientali. La componente genetica riguarda mutazioni di un certo numero di geni che sono stati individuati essere la causa dei casi di SLA familiare, giocherebbero un ruolo importante anche i fattori tossico-ambientali come l'esposizione a metalli pesanti (Mitchel, 2000), l'esposizione a sostanze tossiche presenti nell'ambiente, quali pesticidi, o l'esposizione a sostanze nocive nell'ambito dell'attività lavorativa (Armon, 2001). Il fatto che fra gli indigeni Chomorro dell'isola di Guam si sia registrata un'elevata incidenza di SLA ha rafforzato l'ipotesi che l'esposizione ad agenti tossici sia legato all'insorgenza di questa patologia. In questa popolazione si è registrata un'elevata incidenza di una forma particolare di SLA, una patologia degenerativa che presenta delle caratteristiche comuni alla SLA, al Parkinson e all'Alzheimer (Cox and Sachs, 2002); è stata avanzata l'ipotesi che alla base di questa elevata incidenza ci sia l'abitudine dei nativi di nutrirsi di pipistrelli che a loro volta si cibano di semi di cycas, la cui tossicità è determinata dalla presenza di una neurotossina la β -methilamino-alanina (BMAA).

In questi anni sono state raccolte evidenze che diversi meccanismi possono contribuire in maniera sinergica alla sofferenza motoneuronale. La particolare vulnerabilità di questa cellula può dipendere da vari fattori: grandi dimensioni, complessità del citoscheletro, trasporto assonale con conseguente elevatissima richiesta energetica, maggiore propensione all'apoptosi.

E' stato dimostrato il coinvolgimento di diversi meccanismi patogenetici nella degenerazione dei motoneuroni nella SLA:

Stress ossidativo

In condizioni fisiologiche, le cellule producono e rilasciano specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali radicale anionico superossido (O_2^-), acqua ossigenata (H_2O_2) e radicale idrossile ($\cdot OH$), che sono potenzialmente dannosi per la cellula. Infatti queste molecole, in particolare il radicale idrossile, possono reagire con tutte le macromolecole biologiche (lipidi, proteine, acidi nucleici e carboidrati), ossidandole. Queste modificazioni ossidative sono implicate nell'insorgere o nella progressione di vari stati fisiopatologici. La cellula dispone di sistemi di difesa anti-radicali, antiossidanti

enzimatici (quali catalasi, glutatione perossidasi/reduccasi e superossido dismutasi) e non enzimatici (vitamina E, vitamina C, glutatione e acido urico). Il termine stress ossidativo indica uno squilibrio fra la produzione di ROS e la capacità dell'organismo di rimuovere queste molecole. L'accumulo di ROS in cellule come i neuroni, che hanno perso la loro capacità replicativa, rappresenta uno dei fattori che induce danno cellulare, e questo potrebbe essere correlato con lo sviluppo di malattie neurodegenerative (Ferraiuolo et al, 2011).

E' stato inoltre riportato, che tra gli mRNA più suscettibili all'ossidazione da parte dei ROS ci sarebbero quelli di relativi a proteine della catena mitocondriale di trasporto degli elettroni, proteine implicate in processi di biosintesi, di pathways quali il ripiegamento e la degradazione proteica, la mielinizzazione, proteine del citoscheletro, proteine della glicolisi e del ciclo degli acidi tricarbossilici (Chang et al, 2008); inoltre nei tessuti post-mortem di pazienti SLA (sporadica e familiare per mutazione del gene SOD1) sono stati osservati segni di danno ossidativo a carico di proteine (Shaw et al, 1995a), lipidi (Shibata et al, 2001) e acidi nucleici (Fitzmaurice et al, 1996).

Lo stress ossidativo è uno dei meccanismi che entra in gioco in casi di SLA legati a mutazioni nel gene che codifica per la SOD1, dal momento che tale enzima ha la specifica funzione di rimuovere la specie reattiva anione superossido (Kaur et al., 2016). Recenti studi hanno inoltre evidenziato danni da stress ossidativo in linee cellulari motoneuronali SLA con mutazioni TDP-43 (Duan et al, 2010).

Disfunzione mitocondriale

I mitocondri hanno un ruolo centrale nella produzione di energia a livello intracellulare, nel controllo dell'omeostasi del calcio e dell'apoptosi. Numerosi lavori suggeriscono che alterazioni morfologiche e funzionali dei mitocondri contribuiscono alla patogenesi della SLA. E' stata infatti osservata una loro alterata morfologia nei muscoli scheletrici e nei motoneuroni di pazienti SLA (Sasaki and Ivata, 2007).

Recentemente è stata scoperta una mutazione missenso nel gene che codifica per la proteina mitocondriale CHCHD10 localizzata a livello dello spazio intermembrana, in una famiglia francese in cui sono stati documentati fenotipi in cui venivano manifestati segni tipici della SLA e deficit cognitivi simili alla demenza frontotemporale, atassia e miopatia; è stato ipotizzato che questa proteina sia coinvolta nel mantenimento e nel rimodellamento delle creste mitocondriali, dal momento che è stata osservata un'alterazione della morfologia delle creste mitocondriali in pazienti con questa mutazione (Bannwarth et al., 2014).

La localizzazione di SOD1 mutata nei mitocondri del midollo spinale di modelli murini di SLA (Tafari et al, 2015) suggerisce un coinvolgimento di questa proteina nel danno mitocondriale associato alla SLA. La SOD1 è infatti associata alla proteina Bcl2 a livello della membrana mitocondriale esterna e le forme mutate alterano il fisiologico legame SOD1-Bcl2 (Pasinelli et al, 2004) favorendo l'esposizione sulla Bcl2 del suo dominio tossico (di morte) BH3 (Pedrini et al, 2010).

Oltre alla produzione di energia, i mitocondri svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi del calcio. Recenti studi hanno dimostrato delle disfunzioni nella regolazione del calcio intracellulare in pazienti SLA, con una diminuzione dell'espressione di proteine leganti il calcio (Alexianu et al, 1994; Jaiswal, 2013).

Eccitotossicità

Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale ed esercita i suoi effetti attraverso recettori postsinaptici ionotropici e metabotropici; la rimozione del glutammato dallo spazio sinaptico è effettuato da trasportatori deputati al reuptake di questo neurotrasmettitore, il più abbondante dei quali è l'EAAT2 (excitatory amino acid transporter), espresso dagli astrociti. L'eccessiva attivazione dei recettori del glutammato (determinato dall'aumento dei livelli di glutammato a livello sinaptico, o dall'aumento della sensibilità dei neuroni postsinaptici al glutammato) avrebbe un effetto tossico, dal momento che questo comprometterebbe l'omeostasi del calcio intracellulare, con la conseguente attivazione di una serie di enzimi proteolitici e di enzimi che promuovono la formazione di ROS (Arundine and Tymianski, 2003).

Nella corteccia motoria e nel midollo spinale di pazienti SLA e modelli animali della malattia, diminuisce l'espressione negli astrociti del trasportatore del glutammato EAAT2, che induce un aumento del glutammato intracellulare, iperstimolazione dei recettori e degenerazione neuronale da danno eccitotossico (Lin et al 1998). Questo porta poi ad un aumento del calcio intracellulare, che determina una eccessiva attività dei motoneuroni e dà inizio ad una serie di processi biochimici dannosi per la cellula, caratteristici della patogenesi della SLA sia sporadica che familiare (Vucic et al., 2014)

La tossicità da glutammato sarebbe mediata dai recettori AMPA, che sono in genere impermeabili al calcio grazie alla presenza della subunità GluR2. Nei motoneuroni invece l'espressione della sub unità GluR2 è molto bassa, e questo rende i recettori permeabili al calcio (Williams et al, 1997). Questo fatto, associato alla bassa espressione nei motoneuroni anche di proteine leganti il calcio (Ince et al, 1993), comprometterebbe quindi la regolazione dell'omeostasi di tale ione

A favore della teoria secondo la quale la SLA sarebbe legata ad un eccesso di glutammato è stata la rilevazione di alti livelli di glutammato nel fluido cerebrospinale di pazienti affetti da SLA (Shaw et al, 1995b)

Stress del reticolo endoplasmatico

L'accumulo a livello intracellulare di proteine mal ripiegate o non ripiegate è una caratteristica patologica della SLA. Peptidi e proteine anomale nel reticolo endoplasmatico attivano il sistema UPR (unfolded-protein response), che consiste nel riconoscimento di queste proteine da parte di chaperonine presenti nel lume del reticolo, che provvedono al corretto ripiegamento delle proteine malripiegate, per prevenire l'aggregazione proteica e favorire la corretta conformazione delle proteine. Le proteine non funzionanti attivano delle vie molecolari che favoriscono la degradazione delle proteine anomale (Kaufman, 2002; Yamagishi et al, 2007). Si pensa che questo meccanismo abbia un ruolo citoprotettivo, e una sua alterazione porterebbe all'accumulo di proteine aggregate all'interno dei neuroni con conseguente degenerazione (Hitomi et al, 2004).

Ruolo delle cellule non-neuronali (astrociti e microglia) e neuroinfiammazione

L'attivazione degli astrociti svolge un ruolo molto importante nella patogenesi e nella progressione della SLA (Boillée et al, 2006)

Si è diffuso il concetto che nella SLA la morte dei motoneuroni non coinvolga solo tali cellule, ma che svolgano un ruolo cruciale anche le vicine cellule della glia.

È stato visto infatti che astrociti di roditori che esprimono la SOD1 mutata hanno un ruolo attivo nella degenerazione dei motoneuroni, attraverso il rilascio di fattori tossici e grazie all'amplificazione della risposta infiammatoria mediata dalla microglia (Di Giorgio et al, 2007, 2008; Nagai et al 2007). Questa idea è stata confermata da degli studi in cui è stato visto che in topi chimerici esprimenti mSOD1, motoneuroni normali (in cui la SOD 1 non risulta mutata) sviluppavano segni di tossicità quando circondati da cellule della glia esprimenti mSOD1 (Clement et al, 2003).

Meccanismi di eliminazione di proteine intracellulari.

L'autofagia è un meccanismo attraverso il quale avviene la regolazione del turnover dei componenti del citoplasma e la rimozione degli organelli danneggiati.

È stato dimostrato che l'accumulo di aggregati intracellulari nei motoneuroni SLA è associato con un sistema di autofagia difettoso. Infatti la stimolazione dell'autofagia con basse dosi di litio determina la riduzione degli aggregati intracellulari patologici contenenti α -sinucleina, ubiquitina e SOD1 mutata, nei motoneuroni del midollo spinale (Fornai et al 2008), mentre la sua inibizione determina lievi effetti su motoneuroni normali, ma effetti devastanti in motoneuroni di un modello murino di SLA (Fornai et al, 2008).

Alterazioni del sistema di trasporto assonico.

Nei motoneuroni, che sono cellule altamente polarizzate, con lunghi assoni, il trasporto assonico è molto importante perché garantisce il trasporto di componenti essenziali (RNA, proteine e organelli) al compartimento assonale e in particolare a livello della giunzione neuromuscolare che comprende le strutture sinaptiche (Ferraiuolo et al, 2011). Il trasporto assonico avviene grazie a delle proteine associate ai microtubuli: la dineina che media il trasporto verso la giunzione neuromuscolare (trasporto anterogrado) e la chinesina che effettua invece quello verso il corpo cellulare (trasporto retrogrado).

È stato osservato che la proteina SOD1 mutata interagisce con l'mRNA della catena leggera dei neurofilamenti e con il complesso dineina/dinactina, suggerendo che mutazioni nel gene SOD1 possono esercitare un effetto tossico anche attraverso la compromissione dell'attività del citoscheletro e quindi del trasporto assonale (Andersen, 2006)

Formazione di aggregati proteici.

Gli aggregati proteici sono una caratteristica patologica di un gran numero di malattie neurodegenerative: ne sono un esempio le placche extracellulari di proteina beta amiloide e gli aggregati neurofibrillari intracellulari della proteina tau della malattia di Alzheimer o i corpi di Lewy nella malattia di Parkinson (Lansbury, et al, 2006). Gli aggregati proteici patologici sono anche una caratteristica della SLA e si presentano sottoforma di inclusioni ubiquitinate, sia nei neuroni che nelle glia, sia nella sostanza grigia sia in quella bianca.

Nel 2006 è stata identificata la proteina TDP-43 come principale componente delle inclusioni ubiquitinate nei tessuti post-mortem dei pazienti SLA e di pazienti affetti da demenza frontotemporale (Mackenzie et al, 2007; Neumann et al, 2006). A partire da questa osservazione, sono state identificate diverse mutazioni a carico del gene *TARDBP*, che codifica per la TDP-43, che sono responsabili del 4% dei casi di SLA familiare e dell'1,5% dei casi di SLA sporadica (Mackenzie et al, 2010).

Alterazioni nel metabolismo dell'RNA

Alterazioni del metabolismo dell'RNA riguardano diverse malattie neurodegenerative. In particolare nella SLA sono stati identificati diversi geni, le cui mutazioni causano la malattia, che codificano per proteine coinvolte nel metabolismo dell'RNA, come TDP-43, FUS, sentaxin, angiogenin ecc. (van Blitterswijk M. and Landers, 2010); questo porta ad alterazioni nella trascrizione e nello splicing di pre-mRNA (Singh et al, 2012) e alla disregolazione della sintesi proteica (Le Quesne et al, 2010).

Studi effettuati a livello del trascrittoma suggeriscono che mutazioni patogeniche legate alla SLA, fra cui quelle identificate nel gene *TARDBP*, determinano un cambiamento nell'espressione di geni che codificano per proteine implicate nella plasticità e funzionalità sinaptica (Walsh et al, 2015).

Ad esempio in larve di *Drosophila* mutanti per la proteina TDP-43, è stata osservata un'alterazione dell'organizzazione del citoscheletro a livello sinaptico dovuta alla downregolazione della proteina associata ai microtubuli futsch/MAP1B. Il messaggero di questa proteina interagisce con la TDP-43, e quindi la sua mutazione ne determina una diminuzione dell'espressione e quindi i difetti a livello sinaptico (Godena et al, 2011). La proteina futsch è una proteina specifica dei neuroni che lega i microtubuli, omologa della proteina umana MAP1B responsabile del mantenimento dell'integrità dei microtubuli durante l'espansione della giunzione neuromuscolare (Hummel et al, 2000)

Basi genetiche della SLA

Le prime mutazioni in casi di SLA familiare sono state identificate nel 1993 nel gene che codifica per la superossido dismutasi 1 (SOD1), (Rosen et al, 1993). Attualmente sono state associate alla SLA più di 150 mutazioni nel gene *SOD1*, principalmente puntiformi, che sono responsabili del 20% dei casi di SLA familiare (Barber et al 2010, Synofzik et al., 2012). La maggior parte degli studi riguardanti la patogenesi della SLA e lo sviluppo di strategie terapeutiche sono stati condotti utilizzando modelli transgenici SOD1.

Il gene *SOD1*, localizzato sul cromosoma 21q22, codifica per il più importante enzima antiossidante della cellula eucariota, responsabile della conversione dell'anione superossido (O_2^-) in ossigeno molecolare (O_2) e perossido di idrogeno (H_2O_2).

La maggior parte degli studi indicano che mutazioni a carico del gene *SOD1* contribuirebbero all'insorgenza della SLA a causa dell'acquisizione di una funzione tossica da parte delle forme mutate (gain of function), piuttosto che a causa di una perdita di funzione (loss of function); infatti è stato osservato che in alcuni casi di SLA familiare associati a mutazioni nel gene *SOD1*, l'attività enzimatica della proteina veniva mantenuta (Borchelt et al, 1994); inoltre topi knock-out per la SOD1 non mostravano nessun sintomo tipico della SLA, mentre topi transgenici esprimenti la SOD1 umana mutata, sviluppavano tipici sintomi della SLA, nonostante mantenessero l'espressione della SOD1 endogena non mutata; inoltre in questi ultimi modelli murini transgenici, l'overespressione della SOD1 umana wild type non determinava una riduzione dei segni tipici di questa patologia (Bruijn et al, 1998).

Più recentemente, numerose ricerche hanno portato all'identificazione di mutazioni in altri geni legati alla SLA, le più comuni sono relative al gene *TARDBP* che codifica per la TDP-43 (Mackenzie et al, 2010; Corrado et al, 2009) e al gene che codifica per la proteina FUS (Kwiatkowski et al, 2009; Hewitt et al, 2010), e l'espansione esonucleotidica GGGGCC a livello del primo introne del gene *C9ORF72* (Sabatelli et al, 2012). Sono state poi identificate mutazioni a carico di altri geni, che causano SLA familiare, ma con una frequenza molto inferiore (Marangi and Traynor, 2015); fra questi, i geni che codificano per le seguenti proteine: l'alsina (ALSIN) (Yang et al, 2001), la senataxina (SETX) (Chen et al, 2004), la proteina B associata a vescicole di membrana (VAPB) (Nishimura et al, 2004), l'angiogenina (ANG) (Greenway et al,

2006), D-amino acid oxidasi (DAO) (Mitchell et al, 2010), optineurina (OPTN) (Maruyama et al, 2010) e valocin-containing protein (VCP); (Johnson et al, 2010)

Le mutazioni nei geni *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* e *C9ORF72* spiegano più della metà dei casi SLA familiare (Renton et al., 2014), anche se con una diversa distribuzione. Uno studio epidemiologico condotto su un totale di 1757 pazienti italiani con SLA sporadica (negativi per mutazioni geniche *SOD1*, *TARDBP* e *FUS*), ha messo in evidenza l'espansione esonucleotidica GGGGCC a livello del primo introne del gene *C9ORF72* nel 3,6% dei pazienti provenienti dalla penisola, nel 4,9% di origine siciliana e nel 6,8% di origine sarda (Sabatelli et al, 2012).

Esaminando invece individui con SLA familiare, l'espansione esonucleotidica in *C9ORF72*, è stata rilevata nel 37,5% dei pazienti provenienti dalla penisola italiana e nel 22% dei pazienti provenienti dalla Germania (Chiò et al, 2012).

Questi studi rivelano che in Italia i casi di SLA legati all'espansione patologica in *C9ORF72* sono molto frequenti, e che tale mutazione risulta essere la più frequente, anche se inferiore ad altre popolazioni di origine europea come gli Irlandesi, le popolazioni germaniche e quelle americane di origine caucasica (Dejesus-Hernandez, et al 2011; Gijssels et al, 2012; Renton et al, 2011)

L'espansione in *C9ORF72* è una mutazione molto frequente anche in Sardegna (un quinto dei casi SLA familiare nell'isola è legato a questa mutazione) (Chiò et al, 2012; Sabatelli et al, 2012) anche se la più frequente risulta essere la mutazione missenso nel gene *TARDBP* in cui l'alanina è sostituita in posizione 382 dalla treonina (Chiò et al, 2011; Orrù et al, 2012). Questa mutazione è presente in quasi il 30% dei pazienti SLA sardi, e nella maggior parte dei pazienti con SLA familiare (Chiò et al, 2011; Orrù et al, 2012).

Queste percentuali così elevate suggeriscono che i malati con questa mutazione avrebbero un antenato comune e quindi ci sarebbe un effetto fondatore, che con l'isolamento geografico avrebbe poi contribuito all'elevata frequenza della mutazione.

TDP-43

La TDP-43, codificata dal gene *TARDBP*, localizzato nel cromosoma 1 (locus 1p36), è una proteina di 414 aminoacidi, dal peso molecolare di 43 kDa; il suo nome deriva dalla sua capacità di legare la regione TAR (transactivation response region) del DNA dell'HIV (Ou et al., 1995). È una proteina altamente conservata a livello evolutivo, espressa in maniera ubiquitaria a livello di tutti i tessuti, e risulta altamente espressa a livello del sistema nervoso (Sephton et al., 2010). Dal punto di vista strutturale la TDP-43 appartiene a una famiglia di proteine che legano l'RNA, conosciute come hnRNPs: heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (Buratti and Baralle, 2001) ed è normalmente espressa a livella nucleare (Nishimura et al, 2010).

La TDP-43 :presenta cinque regioni funzionali (Ayala et al., 2008a):

- ✓ Due motivi di riconoscimento dell'RNA: RRM1 e RRM2; permettono alla TDP-43 di interagire col filamento singolo di RNA e del DNA (Buratti and Baralle, 2001)
- ✓ Un segnale di localizzazione nucleare NLS
- ✓ Un segnale di esportazione nucleare, che media lo shuttling tra nucleo e citoplasma
- ✓ Una regione C-terminale; questa porzione di proteina comprende una sequenza aminoacidica ricca in glicina codificata dall'esone 6 che media le interazioni proteina-proteina, il legame quindi con altre hnRNPs (Buratti et al., 2005). In questa regione ricca in glicina, si trova la maggior parte delle mutazioni genetiche identificate (Del Bo et al., 2009; Kabashi et al., 2008; Kuhnlein et al., 2008; Rutherford et al., 2008; Van Deerlin et al., 2008) e di queste, più di quaranta sono state trovate in pazienti affetti da SLA (Dewey et al, 2012). All'interno della porzione C-terminale si trova anche un dominio Q/N, ricco in residui di glutammina (Q) e asparagina (N), che conferirebbe alla TDP-43 la capacità di aggregarsi; è stato inoltre ipotizzato che questo conferisca alla proteina delle proprietà prion-like (Funtealba et al., 2010). La TDP-43 regola diversi aspetti del metabolismo dell'RNA: trascrizione, splicing alternativo, stabilità dei pre-mRNA, trasporto (Chen-Plotkin et al, 2010). Sono state fatte diverse ipotesi sul ruolo della TDP-43 nel processo di neurodegenerazione e in che modo le mutazioni nel gene *TARDBP* determinino questo processo.

La neurodegenerazione potrebbe derivare dall'acquisizione di una funzione tossica (gain of function) oppure dalla perdita di funzione della proteina mutata. In letteratura sono presenti diversi modelli di gain of function generati in varie specie: vermi, insetti, uccelli, pesci e roditori; in tutti modelli, con rare eccezioni, è stato documentato che una over-espressione della proteina TDP-43, sia la forma wild type, sia la forma mutata possono causare un fenotipo con segni di neurodegenerazione e questo suggerisce che la gain of function può essere determinata dall'iperattivazione della TDP-43, non solo a causa dell'acquisto di una nuova funzione tossica da parte della proteina mutata (Da Cruz and Cleveland 2011).

Anche l'ipotesi della perdita di funzione potrebbe spiegare alcuni meccanismi patogenetici caratteristici della SLA (Xu, 2012). È stato dimostrato che il knockout della proteina presenta effetti deleteri anche su altri distretti corporei oltre che sul sistema nervoso; per esempio il suo knockout determina morte embrionale nei roditori (Kraemer et al, 2010; Wu et al 2010;) e nei topi adulti una rapida perdita della massa grassa e letalità (Chiang et al, 2010). Riguardo al sistema nervoso, il knockdown della TDP-43 determina alterazioni morfologiche e morte cellulare nei neuroni in coltura (Iguchi et al, 2009; Yang et al, 2010; van Eersel, 2011) e modificazioni nell'espressione di diversi geni a livello del sistema nervoso centrale (Polymenidou et al 2011; Tollervey et al, 2011). Inoltre l'importanza della TDP43 per lo sviluppo e il funzionamento del sistema nervoso è stato ampiamente documentato in vivo in specie non-mammiferi: nelle Drosophile il knockdown della TDP-43 porta ad una degenerazione a livello degli assoni e problemi nella locomozione (Li et al, 2010), mentre in embrioni di zebrafish determina una compromissione della crescita assonale dei motoneuroni e dell'attività motoria (Kabashi et al, 2010). La perdita di funzione della TDP43 in Drosophila (mediante knock down o mutazione) determina una riduzione delle ramificazioni dei dendriti, riduce la vitalità e la velocità nei movimenti (Lu et al, 2009; Wang et al, 2011). Un'altra ipotesi relativa al meccanismo attraverso il quale le mutazioni nel gene *TARDBP* causano neurodegenerazione propone una loss of function della proteina dovuta alla maggiore propensione della proteina mutata di formare aggregati citoplasmatici rispetto alla proteina wild type (Johnson et al, 2009; Guo et al, 2011; Nonaka et al, 2009); le forme mutate infatti potrebbero iniziare e indurre l'aggregazione della proteina, sottraendo in questo modo la TDP-43 dal nucleo, come osservato nei tessuti autoptici post-mortem dei pazienti SLA (Arai et al, 2006; Lee et al, 2011; Neumann et al, 2006). Inoltre la TDP-43 mutata presenta una maggiore suscettibilità

alla frammentazione portando alla formazione di frammenti C-terminali dal peso molecolare di 25 kDa e 35 kDa, che vengono esclusi dal nucleo e hanno un'elevata propensione ad aggregarsi (Chen-Plotkin et al, 2010; Igaz et al 2009; Kabashi et al, 2008; Nonaka et al, 2009 Rutherford et al, 2008; Yang et al, 2010;). Questi frammenti possono co-aggregarsi alla TDP-43 non mutata, sequestrandola dal nucleo e incorporandola in queste inclusioni (Yang et al, 2010), che come già scritto precedentemente sono una caratteristica neuropatologica tipica dei tessuti post-mortem SLA e FTD. Le inclusioni citoplasmatiche TDP-43 sono ubiquitinate e iperfosforilate (phospho-Ser409/410) e sono caratterizzate da questi frammenti C-terminali (Chen-Plotkin et al, 2010; Warraich et al, 2010). Studi in vitro su modelli cellulari hanno riproposto queste caratteristiche istopatologiche, documentando la presenza di aggregati citoplasmatici in cui si potevano osservare i frammenti C-terminali di TDP-43 ubiquitinati e fosforilati (Nonaka et al, 2009; Igaz et al, 2009; Zhang et al, 2009); inoltre la transfezione con questi costrutti ha determinato neurotossicità e morte cellulare attraverso un meccanismo che non è stato però ben chiarito (Zhang et al, 2009).

Per capire in che modo mutazioni nella TDP-43 possano causare neurodegenerazione mediante acquisizione di una funzione tossica, sono stati creati dei modelli in cui la proteina mutata risultava overespressa; ma il fenotipo neurodegenerativo osservato potrebbe dipendere non solo dalla mutazione, ma anche dalla overespressione della proteina. Infatti è stato osservato che anche l'overespressione della TDP-43 wild type determina un fenotipo neurotossico (Kabashi et al, 2010; Stallings et al 2010; Wils et al, 2010, Xu et al, 2010), e questo può essere spiegato col fatto che mediante un meccanismo di feedback negativo, un' overespressione della TDP-43 wild-type produrrebbe una soppressione della TDP-43 endogena (Ayala et al, 2011b; Igaz et al, 2011; Xu et al, 2010). Tuttavia diversi modelli hanno dimostrato che l'overespressione della TDP-43 mutata è più efficace nel determinare neurodegenerazione rispetto all'overespressione della TDP-43 wild-type (Barmada et al, 2010; Kabashi et al, 2010); In *C. elegans* l'espressione della TDP-43 umana wild type causa un fenotipo caratterizzato da un moderato deficit motorio, mentre l'espressione delle varianti mutate della proteina, tipiche della SLA (G290A, A315T, o M337V) determina una grave compromissione dell'attività motoria (Liachko et al, 2010).

La porzione C-terminale della TDP-43 svolge un ruolo importante nella propensione di questa proteina a formare aggregati (Johnson et al, 2009). Infatti è stato documentato

che le mutazioni Q331K, M337V, che interessano la regione C.-terminale, accelerano l'aggregazione della TDP-43.

I risultati riportati da questo studio possono essere correlate all'ipotesi secondo la quale la TDP-43 sia implicata nel processo di neurodegenerazione nella SLA e nella FTLD-TDP a causa delle sue proprietà prion-like conferitele, come già accennato precedentemente, dal dominio (Q/N), localizzato nel residuo 274-414 della proteina a livello della porzione C-terminale (Cushman et al, 2010)

I neuroni dei tessuti post-mortem dei pazienti non solo contengono inclusioni citoplasmatiche di TDP-43 ma presentano anche una riduzione dei livelli di TDP-43 a livello nucleare, quindi i potenziali meccanismi attraverso cui la TDP-43 potrebbe esercitare neurodegenerazione, potrebbero avvenire sia a causa della perdita della sua normale funzione a livello nucleare in seguito alla sua localizzazione anomala nel citoplasma, sia a causa dell'acquisizione di una funzione tossica dovuta alla formazione di aggregati citoplasmatici.

Il coinvolgimento della TDP-43 nel meccanismo di neurodegenerazione è riconducibile al fatto che si tratti di una proteina, che regola diversi aspetti del metabolismo degli RNA e in particolare di quelli coinvolti nel funzionamento del sistema nervoso, come ad esempio proteine implicate nel processo apoptotico, nell'attività sinaptica, proteine del citoscheletro (Colombrita et al, 2015).

La TDP-43 regola lo splicing di numerosi trascritti che codificano per proteine implicate nella sopravvivenza neuronale, nello sviluppo delle malattie neurodegenerative, nel trasporto assonico (Colombrita et al, 2015) un esempio è dato dalla proteina Delta-catenina (CTNND1) che gioca un ruolo importante nello sviluppo e nel mantenimento delle spine dendritiche (Matter et al, 2009 Tollervey et al, 2011). L'inibizione dell'espressione della TDP-43 nello striato di modelli murini adulti, determina l'alterazione del livello di espressione di 601 trascritti e la modificazione dello splicing di 965 di mRNA fra cui quelli di proteine implicate nella neurodegenerazione e nell'attività sinaptica, ne sono un esempio FUS, la progranulina e la colina acetil transferasi (Polymenidou et al, 2011).

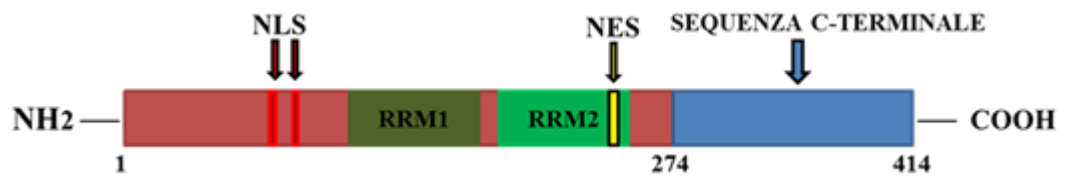


Fig.1 Rappresentazione della struttura della TDP-43

LEGENDA: RRM1 e RRM2: sequenze che riconoscono e legano l'mRNA

NLS: sequenza di localizzazione nucleare

NES: sequenza di esportazione nucleare

Granuli da stress

I granuli da stress sono strutture citoplasmatiche prive di membrana che compaiono nelle cellule esposte a diversi tipi di stress: stress ossidativo, shock termico, infezione virale, radiazioni UV; sono costituiti da proteine e RNA messaggeri la cui traduzione viene momentaneamente interrotta (Anderson and Kedersha, 2009). I granuli si formano in seguito all'attivazione di un meccanismo che prevede l'inibizione della traduzione degli mRNA di geni house-keeping, con l'obiettivo di preservare energia per innescare meccanismi di riparo dei danni prodotti dagli agenti stressogeni a cui la cellula è stata sottoposta. Questa energia infatti viene utilizzata dalla cellula per incrementare la sintesi di proteine deputate al riparo del DNA, chaperoni, fattori di trascrizione (Anderson and Kedersha 2008).

La formazione dei granuli da stress è un meccanismo altamente conservato (Anderson and Kedersha, 2008; Buchan and Parker, 2009; Thomas et al, 2011), ed è stato studiato in diversi sistemi: lieviti (Buchan et al, 2010; Groušl et al, 2009), triponosomatidi (una famiglia di protozoi) (Kramer et al, 2008), mammiferi (Anderson and Kedersha, 2002; Arrigo et al, 1988; Kedersha et al, 1999). Inoltre non si tratta di un artefatto in vitro tipico delle cellule in coltura, dal momento che tali strutture sono state osservate anche nei tessuti di animali sottoposti a situazioni di stress (De Gracia et al 2006; Kayali et al, 2005). La formazione dei granuli da stress viene innescata da un meccanismo che determina la fosforilazione della eIF2 α , un componente dell'apparato molecolare deputato all'inizio della traduzione delle proteine. La fosforilazione di tale proteina blocca il processo di traduzione proteica e viene effettuata da delle chinasi; si tratta di quattro chinasi, ciascuna delle quali è attivata da uno specifico tipo di stress:

- PKR, viene attivata in seguito a shock termico, radiazioni UV infezioni virali (Srivastava et al, 1998; Williams, 2001)
- PERK viene attivata in seguito all'accumulo di proteine malripiegate nel lume del reticolo endoplasmatico (Harding et al, 2000)
- HRI viene attivata in seguito a stress ossidativo (McEwen et al, 2005)
- GCN2 viene attivata in seguito alla mancanza di aminoacidi e alla riduzione della disponibilità di nutrienti (Wek et al, 1995)

La composizione e la morfologia dei granuli da stress varia a seconda del tipo di modello cellulare e dell'agente stressogeno che ne ha indotto la formazione (Buchan et

al, 2011; Guil et al, 2006), anche se un certo numero di proteine sono componenti obbligatori e ne costituiscono il 'core'. Fra queste proteine, le più importanti sono TIA-1, TIAR, eIF3 e eIF4G e la proteina G3BP (Anderson and Kedersha, 2006).

Inizialmente i granuli da stress sono piccoli, ma le loro dimensioni aumentano mano a mano che le RNA binding protein si legano fra loro attraverso i loro domini ricchi in glicina; le proteine TIA-1, TIAR, e G3BP sono le principali proteine che costituiscono il nucleo dei granuli da stress; in seguito vengono reclutate altre proteine tra cui HuR (Wolozin, 2012), TDP-43 e FUS e altre proteine come hnRNPA1 (Bosco et al, 2010; Guil et al 2006), elicasi (p54/Rck/DDX6) (Wilczynska et al, 2005), ribonucleasi (XRN1) (Kedersha et al, 2005). Alcuni autori riportano che nei granuli da stress vengono incorporate proteine pro-apoptotiche come RACK1, ROCK1 e TRAF2 e questo suggerisce che la formazione dei granuli da stress sia un meccanismo che inibisce l'apoptosi e che quindi abbia un ruolo citoprotettivo (Arimoto et al, 2008; Kim et al, 2005). Il ruolo citoprotettivo dei granuli da stress è dimostrato dal fatto che il knockdown di alcune proteine indispensabili per il loro assemblamento, come TIA-1 o l'inibizione della fosforilazione del fattore eIF2 α , rende le cellule più vulnerabili allo stress acuto (Jiang et al, 2003; Philips et al, 2004).

La formazione dei granuli da stress è un meccanismo reversibile, infatti dopo 1-3 h dalla rimozione dello stress si disassemblano (Kedersha et al, 1999); di solito la defosforilazione del fattore eIF2 α (Moreno et al, 2012), è determinata in maniera selettiva dalla fosfatasi GAAD34, favorendo la dispersione dei granuli da stress e la ripresa della traduzione delle proteine.

Le proteine del citoscheletro sono coinvolte nella dinamica dei granuli da stress in quanto è stato dimostrato in vitro che il trasporto anterogrado mediato dalla chinesina media il processo di dissoluzione di queste strutture citoplasmatiche mentre la dineina è implicata nel loro assemblamento (Loschi et al, 2009).

La TDP-43 sembrerebbe svolgere un ruolo importante nella formazione dei granuli da stress anche se la sua funzione non è stata del tutto chiarita. Sono stati effettuati diversi studi utilizzando differenti tipi di colture cellulari e diversi tipi di agenti stressogeni. La TDP-43 si localizza nei granuli in molti studi, ma non in tutti, probabilmente in relazione al tipo di cellule utilizzate e al tipo di stress (Dewey et al, 2012).

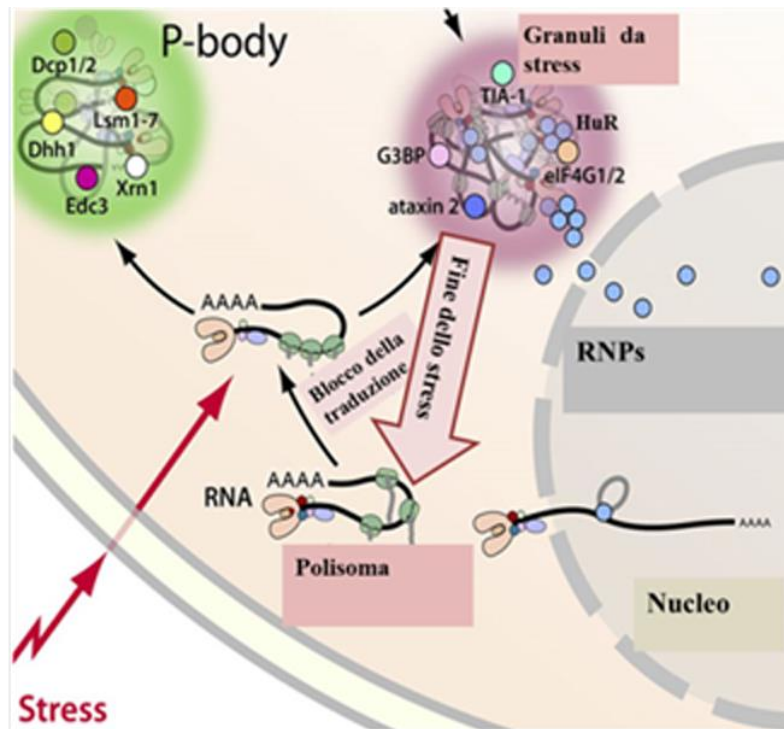


Fig.2 Granuli da stress.
Immagine modificata da Li et al, 2013

SCOPO DEL LAVORO

Alla luce di quanto esposto, l'obiettivo dello studio condotto nella mia tesi, è stato quello di valutare l'effetto della mutazione *TARDBP*^{A382T} nei meccanismi di neurodegenerazione associati alla SLA. A questo scopo ho utilizzato come modello di studio le colture primarie di fibroblasti umani, isolati da prelievi di cute di pazienti affetti da SLA sia familiare con la mutazione *TARDBP*^{A382T}, che sporadica, e di controlli sani.

In particolare ho valutato le differenze tra i diversi campioni nella risposta a situazioni di stress, soprattutto in relazione alla formazione dei granuli da stress.

MATERIALI E METODI

Allestimento di colture primarie di fibroblasti umani

Le colture primarie di fibroblasti umani sono state allestite dal Dott. Sandro Orrù, della sezione di Genetica medica del Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università di Cagliari e provengono da prelievi di cute della medesima zona del braccio di individui:

- Malati SLA con mutazione *TARDBP*^{A382T}
- Malati SLA senza mutazioni conosciute (wild type per i loci *SOD1*, *C9ORF72* e *FUS*)
- Controlli sani

I prelievi sono stati effettuati con il consenso informato dei soggetti donatori.

Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM), con alta concentrazione di glucosio (4,5 g/L), al quale sono stati aggiunti siero bovino fetale (FBS), al 20%, e una soluzione penicillina/streptomicina (10000 unità penicillina e 10 mg streptomicina per mL in 0,9% NaCl) all'1% (tutti della Sigma Aldrich, ST). Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37 °C in atmosfera arricchita di CO₂ al 4,5%.

Induzione di stress ossidativo

Per indurre la formazione di granuli da stress i fibroblasti sono stati sottoposti a stress ossidativo utilizzando la sodio arsenite; 24 ore prima del trattamento, le cellule sono state seminate in capsule petri da 30 mm di diametro, contenenti vetrini coprioggetto sterili (80.000 cellule/piastra). Le cellule sono state incubate con sodio arsenite 0,5 mM diluita nel terreno completo (per 30 e 60 minuti); dopo il trattamento, in alcuni casi, il terreno addizionato con sodio arsenite è stato sostituito dal medium di crescita privo dell'agente stressogeno, per permettere alle cellule di ripristinare le condizioni iniziali (recovery); i fibroblasti sono stati mantenuti in queste condizioni per diversi intervalli di tempo (30, 60 minuti) prima di essere fissati per l'immunocitochimica.

Nella seguente tabella sono indicati i diversi trattamenti effettuati:

Trattamento con sodio arsenite	recovery
30 min	
30 min	30 min
30 min	60 min
60 min	
60 min	30 min
60 min	60 min

Immunocitochimica

Dopo il trattamento, le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% per 15 minuti e dopo un lavaggio in PBS, sono state incubate con metanolo ghiacciato per 5 minuti.

Successivamente, sono state permeabilizzate con PBS-Triton X-100 allo 0,2% per 20 minuti, ed incubate per 2 ore a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi, diluiti in PBS con il 3% di siero normale asino (normal donkey serum):

- Goat anti-TIA-1, Santa Cruz, 1:300
- Mouse anti-HuR, Santa Cruz, 1:500
- Rabbit anti-TDP-43, Proteintech, 1:500

I vetrini sono stati successivamente lavati tre volte per tre minuti in PBS e incubati per un'ora al buio a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi secondari (Jackson ImmunoResearch Laboratories), diluiti in PBS Triton-X 100 allo 0,2%

- Donkey anti-goat (coniugato con cianina 3,18; emissione giallo/rosso; 1:300)
- Donkey anti-mouse (coniugato con Alexa fluor 488; emissione verde, 1:300)
- Donkey anti-rabbit (coniugato con cianina 3,18; emissione giallo/rosso; 1:300)

Dopo 3 lavaggi di 3 minuti ciascuno in PBS i vetrini stati montati con Glicerolo/PBS 1:1 e osservati al microscopio a fluorescenza Olympus BX41.

Quantificazione delle cellule con granuli da stress e misura dei granuli

Per valutare il numero di cellule che formano granuli, sono stati selezionati in maniera casuale dieci campi ad ingrandimento 40X per ciascun vetrino. I granuli sono stati identificati attraverso l'immunocolorazione con TIA-1 e/o HuR e le cellule sono state considerate positive quando presentavano nel loro citoplasma almeno due granuli con una dimensione minima di $0,75 \mu\text{m}^2$. Le dimensioni dei granuli da stress sono state misurate mediante il software Image J. I dati sono espressi come medie delle dimensioni dei granuli calcolate su circa 80 granuli in 10 cellule.

Transfezione

Le cellule sono state seminate in capsule petri del diametro di 30 mm, contenenti vetrini coprioggetto sterili; arrivate alla confluenza del 60-80%, sono state transfettate per 24 ore con 125 picomoli di siRNA TDP-43 (Silencer Select, Life Technologies) e Lipofectamin RNAi Max (Invitrogen, Life Technologies), diluiti in OptiMEM (Gibco); per il controllo della trasfezione le cellule sono state incubate con OptiMEM, Lipofectamina siRNA Max e un siRNA di controllo coniugato con un fluorocromo (Block-iT Alexa Fluor Red Fluorescent Control, Life Technologies); dopo 24 ore il terreno è stato sostituito con DMEM addizionato con FBS al 10%, senza antibiotico, e dopo successive 48 ore, le cellule sono fissate per immunocitochimica o processate per western blot per valutare l'efficienza di transfezione.

Western blot

I fibroblasti in coltura sono stati lisati con sodio dodecil solfato (SDS) al 2%, sonicati e centrifugati per 10 minuti a 10.000 rpm. Il surnatante è stato essiccato e risospeso in loading buffer (75 mM Tris-HCL pH 6,8; 20% glicerolo; 5% di β -mercaptoetanol; 0,001 di blu di bromofenolo), dopo aver determinato la concentrazione delle proteine utilizzando il DC Protein Assay (Biorad). I campioni sono stati quindi portati a 100°C per 5 minuti. 15 μ g di proteine totali di ogni campione sono stati fatti correre su un gel di poliacrilammide al 10% e trasferiti su una membrana PVDF (Hybond-P, Amersham), precedentemente attivata in metanolo puro. La membrana è stata poi incubata, per un'ora a temperatura ambiente, con una soluzione costituita da latte in polvere al 5% diluito in TBS-Tween 20 allo 0,1% (blocking solution), per bloccare i siti aspecifici, prima di incubarla over night a 4 °C con i seguenti anticorpi primari, diluiti in blocking solution.

- Anti-TDP-43 (anticorpo policlonale prodotto in coniglio, Proteintech 1:1000)
- Anti-Tubulina (anticorpo policlonale prodotto in coniglio, Abcam, 1:1000), utilizzato come controllo di caricamento.

La membrana infine, dopo vari lavaggi, in TBS-Tween 0,1% è stata incubata per un'ora a temperatura ambiente, con un appropriato anticorpo secondario coniugato con la Horseradish perossidasi: goat anti-rabbit (Life Technologies) utilizzato alla concentrazione 1:5000 e diluito in blocking solution. Dopo una serie lavaggi da cinque minuti ciascuno in TBS-Tween, le bande delle proteine sono state rilevate attraverso un substrato chemiluminescente (Clarity Western ECL, Substrate, Biorad).

Test di vitalità cellulare (saggio MTT)

L'MTT è un sale di tetrazolio (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide - thiazolyl blue), solubile in acqua che viene convertito in cristalli di un prodotto bluastro denominato formazano dall'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi. La reazione pertanto può avvenire solo nelle cellule metabolicamente attive. I fibroblasti dei controlli e dei pazienti SLA con mutazione *TARDBP*^{A382T}, sono stati seminati in piastre da 24 pozzetti (50.000 cellule per pozzetto) e dopo 24 ore le cellule sono state trattate per 1h con sodio arsenite alla concentrazione 0,5 mM; successivamente è stato effettuato il recovery per 1h e 2h. Le cellule sono state poi incubate per un'ora a 37°C con MTT (Sigma Aldrich) diluito in RPMI-1640 senza rosso fenolo (Sigma Aldrich), alla concentrazione 1 mg/ml. Al termine del periodo di incubazione la soluzione di tetrazolio è stata rimossa e i sali di formazano presenti nelle cellule sono stati solubilizzati utilizzando il DMSO. L'assorbanza è stata letta utilizzando l'EnVison (Perkin Elmer) alla lunghezza d'onda di 570nm.

Estrazione dell'RNA e qPCR

I fibroblasti in coltura, trattati e non, contenuti in piastre da 96 mm di diametro sono stati lisati aggiungendo 1 ml di Trizol e trasferiti in tubi sterili con una pipetta Pasteur. Successivamente sono stati aggiunti 0,2 ml di cloroformio all'omogenato cellulare che è stato poi agitato vigorosamente per miscelare bene le due parti. I campioni sono stati incubati per 5 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugati per 15 minuti alla velocità di 10.000 rpm a 4°C. Dopo la centrifugazione si formano tre strati differenti: una fase acquosa (surnatante) contenente l'RNA totale, una fase intermedia contenente il DNA e una fase nel fondo della provetta costituita da cloroformio, fenolo e parte organica.

La fase acquosa, contenente l'RNA totale, è stata trasferita in un nuovo tubo sterile nel quale sono stati aggiunti 0,5 ml di alcool isopropilico per la precipitazione dell'RNA totale. Dopo incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente, i campioni sono stati centrifugati a 10.000 rpm a 4°C per 10 minuti per permettere la precipitazione dell'RNA totale. Il pellet ottenuto è stato lavato con 1 ml di alcool etilico al 75%. Una volta risospeso, il pellet è stato nuovamente centrifugato per 5 minuti a 7.500 rpm a 4°C. Dopo la centrifugazione l'alcool è stato allontanato e il pellet è stato fatto asciugare a temperatura ambiente.

L'RNA totale così ottenuto è stato disciolto in H₂O ultrapura trattata con dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma, St. Louis, MO, USA) al fine di allontanare ogni traccia di ribonucleasi e desossiribonucleasi eventualmente presente.

Al fine di valutare la quantità di RNA totale, un'aliquota del campione estratto è stata opportunamente diluita con H₂O/DEPC e letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm, 280 nm e 320 nm, rispettivamente le lunghezze d'onda degli acidi nucleici e delle proteine. L'RNA totale una volta sospeso in H₂O ultrapura è stato conservato a -80°C fino all'utilizzo.

L'RNA totale è stato retroscritto in cDNA utilizzando il kit ThermoScript™ RT-PCR System & Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). La quantificazione dell'mRNA target è stata effettuata utilizzando il LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics); la normalizzazione è stata effettuata utilizzando il software Rel Quant (Roche Diagnostics) e la β-actina è stata utilizzata come gene di riferimento per l'mRNA.

Questo è invece l'elenco del set di primers utilizzati per la PCR:

	SENSO	ANTISENSO
β -actina	5'-CGTTGGCATCCACGAAACTA-3' (esone 5)	5'-AGTACTTGCGCTCAGGAGGA-3' (esone 6)
G3BP	5'-TAATCGCCTTCGGGGACCTG-3' (esone 11)	5'-AAGCCCCCTTCCCACTCAA3' (esone 11)

Analisi statistica

Le differenze trovate fra i vari gruppi di fibroblasti (controlli sani e malati SLA) sono state analizzate statisticamente attraverso il Test di Student.

RISULTATI

Formazione dei granuli da stress

Al fine di verificare la localizzazione della TDP-43 e il suo coinvolgimento nella formazione dei granuli da stress, abbiamo effettuato delle marcature con anticorpi specifici per la TDP-43 e per proteine marker dei granuli da stress (HuR e TIA-1), in fibroblasti di controlli sani e di pazienti SLA con mutazione *TARDBP*^{A382T}. La figura 3 mostra una doppia marcatura per HuR e TIA-1, che risultano colocalizzati nei granuli da stress.

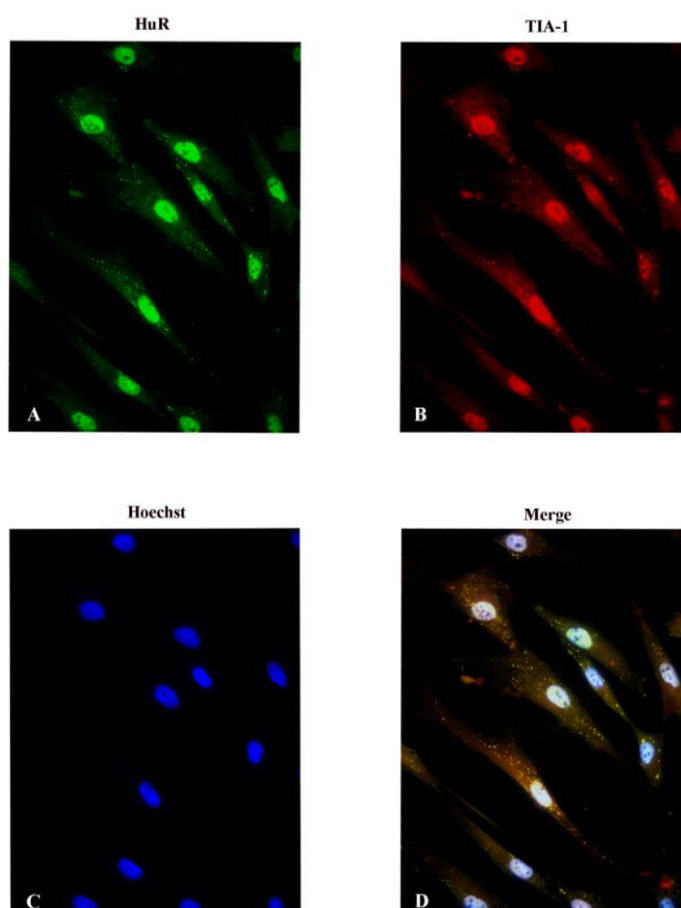


Fig.3 Fibroblasti marcati con anticorpi anti-HuR (A) e anti-TIA-1 (B); le proteine Hur e TIA-1 co-localizzano nel nucleo e nei granuli da stress, come indicato dalla foto del merge (D) , in seguito a trattamento con sodio arsenite 0,5 mM. Ingrandimento 60 X. Barra = 20 μ m

In condizioni fisiologiche, le proteine HuR e TDP-43, risultano localizzate esclusivamente nel nucleo, sia nei controlli sani, che nei pazienti SLA con mutazione $TARDBP^{A382T}$ (Figura 4)

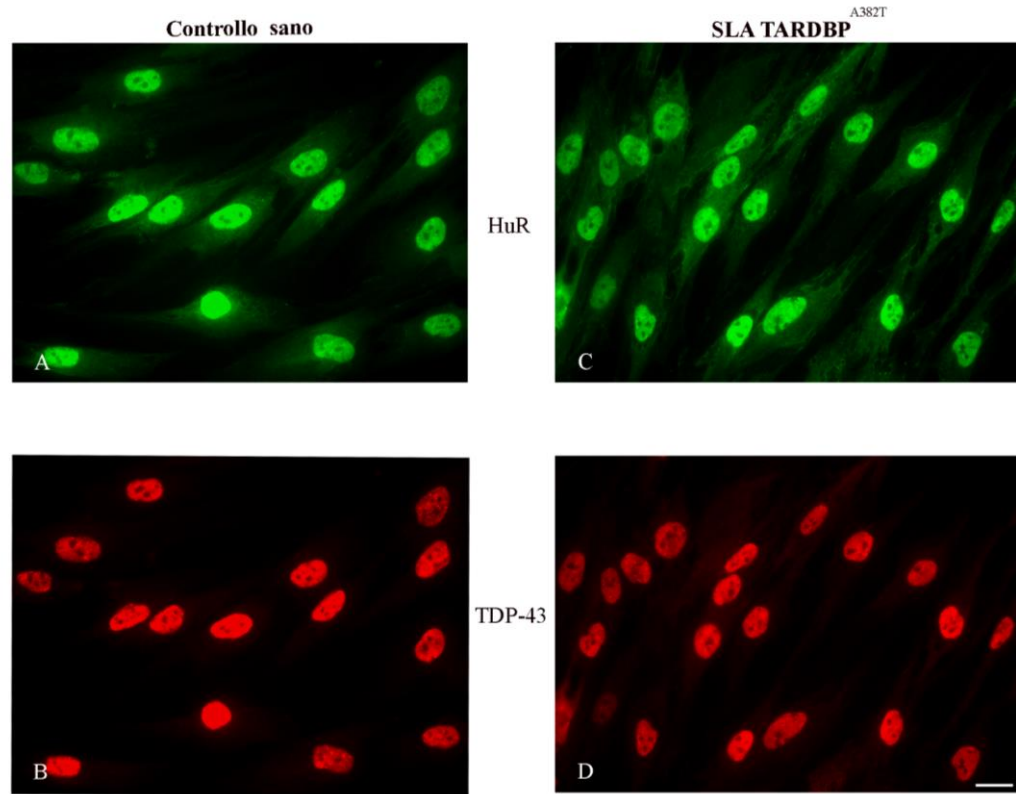


Fig.4 Fibroblasti di controlli sani (A e B) e pazienti SLA con mutazione $TARDBP^{A382T}$ (C e D) in condizioni basali; marcatura doppia con gli anticorpi anti- HuR , usato come marker dei granuli da stress, (verde) e anti-TDP-43 (rosso); ingrandimento 60X. Barra = 15 μ m

In seguito a trattamento con sodio arsenite per 60 minuti, nel citoplasma dei fibroblasti dei controlli sani e dei pazienti SLA con mutazione *TARDBP*^{A382T}, è possibile osservare i granuli da stress, riconoscibili per la loro positività per HuR. La TDP-43 invece risulta localizzata esclusivamente nel nucleo in entrambi i campioni, anche dopo il trattamento (Figura 5).

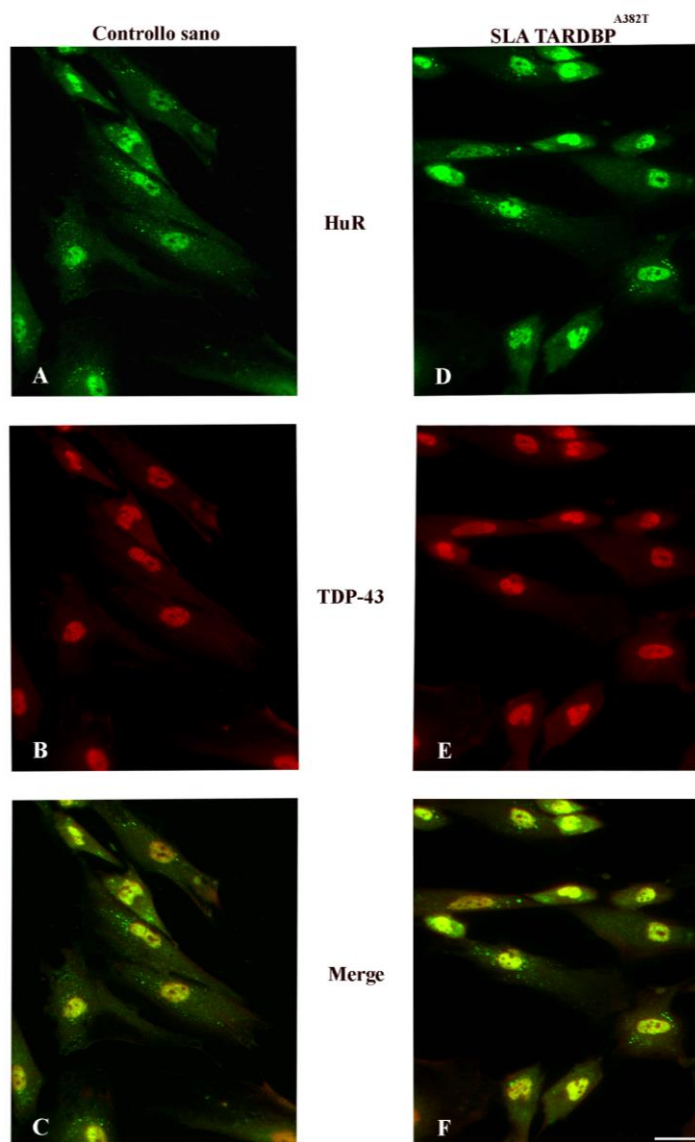


Fig.5 Fibroblasti di controlli sani (A, B, C) e di pazienti SLA con mutazione *TARDBP*^{A382T} (D, E, F) marcati con anticorpi anti-HuR (verde) e anti-TDP-43 (rosso), dopo trattamento con sodio arsenite 0,5 mM per 60 minuti. La TDP-43 ha una localizzazione esclusivamente nucleare. Ingrandimento 60 X. Barra = 20 μ m

Per valutare l'effetto della mutazione sulla cinetica dei granuli da stress, le cellule sono state sottoposte ad un trattamento con sodio arsenite per un tempo variabile (30 minuti e 60 minuti), seguito da un periodo di recovery (30 minuti o 60 minuti), in cui l'agente stressogeno è stato rimosso e sostituito con medium di crescita per permettere alle cellule di tornare alle condizioni iniziali. La figura 6A mostra che dopo trattamento con sodio arsenite per 30 minuti, la maggior parte dei fibroblasti degli individui sani presenta granuli da stress (marcati con HuR), mentre i fibroblasti di pazienti SLA *TARDBP*^{A382T} positivi per i granuli sono in numero inferiore (Figura 6B)

Il trattamento di 60 minuti con sodio arsenite, determina un aumento del numero delle cellule contenenti granuli da stress, nei controlli, rispetto a quanto osservato dopo il trattamento di 30 minuti. Inoltre, il numero dei granuli da stress è sempre maggiore nei controlli che nei pazienti SLA (Figure 6C e 6D). Dopo 60 minuti di trattamento con sodio arsenite e 30 minuti di recovery, si nota una notevole riduzione dei granuli sia nei controlli (Figura 6E) che nei malati SLA (Figura 6F), senza differenze significative tra i 2 gruppi. Quando il recovery è stato protratto fino a 60 minuti, i granuli da stress sono quasi scomparsi sia nei fibroblasti dei controlli (Figura 6G) che in quelli dei pazienti SLA (Figura 6H). La maggior parte delle cellule è quindi ritornata alla condizione iniziale.

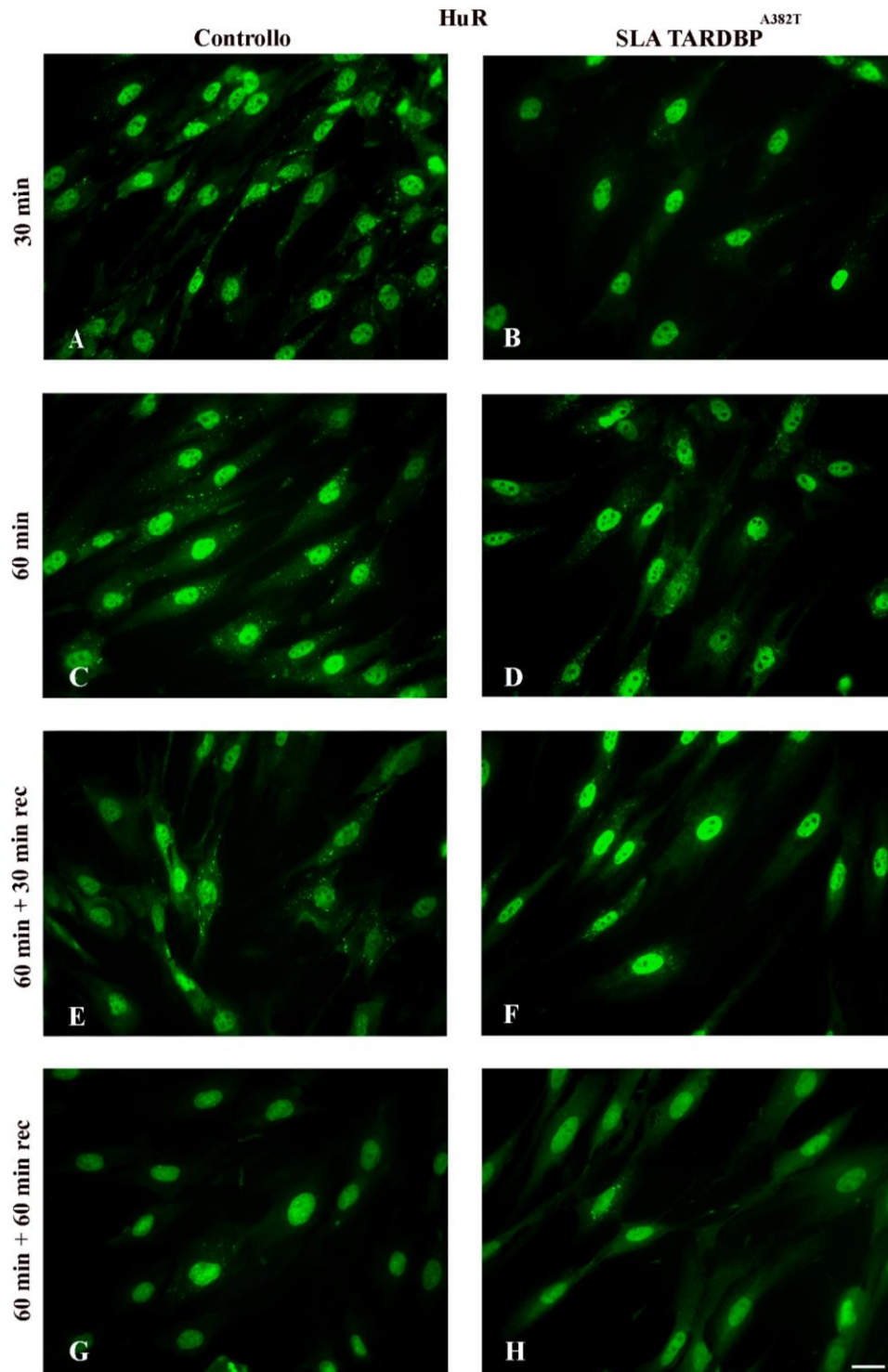


Fig 6 Fibroblasti di controlli sani (A, C, E, G) e di pazienti SLA con mutazione *TARDBP*^{A382T} (B, D, F, H) trattati con sodio arsenite 0,5mM per 30 minuti (A e B) e 60 minuti (C, D, E, F, G, H) e marcati con l'anticorpo anti-HuR per evidenziare i granuli da stress; in seguito al trattamento la sodio arsenite è stata rimossa e il terreno in cui era stata diluita è stato sostituito con del normale terreno di crescita, per effettuare il recovery di 30 minuti (E, F) e 60 minuti (G,H); ingrandimento 60X. Barra = 15 μ m

L'analisi statistica ha confermato queste osservazioni: dopo 30 minuti di trattamento con sodio arsenite la percentuale di cellule che formano granuli da stress è significativamente maggiore nei controlli sani rispetto ai pazienti SLA *TARDBP*^{A382T} (Figura 7A); questa differenza tra i due gruppi aumenta quando il trattamento con la sodio arsenite viene esteso a 60 minuti (Figura 7B). Una volta che l'agente stressogeno è stato rimosso per poter ripristinare le condizioni iniziali, le cellule dei controlli sani e quelle dei pazienti SLA con mutazione *TARDBP*^{A382T}, hanno mostrato la stessa capacità nel disassemblamento dei granuli, fino alla loro scomparsa, senza differenze significative tra i due gruppi, in nessuno dei tempi analizzati.

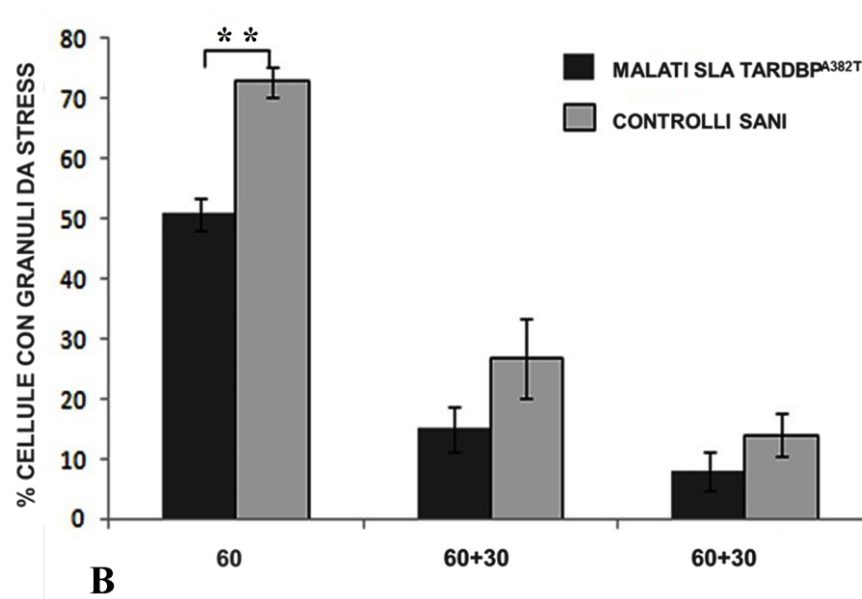
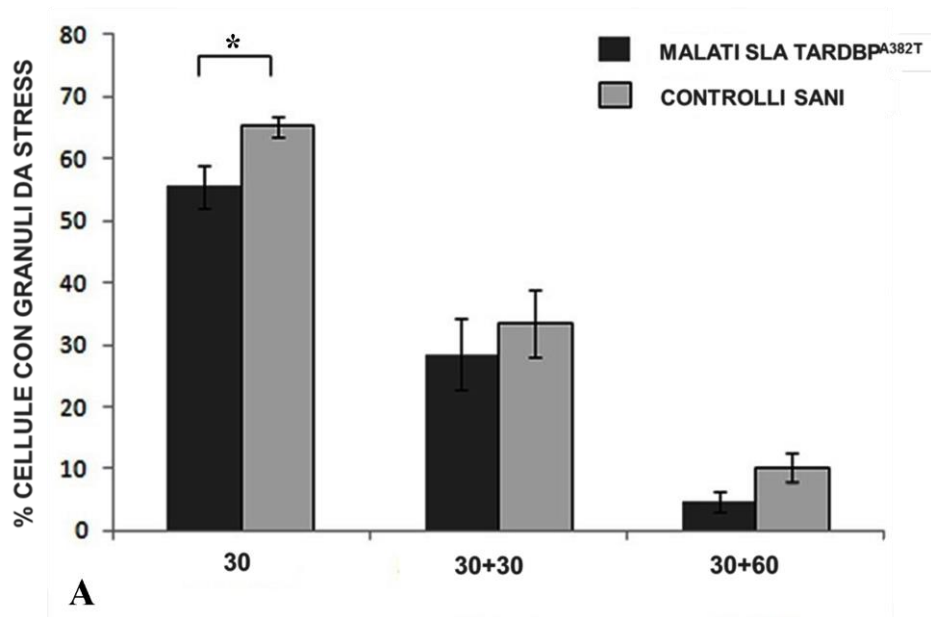


Fig.7 Rappresentazione grafica della percentuale di cellule con granuli da stress in campioni di fibroblasti umani di controlli sani e malati SLA *TARDBP*^{A382T}, dopo trattamento con sodio arsenite 0,5 mM per 30 (A) e 60 minuti (B); *p< 0,01 vs controllo; **p< 0,00001 vs controllo.

LEGENDA (Fig.7 A): **30**: 30 minuti con sodio arsenite; **30+30**: 30 minuti con sodio arsenite e 30 minuti di recovery; **30+60**: 30 minuti con sodio arsenite e 60 minuti di recovery

LEGENDA (Fig.7 B): **60**: 60 minuti con sodio arsenite; **60+30**: 60 minuti con sodio arsenite e 30 minuti di recovery; **60+60**: 60 minuti con sodio arsenite e 60 minuti di recovery

Per valutare se la mutazione *TARDBP*^{A382T} fosse responsabile della compromissione dell'assemblamento dei granuli da stress, è stato inoltre analizzato il numero di granuli per cellula e le dimensioni medie dei granuli.

I fibroblasti con mutazione del gene *TARDBP* presentano una riduzione significativa del numero di granuli per cellula rispetto ai fibroblasti dei controlli dopo il trattamento di 30 minuti e 60 minuti (Figura 8) mentre non sono state trovate differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda le dimensioni dei granuli, né in seguito al trattamento di 30 minuti (1,49 vs 1,55 μm^2), né in seguito al trattamento di 60 minuti (1,39 vs 1,35 μm^2).

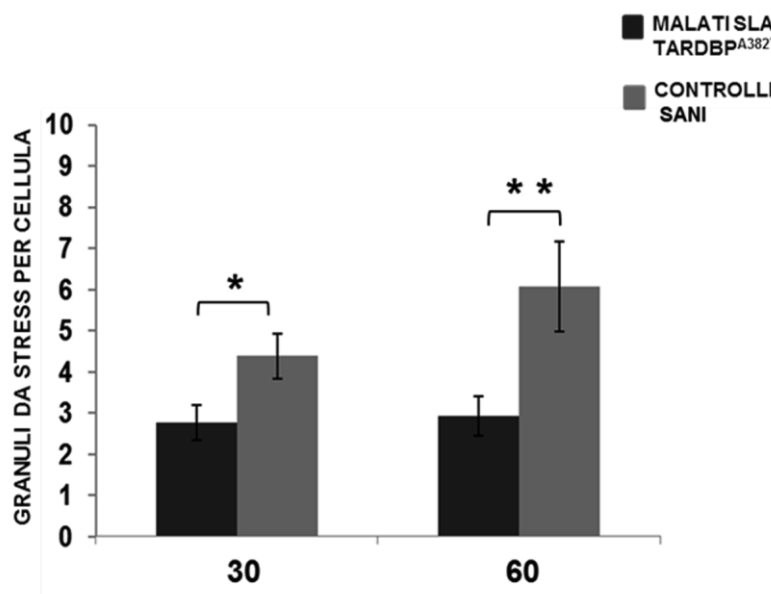


Fig.8 Rappresentazione grafica del numero di granuli da stress per cellula in campioni di fibroblasti umani trattati con sodio arsenite 0,5 mM per 30 e 60 minuti. * $p < 0,05$ vs controllo; ** $p < 0,02$ vs controllo .

Per capire se la diminuzione dei granuli da stress nelle cellule con la TDP-43 mutata fosse dovuto ad una perdita di funzione da parte della proteina, abbiamo transfettato i fibroblasti dei controlli sani con siRNA specifico per il gene *TARDBP*. Una significativa riduzione del numero di cellule con granuli da stress, dopo trattamento con sodio arsenite per 30 minuti, è stata osservata nelle cellule silenziate, rispetto ai controlli in cui i fibroblasti sono stati transfettati con un siRNA di controllo e rispetto ai fibroblasti non transfettati (Figura 9)

L'efficacia del silenziamento è stata valutata mediante Western blot (Figura 9D).

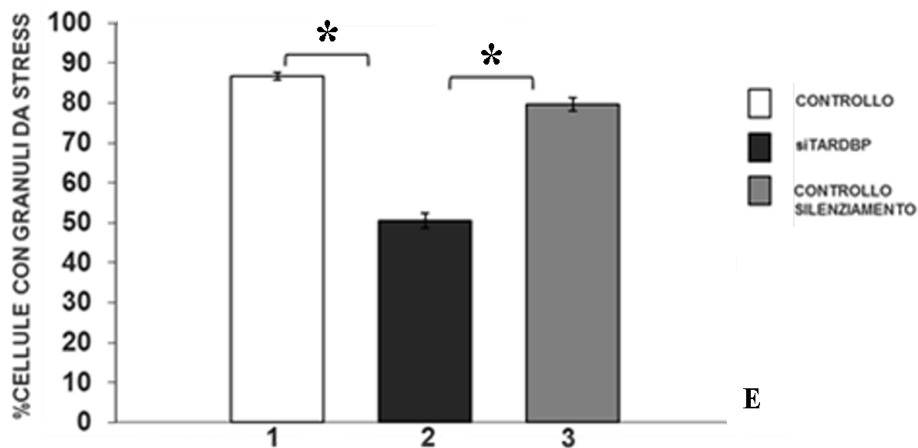
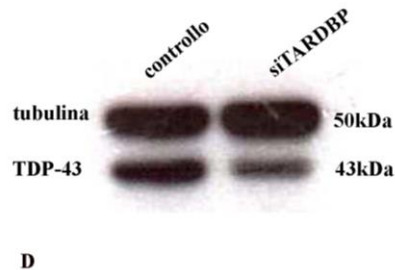
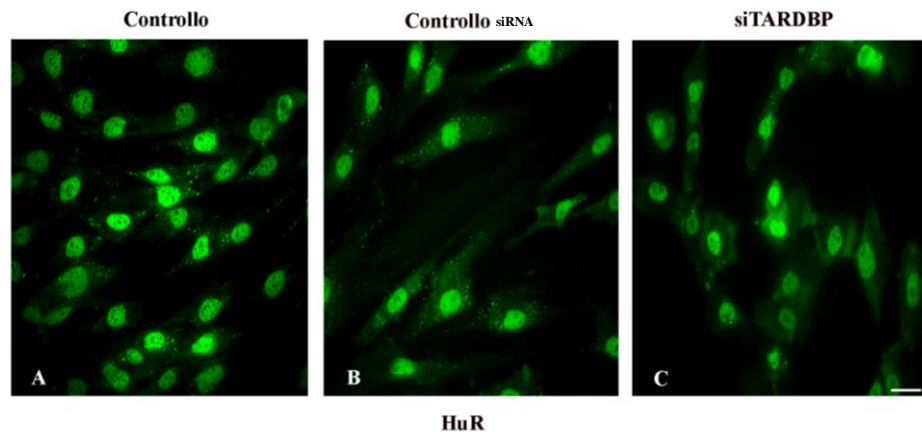


Fig.9 Fibroblasti di controlli sani in cui non è stata effettuata la transfezione (A); fibroblasti di controlli sani transfettati con un siRNA di controllo (B); fibroblasti di controlli sani in cui è stato silenziato il gene *TARDBP* (C); le cellule sono state marcate con un anticorpo anti-HuR, per evidenziare i granuli da stress, dopo trattamento con sodio arsenite 0,5 mM per 30 minuti. Ingrandimento 60 X. Barra = 15 μ m. Nell'immagine di Western blot (D) è visibile la riduzione dei livelli della proteina TDP-43.

Rappresentazione grafica della percentuale di cellule con granuli da stress in campioni di fibroblasti umani, dopo trattamento con sodio arsenite 0,5 mM per 30 minuti (E); * $p < 0,00001$ vs entrambi i controlli.

Per chiarire se la riduzione della percentuale delle cellule che formano granuli fosse associata alla mutazione A382T del gene *TARDBP*, piuttosto che ad altri fattori associati alla patologia, sono stati effettuati degli esperimenti di immunocitochimica su fibroblasti di due pazienti SLA con un genotipo wild type per i loci *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72*. I fibroblasti di questi pazienti SLA, dopo trattamento con sodio arsenite per 60 minuti, avevano la stessa capacità nel formare granuli dei controlli sani, come mostrato nella figura 10; infatti non ci sono state differenze significative fra controlli e malati nel numero di cellule positive per i granuli da stress (Figura 10D).

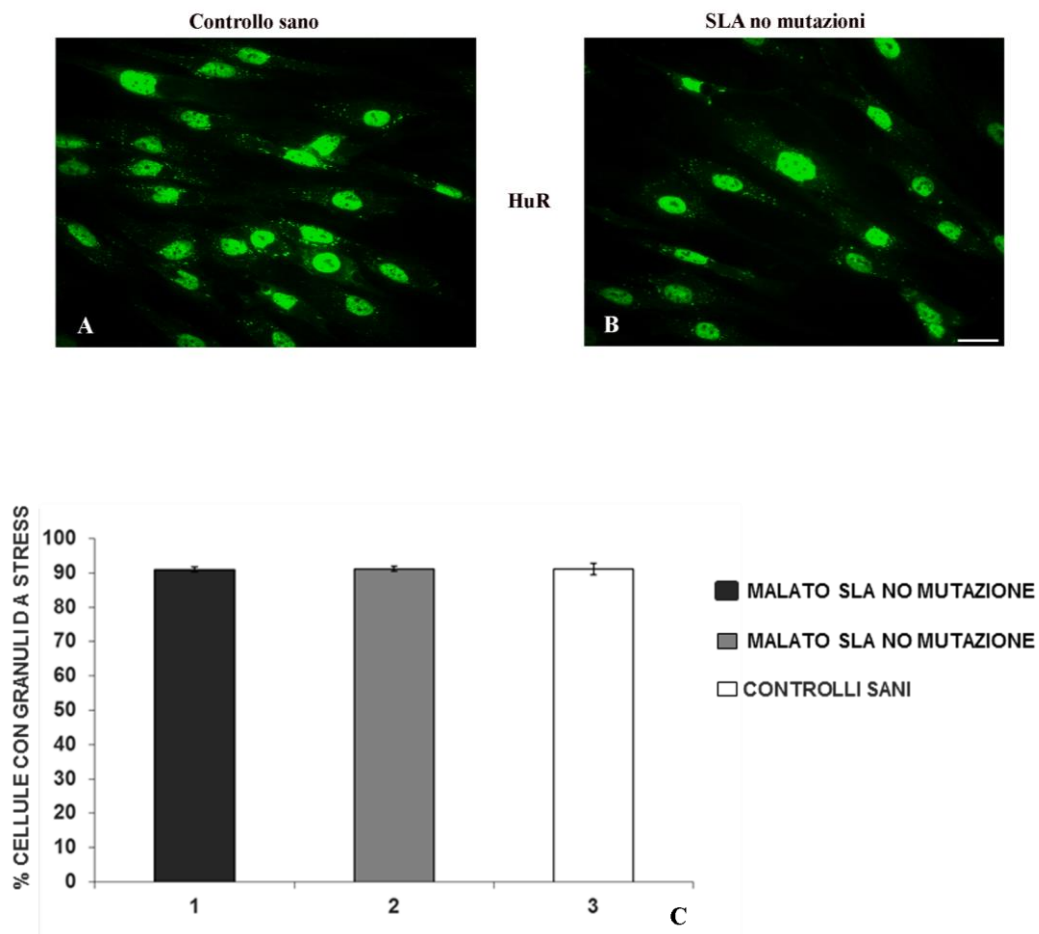


Fig.10 Fibroblasti di controlli sani (A) e di malati SLA wild type per i loci *TARDBP*, *FUS* e *C9ORF* (B), marcati con un anticorpo anti-HuR (per evidenziare i granuli da stress), dopo trattamento con sodio arsenite 0,5 mM per 60 minuti. Ingrandimento 60 X. Barra = 20 μ m
Rappresentazione grafica (C) della percentuale di granuli da stress in campioni di fibroblasti umani di controlli sani e malati SLA wild type per i loci *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72*, dopo trattamento per 60 minuti con sodio arsenite 0,5 mM.

Espressione della G3BP

La G3BP è una proteina che svolge un ruolo fondamentale nell'assemblaggio dei granuli da stress, ed è stato ipotizzato che sia a sua volta regolata dalla TDP-43. Dal momento che, nel nostro modello cellulare, la TDP-43 non è mai localizzata nei granuli da stress, ma ne regola la formazione, abbiamo voluto indagare se la mutazione *TARDBP*^{A382T} potesse determinare delle alterazioni nell'espressione genica di tale proteina.

Mediante Real Time PCR, è stata analizzata l'espressione del mRNA della proteina G3BP nei controlli sani, nei malati SLA wild type per i loci *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72*, nei malati SLA con mutazione *TARDBP*^{A382T}.

In condizioni basali non sono state riscontrate differenze significative nell'espressione della proteina G3BP fra i fibroblasti appartenenti ai tre gruppi (Figura 11). In seguito al trattamento con sodio arsenite per 60 minuti, invece, abbiamo osservato un marcato e significativo aumento dell'espressione della proteina G3BP nei controlli sani rispetto alle cellule con mutazione A382T, nei quali l'espressione della proteina G3BP si è ridotta del 30% (Figura 11)

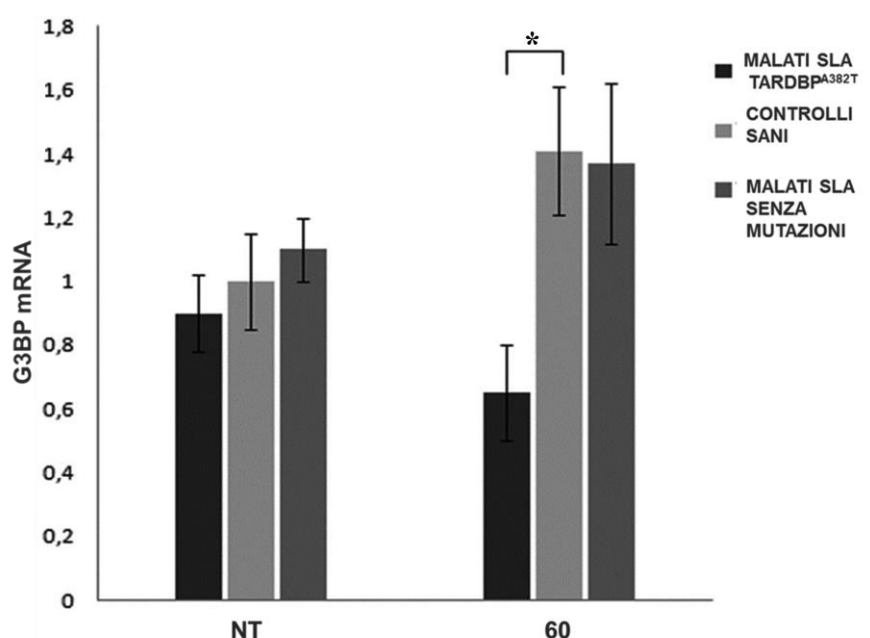


Fig.11 Rappresentazione grafica dell'espressione genica della proteina G3BP, in campioni di fibroblasti umani di malati SLA *TARDBP*^{A382T}, malati SLA senza mutazione e controlli sani. *p<0,01

Legenda: NT: non trattati; 60: 60 minuti con sodio arsenite 0,5mM

Vitalità cellulare

Per verificare se la ridotta capacità di formare granuli da stress da parte delle cellule dei malati SLA *TARDBP*^{A382T}, sia correlata ad un aumento della morte cellulare, sono stati effettuati dei saggi di vitalità MTT nei fibroblasti dei controlli sani e in quelli con mutazione *TARDBP*^{A382T} in condizioni fisiologiche e dopo trattamento con sodio arsenite.

Mentre in condizioni basali non ci sono differenze significative tra i due campioni, la vitalità si è ridotta significativamente nei fibroblasti dei pazienti SLA *TARDBP*^{A382T} rispetto a quelli dei controlli sani dopo 60 minuti di trattamento. Queste differenze sono presenti anche dopo 60 minuti di recovery. Dopo due ore di recovery, nei fibroblasti dei controlli sani la mortalità si riduce, mentre nei pazienti SLA la vitalità è risultata ancora più bassa rispetto ai due trattamenti precedenti (Figura 12)

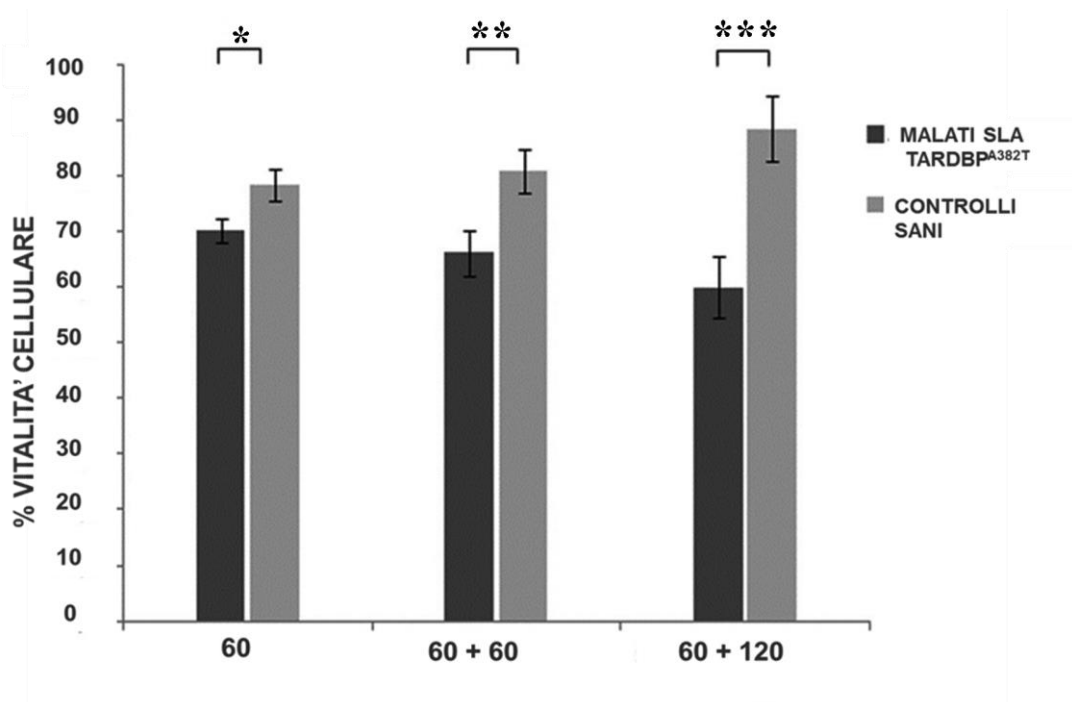


Fig.12 Rappresentazione grafica della vitalità cellulare in campioni di fibroblasti umani di controlli sani e di malati SLA con mutazione *TARDBP*^{A382T} dopo trattamento con sodio arsenite 0,5. mM. * $p < 0,02$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0005$.

LEGENDA: 60: 60 minuti con sodio arsenite; 60+60: 60 minuti con sodio arsenite e 60 minuti di recovery; 60+120: 60 minuti con sodio arsenite e 120 minuti di recovery

DISCUSSIONE

La mutazione A382T è una delle mutazioni più comuni del gene *TARDBP* e in Sardegna a causa dell'effetto fondatore, riguarda circa il 30% dei pazienti SLA (Chiò et al, 2011; Orrù et al, 2012) e il 20% dei casi di FTD (Floris et al, 2015). Diversi autori hanno dimostrato la correlazione di questa mutazione con la degenerazione dei motoneuroni, ma il meccanismo d'azione non è stato del tutto chiarito; ad esempio è stato osservato da Kabashi e collaboratori che la TDP-43 con questa o con altre due mutazioni (A315T e la G348C) determina neurotossicità in vitro, sia in colture primarie che linee cellulari. Inoltre gli stessi autori hanno riportato che l'overespressione di queste mutazioni porta ad un fenotipo motorio in embrioni di zebrafish consistente in assoni motoneuronali più corti e difficoltà nel nuoto (Kabashi et al, 2010). E' stato recentemente dimostrato che questa mutazione determina un'alterazione all'omeostasi del calcio, associata ad una traslocazione della TDP-43 nel citoplasma, in seguito a stress del reticolo endoplasmatico, indotto da taspigargina (Mutihac et al.,2015). La mutazione A382T, inoltre, sembrerebbe modificare il turnover della proteina, ma i risultati presenti in letteratura sono contraddittori. Infatti, uno studio effettuato sulla maggior parte delle mutazioni associate alla SLA riporta che la mutazione A382T, insieme ad altre sette mutazioni, aumenta l'emivita della TDP-43, con conseguente tossicità dovuta all'accumulo della proteina (Watanabe et al., 2013). Al contrario, Araki e collaboratori (2014) hanno recentemente osservato un turnover più rapido della proteina mutata, rispetto alla wild type, senza evidenti differenze di localizzazione intracellulare (Araki et al, 2014). Un'altro studio recente ha mostrato un aumento significativo della TDP-43, sia nel nucleo che nel citoplasma di fibroblasti di pazienti SLA con mutazione A382T, rispetto ai controlli sani o pazienti SLA con SOD-1 mutata (Sabatelli et al., 2015).

E' stato ampiamente dimostrato che la TDP-43 svolge un ruolo importante nell'assemblaggio e nella disgregazione dei granuli da stress (Dewey et al., 2012; Li et al., 2013; Aulas et al., 2012), anche se non è chiaro se svolge un'azione diretta, contribuendo alla composizione dei granuli, o se agisce a livello nucleare, controllando l'espressione di proteine, componenti essenziali dei granuli da stress.

L'importanza dei granuli da stress nelle malattie neurodegenerative è dimostrata dal fatto che numerose proteine leganti l'RNA, oltre alla TDP-43, implicate in processi neurodegenerativi sono reclutate nei granuli o sono coinvolte nella loro formazione

(Didiot et al, 2009; Bosco et al, 2010): l'atassina-2 che è mutata nell'atassia spinocerebellare (Nonhoff et al, 2007); l'angiogenina, implicata nella SLA e nel Parkinson (Emara et al., 2010), la proteina SMN (survival motor neuron), implicata nell'atrofia muscolare spinale (Hua and Zhou, 2004), FMRP (fragile X mental retardation protein), implicata nella sindrome dell'X fragile (Kim et al., 2006), FUS (Lenzi et al, 2015), una proteina la cui struttura è molto simile alla TDP-43 e che come quest'ultima regola l'espressione di proteine importanti per il funzionamento del sistema nervoso (Colombrita et al, 2015).

La regolazione della dinamica dei granuli da stress è importante perché una compromissione del meccanismo che permette la loro formazione potrebbe rendere le cellule più vulnerabili all'azione di agenti stressogeni dal momento che la formazione di queste strutture citoplasmatiche inibisce l'apoptosi attraverso la via MAPK (Arimoto et al, 2008).

In questo studio abbiamo utilizzato colture primarie di fibroblasti, ottenuti da prelievi di cute di pazienti SLA con mutazione A382T della TDP-43, per studiare il ruolo patogenetico della mutazione, in particolare nei meccanismi di assemblaggio dei granuli da stress.

L'utilizzo delle colture primarie di fibroblasti prelevati da pazienti come modello di studio è stato già proposto per diverse malattie neurodegenerative e presenta dei vantaggi rispetto ad altri modelli in vitro.

I fibroblasti possono essere ottenuti da prelievi di cute dei pazienti, in modo semplice e poco invasivo, permettendoci di avere delle colture cellulari con struttura genomica inalterata e un pattern di espressione di proteine molto simile all'originale. Inoltre, questo modello presenta diversi vantaggi rispetto alle linee cellulari in cui il gene viene transfettato nella forma wild type o nelle sue forme mutate; questi ultimi modelli infatti danno luogo spesso ad artefatti dovuti all'overespressione della proteina, portando a dei risultati che spesso si discostano notevolmente da quello che avviene nelle cellule dei pazienti malati di SLA.

E' stato dimostrato che l'overespressione della TDP-43 è tossica in diversi modelli animali e cellulari (Ash et al., 2010; Barmada et al, 2010; Liachko et al, 2010) e può alterare la dinamica della formazione dei granuli da stress, in quanto questa proteina regola l'espressione di proteine che fanno parte del 'core' dei granuli da stress, come TIA-1 e G3BP (McDonald et al, 2011; Aulas et al., 2012, 2015). Infatti l'overspressione

di TDP-43 può portare alla formazione dei granuli da stress anche in assenza di altro stimolo stressogeno (Liu-Yesucevitz et al, 2010).

Lo svantaggio dell'utilizzo dei fibroblasti come modello sperimentale per la SLA potrebbe essere il fatto che non sono le cellule principalmente coinvolte in questa patologia, ma recentemente Sabatelli e collaboratori hanno osservato che i fibroblasti di pazienti SLA con mutazioni della TDP-43 presentano alcune caratteristiche alterazioni, molto simili a quelle osservate nei neuroni (Sabatelli et al, 2015). Inoltre Connolly e collaboratori hanno osservato, in fibroblasti umani di pazienti affetti da disturbi neurologici come SLA e malattia di Alzheimer, alterazioni dell'omeostasi cellulare e in particolare dell'omeostasi del calcio, del tutto simili a quelle osservate nelle cellule del sistema nervoso nelle stesse patologie, confermando la validità del modello per lo studio delle malattie neurodegenerative (Connolly, 1998).

Nei nostri esperimenti, la TDP-43 risulta essere localizzata a livello nucleare sia fibroblasti dei controlli sani sia in quelli dei pazienti SLA con mutazione *TARDBP*^{A382T}. Anche in seguito a trattamento con sodio arsenite la TDP-43 mantiene una localizzazione esclusivamente nucleare e non entra a far parte dei granuli da stress, come invece riportato da altri autori. Nonostante ciò, la sua mutazione o il suo silenziamento determina delle alterazioni nella formazione dei granuli da stress, e rende le cellule più suscettibili alle condizioni di stress. Nonostante diversi autori abbiano osservato, in seguito all'azione di diversi agenti stressogeni, la TDP-43 localizzata nei granuli da stress, questa proteina non è un componente obbligatorio dei granuli. Inoltre la letteratura ci suggerisce che la composizione dei granuli varia in base al modello cellulare utilizzato e al tipo di agente stressogeno; ad esempio la TDP-43 risulta localizzata nei granuli dopo induzione di stress ossidativo con sodio arsenite in cellule HeLa (McDonald et al, 2011), ma non nella cellule Hek293T, in cui la TDP-43 è localizzata nei granuli da stress solo dopo induzione di stress osmotico col sorbitolo (Dewey et al., 2011); un altro esempio è dato dalla linea SH-5YSY, nelle quali la TDP-43 non risulta reclutata nei granuli dopo trattamento con epoxomicina (inibitore del proteasoma) e taspigargina (induttore di stress a livello del reticolo endoplasmatico) (Ayala et al, 2011a), mentre in questa stessa linea cellulare lo stress indotto dal paraquat (che induce stress a livello mitocondriale), determina la formazione di granuli da stress positivi anche per la TDP-43 (Meyerowitz et al, 2011). Walker e collaboratori, hanno indotto due tipi di stress nella linea cellulare HeLa: hanno prodotto stress ossidativo attraverso la sodio arsenite e stress a livello del reticolo endoplasmatico attraverso la

tapsigargina ottenendo effetti diversi. Infatti, la TDP-43 era localizzata solo in una piccola percentuale di granuli indotti dal trattamento con sodio arsenite, ma era presente in circa il 50% dei granuli indotti da tapsigargin (Walker et al, 2013).

Anche nella linea cellulare di motoneuroni NSC-34 la TDP-43 è localizzata nei granuli, in seguito a shock termico, a stress ossidativo indotto da sodio arsenite o all'inibizione del complesso ubiquitina-proteasoma (Colombrita et al, 2009).

Nel nostro modello di studio abbiamo osservato che, pur non entrando nella composizione dei granuli, la TDP-43 influenza la formazione dei granuli da stress. Infatti, in risposta a stress indotto da sodio arsenite, nei fibroblasti che presentano la mutazione A382T sono presenti un numero inferiore di granuli da stress rispetto ai controlli. La riduzione del numero di granuli nei fibroblasti dei pazienti mutati rispetto a quelli sani, è in accordo con quanto osservato da altri autori in linfoblasti umani di pazienti SLA. E' stata infatti documentato una riduzione dei granuli da stress nelle cellule con la mutazione *TARDBP*^{R361S} rispetto ai controlli; lo stesso risultato però non è stato osservato dagli stessi autori per nelle cellule con la mutazione *TARDBP*^{D169G} (McDonald et al, 2011). Questo potrebbe essere spiegato col fatto che quest'ultima mutazione riguarda la regione RRM1 della proteina, mentre la mutazione R361S e la mutazione A382T si trovano a livello della regione C-terminale, quindi potrebbero presentare un effetto patogenico simile per quanto riguarda il controllo della dinamica dei granuli.

Nel nostro modello non abbiamo trovato differenze significative fra i due gruppi (sani e malati) per quanto riguarda le dimensioni dei granuli da stress, a differenza di quanto riportato da Dewey e collaboratori, che hanno documentato un aumento della dimensione dei granuli da stress, in cellule Hek293T, trasfettate con costrutti *TARDBP* con mutazioni G294A, A315T, G348C, N390S, in seguito a stress osmotico indotto da sorbitolo (Dewey et al, 2011). Questa discrepanza tra quanto osservato dal nostro studio e quanto riportato da questi autori può essere dovuta alle differenze dei modelli, riguardo al tipo di cellule, all'agente stressogeno e alle mutazioni studiate.

Per capire se la compromissione della dinamica dei granuli da stress fosse dovuta proprio alla mutazione *TARDBP*^{A382T} e non fosse invece una caratteristica della malattia, abbiamo confrontato l'abilità di formare granuli in fibroblasti di due pazienti SLA sporadici, senza mutazioni nei loci *TARDBP*, *C9ORF72* e *FUS*. In seguito a trattamento con sodio arsenite, i fibroblasti di tali pazienti non hanno presentato differenze significative nella formazione dei granuli da stress rispetto a quelli dei

controlli sani, confermando che le alterazioni osservate nei pazienti SLA *TARDBP*^{A382T} sono da imputare all'effetto della mutazione.

Inoltre per capire se la compromissione dell'assemblaggio dei granuli da stress avvenga attraverso un meccanismo di gain of function o loss of function abbiamo silenziato il gene *TARDBP*. Questo ha determinato una riduzione del numero di cellule positive per i granuli da stress nei fibroblasti in cui è stato effettuato il silenziamento di tale gene, con un pattern molto simile a quanto osservato per i fibroblasti di pazienti SLA *TARDBP*^{A382T}. Questo suggerisce che la mutazione A382T della TDP-43, nel nostro modello cellulare, produce effetti patogenici, andando a compromettere l'abilità delle cellule di formare granuli, in condizioni di stress ossidativo, attraverso un meccanismo di loss of function.

Quindi i risultati da noi ottenuti suggeriscono che la TDP-43 regoli il processo di assemblaggio dei granuli da stress e questo è in accordo con quanto riportato da McDonald e collaboratori i quali hanno documentato in cellule della linea HeLa che il silenziamento del gene *TARDBP* compromette l'abilità delle cellule di formare granuli. Infatti in seguito a trattamento con sodio arsenite nelle cellule in cui è stato silenziato il gene *TARDBP* sono state contate un minor numero di cellule positive per i granuli da stress, rispetto alle cellule in cui non è stato effettuato il silenziamento di questo gene e i granuli presentavano anche ridotte dimensioni rispetto a quanto osservato per le cellule in cui non era stato silenziato il gene *TARDBP* (McDonald et al, 2011).

I fibroblasti dei pazienti SLA *TARDBP*^{A382T} sottoposti a trattamento con sodio arsenite presentano una riduzione della vitalità cellulare rispetto a quanto osservato nei fibroblasti dei controlli sani. Questi dati suggeriscono che la riduzione dei granuli da stress nelle cellule con mutazione A382T, sia strettamente correlata ad una aumento della vulnerabilità cellulare. Quindi la mutazione A382T comprometterebbe la capacità delle cellule di assemblare i granuli da stress, rendendo le cellule più vulnerabili allo stress ossidativo e farebbe perdere loro la capacità di riprendersi e di ripristinare le condizioni antecedenti all'azione dello stress ossidativo. Nel contesto della SLA possiamo ipotizzare che la mutazione potrebbe essere responsabile della morte dei motoneuroni per un venir meno della capacità di attuare dei meccanismi di adattamento a condizioni di stress a cui si è sottoposti quotidianamente. Infatti, come già detto, la SLA è una malattia multifattoriale, il cui sviluppo sarebbe il risultato di fattori genetici e fattori ambientali, quali esposizione a sostanze tossiche. I motoneuroni, che sono le cellule che degenerano in questa patologia, sono particolarmente sensibili alle

alterazioni del microambiente e quindi un venir meno dell'attuazione di meccanismi di adattamento cellulare a situazioni di eccesso di stress ossidativo potrebbe dare origine a processi di degenerazione.

I granuli da stress svolgono la loro funzione protettiva anche modulando i processi apoptotici. Infatti dalla letteratura emerge che nei granuli da stress vengano reclutate proteine pro-apoptotiche (Arimoto et al, 2008; Kim et al, 2005)

Quindi possiamo ipotizzare che la TDP-43 moduli il meccanismo apoptotico in maniera indiretta mediante la regolazione dell'assemblaggio dei granuli da stress, i quali a loro volta inibirebbero il processo apoptotico incorporando al loro interno proteine pro-apoptotiche.

Ci sono altri dati relativi alla letteratura che suggeriscono il coinvolgimento della TDP-43 nel controllo del processo apoptotico effettuato attraverso altri meccanismi oltre a quello che vede coinvolti i granuli da stress. E' stato osservato che la rimozione della TDP-43 in cellule umane determina una sovra-regolazione della proteina Cdk6, che a sua volta determina un aumento della fosforilazione di due dei suoi principali targets, la Retinoblastoma protein (pRb) e pRb related protein (pRB2/p130) e quindi induce un incremento della morte cellulare programmata (Ayala et al, 2008b). Il coinvolgimento della TDP-43 nella regolazione dell'apoptosi potrebbe essere suggerito dal fatto che essa sia implicata nella regolazione dell'espressione e dello splicing del proto-oncogene Bcl-2, una delle principali proteine coinvolte nel processo di morte cellulare programmata (Tollervey et al, 2011; Sephton et al, 2011)

La regolazione della dinamica dei granuli da stress, è importante per garantire l'omeostasi cellulare; infatti è stato ipotizzato che gli aggregati citoplasmatici patologici tipici della SLA e di altre malattie neurodegenerative possano avere origine da una prolungata esposizione ad agenti stressogeni o anche a causa della distruzione della dinamica dei granuli da stress (McDonald et al, 2011).

Il ruolo dei granuli da stress nella SLA non sembra essere limitato alla loro azione protettiva, ma potrebbero essere essi stessi causa di neurotossicità in quei casi in cui non vengono eliminati dalla cellula, ma permangono nel citoplasma. E' stato proposto che ci sia una relazione tra granuli da stress e le inclusioni citoplasmatiche patologiche osservate nei tessuti autoptici di pazienti SLA, in cui la TDP-43 rappresenta la principale componente proteica (Liu-Yesucevitz et al, 2010). E' stato proposto che l'aggregazione anomala di proteine coinvolte in processi degenerativi, come la TDP43, indurrebbe la formazione di granuli da stress e la formazione di queste strutture

citoplasmatiche favorirebbe a sua volta l'aggregazione di queste proteine (Dewey et al, 2012). Inoltre le mutazioni legate alle patologie incrementano la tendenza di queste proteine ad aggregarsi, determinando esse stesse un aumento di produzione di granuli da stress (Liu-Yesucevitz et al, 2010).

Inoltre condizioni di stress associate all'invecchiamento determinano un potenziamento del meccanismo di formazione dei granuli, che a lungo andare può creare le condizioni per un meccanismo di aggregazione patologica (Wolozin et al, 2012). Gli aggregati citoplasmatici non solo potrebbero essere tossici per la cellula ma potrebbero anche interferire con le funzioni fisiologiche della cellula perché prolungherebbero il silenziamento di trascritti e il sequestro di proteine importanti, come la TDP-43.

A questo proposito sono stati proposti due modelli: il modello indipendente, che propone che l'aggregazione della TDP-43, sia un meccanismo indipendente dalla formazione dei granuli, in contrasto col modello precursore che propone che la formazione dei granuli inneschi l'aggregazione della TDP-43 e in seguito lo stress cronico determinerebbe la crescita degli aggregati concentrazione-dipendente (Dewey et al, 2012).

Alcuni studi suggeriscono che i granuli da stress possano essere i precursori degli aggregati citoplasmatici, dal momento che è stato osservato che gli aggregati TDP-43+ nel cervello e midollo spinale di pazienti SLA e FTLD risultano positivi anche per marker dei granuli da stress TIA-1 e eIF3 (Liu-Yesucevitz et al, 2010). Su questo punto non tutti gli studi concordano, in quanto altri autori hanno invece osservato che i marker dei granuli TIAR e HuR non sono presenti nelle inclusioni TDP-43+ osservate nel midollo spinale di pazienti SLA (Colombrita et al, 2009).

Questo potrebbe essere spiegato con l'utilizzo di tecniche diverse e quindi più o meno sensibili nei due lavori, che hanno portato a risultati diversi. Un'altra spiegazione potrebbe essere invece fornita dalle osservazioni di Parker e collaboratori che hanno indotto in cellule HeLa la formazione dei granuli da stress contenenti TDP-43. Quando l'agente stressogeno è stato rimosso, i granuli da stress si dissolvono, mentre rimangono gli aggregati di TDP43 positivi per l'ubiquitina (Parker et al, 2012).

I risultati ottenuti dei nostri esperimenti hanno permesso di capire che in colture primarie di fibroblasti umani la TDP-43 regola la formazione dei granuli da stress e che la mutazione *TARDBP*^{A382T} compromette il loro assemblaggio attraverso un meccanismo di loss of function. Dalla letteratura emerge che la proteina TDP-43 regola l'espressione di un buon numero di proteine, alcune delle quali sono indispensabili per

l'assemblaggio dei granuli da stress, come TIA-1 e G3BP (McDonald et al, 2011). Infatti il silenziamento del gene *TARDBP* nella linea cellulare HeLa determina una riduzione dei livelli di G3BP, sia della proteina che del suo mRNA, mentre determina un incremento dei livelli della proteina TIA-1 e del suo mRNA. La mutazione *TARDBP*^{R361S} ma non *TARDBP*^{D169G} determina, in linfoblasti umani, una riduzione dei livelli della proteina G3BP e un aumento dei livelli della proteina TIA-1 (McDonald et al, 2011).

Alla luce di quanto riportato da questi autori siamo andati ad indagare se la mutazione *TARDBP*^{A382T} potesse compromettere l'espressione della proteina G3BP in colture primarie di fibroblasti umani. In condizioni basali, non abbiamo osservato differenze nei livelli dell'mRNA della proteina G3BP, fra i controlli sani, i malati con mutazione *TARDBP*^{A382T} e i malati senza alcuna mutazione conosciuta (wild type per i loci *TARDBP*, *FUS* e *C9ORF72*). In seguito a trattamento con sodio arsenite abbiamo riscontrato una significativa riduzione dei livelli della proteina G3BP nei fibroblasti dei pazienti SLA con mutazione *TARDBP*^{A382T} rispetto ai fibroblasti dei controlli sani. Questi risultati confermano le osservazioni di McDonald e collaboratori, che hanno riportato una riduzione della G3BP, sia a livello dell'mRNA che della proteina, in linfociti di pazienti SLA anche senza stress ossidativo; questo potrebbe essere spiegato col fatto che la mutazione A382T abbia un effetto patogenico inferiore rispetto alla mutazione R361S come già osservato nei confronti di altre mutazioni (Mutihac et al, 2015).

Riassumendo, possiamo affermare che gli studi effettuati nel nostro laboratorio, su colture primarie di fibroblasti, hanno dimostrato che la mutazione *TARDBP*^{A382T}, potrebbe compromettere l'assemblaggio dei granuli da stress attraverso una loss of function a livello nucleare, andando a determinare la downregolazione del gene che codifica per la proteina G3BP, un componente essenziale dei granuli da stress; la compromissione dell'assemblaggio dei granuli, potrebbe privare le cellule di un meccanismo di adattamento e renderle più vulnerabili allo stress ossidativo, come suggerito dai risultati dei test di vitalità effettuati attraverso il saggio MTT.

Tuttavia non siamo a conoscenza del meccanismo attraverso il quale la TDP-43 controlla i livelli del trascritto della proteina G3BP, ma il fatto che la TDP-43 non si localizzi nei granuli, ci fa supporre che la regolazione sia a livello nucleare e che la parte della proteina coinvolta in questo meccanismo sia la zona COOH terminale, in cui sono localizzate le mutazioni che determinano queste alterazioni.

La proteina G3BP è un componente fondamentale del core dei granuli da stress. Infatti la sua iperespressione può innescare la formazione dei granuli, mentre la sua inattivazione dovuta a una specifica fosforilazione inibisce la formazione dei granuli da stress (Tourrière et al, 2003). Inoltre svolge un ruolo importante nei segnali intracellulari legati alla proliferazione e differenziazione cellulare, nell'apoptosi e nel metabolismo dell'RNA (Irvine et al., 2004). In modelli sperimentali murini è stato osservato che l'inattivazione del gene *G3BP* porta a letalità embrionale e ritardo nella crescita (Zekri et al, 2005).

Dal momento che la TDP-43 è implicata nella regolazione di un gran numero di proteine e siccome la formazione dei granuli da stress è influenzata anche da un certo numero di fattori, non possiamo escludere che nel modello cellulare da noi utilizzato ci siano altre proteine o altri meccanismi attraverso cui la TDP-43 controlli la dinamica dei granuli da stress. E' nota, ad esempio, l'importanza della proteina HDAC6, una deacetilasi citoplasmatica che agisce oltre che sulla tubulina e sulla proteina HSP90, anche nella formazione dei granuli da stress. Questa proteina interagisce con la proteina G3BP e lega con grande affinità le proteine ubiquitinate e la sua inibizione farmacologica o la delezione genetica abolisce la formazione dei granuli (Kwon et al, 2007). Diversi autori hanno osservato che l'espressione della proteina HDAC6 è regolata da TDP-43 e FUS in diversi modelli in vitro (Kim et al, 2010; Fiesel et al, 2010). Anche le proteine del citoscheletro, in particolare quelle associate ai microtubuli, potrebbero essere indirettamente coinvolte nell'alterazione dei granuli da stress mediata dalla mutazione della TDP-43.

In conclusione, questo lavoro spiega un possibile meccanismo con cui la mutazione A382T della TDP-43 determina neurotossicità nella SLA. Saranno necessari altri studi per individuare tutti i fattori coinvolti in questo meccanismo in diversi tipi di cellule e tessuti per comprendere meglio i processi patogenetici che portano alla neurodegenerazione nella SLA.

BIBLIOGRAFIA

Alexianu M.E., Ho B.K., Mohamed A.H., La Bella V., Smith R.G., Appel S.H. The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis, (1994), *Ann Neurol.*, 36(6): 846-858

Andersen P.M. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CnZn superoxide dismutase gene, (2006), *Curr Neurol Neurosci Rep*, 6(1): 37–46

Anderson P., Kedersha N. Stress granules, (2009), *Curr Biol.*, 19(10): R397-398

Anderson P., Kedersha N. RNA granules, (2006), *J Cell Biol.*, 172(6): 803-808

Anderson P., Kedersha N. Stress granules: the Tao of RNA triage, (2008), *Trends Biochem Sci.*, 33(3): 141-150

Anderson P., Kedersha N. Stressful initiations, (2002), *J Cell Sci.*, 115(Pt 16): 3227-3234

Arai T., Hasegawa M., Akiyama H., Ikeda K., Nonaka T., Mori H., Mann D., Tsuchiya K., Yoshida M., Hashizume Y., Oda T. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, (2006), *Biochem Biophys Res Commun.*, 351(3): 602-611

Araki W., Minegishi S., Motoki K., Kume H., Hohjoh H., Araki Y.M. Disease-associated mutations of TDP-43 promote turnover of the protein through the proteasomal pathway, (2014), *Mol. Neurobiol.*, 50(3): 1049-1058

Arimoto K., Fukuda H., Imajoh-Ohmi S., Saito H., Takekawa M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways, (2008), *Nat Cell Biol.*, 10 (11): 1324-1332

Armon C. Environmental risk factors for amyotrophic lateral sclerosis, (2001), *Neuroepidemiology*, 20(1): 2–69

Arrigo A.P., Suhan J.P., Welch W.J. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein, (1988), *Mol Cell Biol.*, 8(12): 5059-5071

Arundine M. and Tymianski M. Molecular mechanism of calcium dependent neurodegeneration in excitotoxicity, (2003), *Cell Calcium* 34(4-5): 325-337

Ash P.E., Zhang Y.J., Roberts C.M., Saldi T., Hutter H., Buratti E., Petrucelli L., Link C.D. Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*, (2010), *Hum. Mol. Genet.*, 19(16): 3206-3218

Aulas A., Caron G., Gkogkas C.G., Mohamed N.V., Destroismaisons L., Sonenberg N., Leclerc N., Parker J.A., Vande Velde C. G3BP1 promotes stress-induced RNA granule interactions to preserve polyadenylated mRNA ,(2015), *J. Cell. Biol.* 209: 73-84

Aulas A., Stabile S., Vande Velde C. Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP, (2012), *Mol. Neurodegener.* 7: 54.

Ayala V., Granado-Serrano A.B., Cacabelos D., Naudí A., Ilieva E.V., Boada J., Caraballo-Miralles V., Lladó J., Ferrer I., Pamplona R., Portero-Otin M. Cell stress induces TDP-43 pathological changes associated with ERK1/2 dysfunction: implications in ALS, (2011a), *ActaNeuropathol.*, 122(3): 259-270

Ayala Y.M., Misteli T., Baralle F.E. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression, (2008b), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(10): 3785-3789

Ayala Y.M., Zago P., D'Ambrogio A., Xu Y.F., Petrucelli L., Buratti E., Baralle F.E. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43, (2008a), *J Cell Sci.*,121(Pt 22): 3778-3785

Ayala Y.M., De Conti L., Avendaño-Vázquez S.E., Dhir A., Romano M., D'Ambrogio A., Tollervey J., Ule J., Baralle M., Buratti E., Baralle F.E. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop, (2011b), *EMBO J.*, 30(2): 277-288

Bannwarth S., Ait-El-Mkadem S., Chaussonot A., Genin E.C., Lacas-Gervais S., Fragaki K., Berg-Alonso L., Kageyama Y., Serre V., Moore D.G., Verschueren A., Rouzier C., Le Ber I., Augé G., Cochaud C., Lespinasse F., N'Guyen K., de Septenville A., Brice A., Yu-Wai-Man P., Sesaki H., Pouget J., Paquis-Flucklinger V. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement, (2014), *Brain*, 137(Pt 8): 2329-2345

Barber S.C. Shaw P.J. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target, (2010), *Free Radic. Biol. Med.*,48: 629-641

Barmada S.J., Skibinski G., Korb E., Rao E.J., Wu J.Y., Finkbeiner S. Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, (2010), *J Neurosci.*, 30(2): 639-649

Bäumer D., Hilton D., Paine S.M., Turner M.R., Lowe J., Talbot K., Ansorge O. Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations, (2010), *Neurology*, 75(7): 611–618

Boillée S., Vande Velde C., Cleveland D.W. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors, (2006), *Neuron*., 52(1): 39-59

Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. S., Guarnieri, M., Xu, Z. S., Wong, P. C., Brown, R. H., Jr., Price, D. L., Sisodia, S. S., and Cleveland, D. W. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity, (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(17): 8292–8296

Bosco D.A., Lemay N., Ko H.K., Zhou H., Burke C., Kwiatkowski T.J. Jr, Sapp P., McKenna-Yasek D., Brown R.H. Jr, Hayward L.J. Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules, (2010), *Hum Mol Genet.*,19(21): 4160-4175

Bruijn, L. I., Houseweart, M. K., Kato, S., Anderson, K. L., Anderson, S. D., Ohama, E., Reaume, A. G., Scott, R. W., and Cleveland, D. W. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1, (1998), *Science* 281(5384): 1851–1854

Buchan J.R., Nissan T., Parker R. Analyzing P-bodies and stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*, (2010), *Methods Enzymol.*, 470:619-640

Buchan J.R., Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation, (2009), *Mol Cell.*, 36(6): 932-941

Buchan J.R., Yoon J.H., Parker R. Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*, (2011), *J Cell Sci.*, 124(Pt 2):228-239

Buratti E, Baralle F.E. Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9, (2001), *J Biol Chem.*, 276(39): 36337-36343

Buratti E., Brindisi A., Giombi M., Tisminetzky S., Ayala Y.M., Baralle F.E. TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing, (2005), *J Biol Chem.*, 280(45): 37572-37584

Chang Y., Kong Q., Shan X., Tian G., Ilieva H., Cleveland D.W., Rothstein J.D., Borchelt D.R., Wong P.C., Lin C.L. Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS, (2008), *PLoS One*, 3(8): e2849

Chen Y.Z., Bennett C.L., Huynh H.M., Blair I.P., Puls I., Irobi J., Dierick I., Abel A., Kennerson M.L., Rabin B.A., Nicholson G.A., Auer-Grumbach M., Wagner K., De Jonghe P., Griffin J.W., Fischbeck K.H., Timmerman V., Cornblath D.R., Chance P.F. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4), (2004), *Am J Hum Genet.*, 74(6): 1128-1135

Chen-Plotkin A.S., Lee V.M., Trojanowski J.Q. TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease, (2010), *Nat Rev Neurol.*, 6(4): 211-220

Chiang P-M., Ling J., Jeong Y.H., Price D.L., Aja S.M., Wong P.C. Deletion of TDP-43 down-regulates *Tbc1d1*, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism, (2010), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(37): 16320-16324

Chiò A., Borghero G., Pugliatti M., Ticca A., Calvo A., Moglia C., Mutani R., Brunetti M., Ossola I., Marrosu M.G., Murru M.R., Floris G., Cannas A., Parish L.D., Cossu P., Abramzon Y., Johnson J.O., Nalls M.A., Arepalli S., Chong S., Hernandez D.G., ITALSGEN Consortium, Traynor B.J., Restagno G., Large proportion of amyotrophic lateral sclerosis cases in Sardinia due to a single founder mutation of the *TARDBP* gene, (2011), *Arch. Neurol.*, 68(5): 594–598

Chio` A., Borghero G., Restagno G., Mora G., Drepper C., . Traynor B. J., Sendtner M., Brunetti M., Ossola I., Calvo A., Pugliatti M., Sotgiu M.A., Murru M.R., Marrosu M.G., Marrosu F., Marinou K., Mandrioli J., Sola P. Caponnetto C., Mancardi G., Mandich P., La Bella V., Spataro R., Conte A., Monsurro` M.R., Tedeschi G., Pisano F., Bartolomei I., Salvi F., Lauria Pinter G., Simone I., Logroscino G., Gambardella A., Quattrone A., Lunetta C., Volanti P., Zollino M., Penco S., Battistini S., the ITALSGEN consortium, Alan E. Renton A.E., Majounie E., Abramzon Y. Conforti F.L., Giannini F., Corbo M. and Sabatelli M. Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72, (2012), *Brain*, 135: 784–793

Clement A.M., Nguyen M.D., Roberts E.A., Garcia M.L., Boillée S., Rule M., McMahon A.P., Doucette W., Siwek D., Ferrante R.J., Brown R.H. Jr, Julien J.P., Goldstein L.S., Cleveland D.W. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice, (2003), *Science*, 302(5642): 113-117

Colombrita C., Onesto E., Buratti E., de la Grange P., Gumina V., Baralle F.E., Silani V., Ratti A. From transcriptomic to protein level changes in TDP-43 and FUS loss-of-function cell models, (2015), *Biochim Biophys Acta*, 1849(12): 1398-1410

Colombrita C., Zennaro E., Fallini C., Weber M., Sommacal A., Buratti E., Silani V., Ratti A. TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult, (2009), *J Neurochem.*, 111(4): 1051-1061

Connolly G.P. Fibroblast models of neurological disorders: fluorescence measurement studies. *Trends Pharmacol Sci.*, 1998, 19(5): 171-177

Corrado L., Ratti A., Gellera C. Buratti E F. E. Castellotti B., Carlomagno Y., Ticozzi N., Mazzini L., Testa L., F. Taroni F., Baralle F.E., Silani V., D'Alfonso S. High frequency of TARDBP gene mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis, (2009), *Hum Mutat.*, 30 (4): 688 – 694

Cox P.A., Sacks O.W. Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam, (2002), *Neurology*, 58(6): 956-959

Cushman M., Johnson B.S., King O.D., Gitler A.D., Shorter J. Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity, (2010), *J Cell Sci.*,123(Pt 8): 1191-1201

Da Cruz S, Cleveland D.W. Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond, (2011), *Curr Opin Neurobiol.*, (6): 904-919

DeGracia D.J., Rafols J.A., Morley S.J., Kayali F. Immunohistochemical mapping of total and phosphorylated eukaryotic initiation factor 4G in rat hippocampus following global brain ischemia and reperfusion, (2006), *Neuroscience*, 139(4): 1235-1248

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

Del Bo R., Ghezzi S., Corti S . Pandolfo M., Ranieri M., Santoro D., Ghione I., Prella A., Orsetti V., Mancuso M., Sorarù G., Briani C., Angelini C., Siciliano G., Bresolin N., Comi G.P. TARDBP (TDP-43) sequence analysis in patients with familial and sporadic ALS: identification of two novel mutations, (2009), *Eur. J. Neurol.*, 16(6): 727 – 732

Dewey C.M., Cenik B., Sephton C.F., Dries D.R., Mayer P. 3rd, Good S.K., Johnson B.A., Herz J., Yu G. TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor, (2011), *Mol Cell Biol.*, 31(5): 1098-1108

Dewey C.M., Cenik B., Sephton C.F., Johnson B.A., Herz J., Yu G. TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key?, (2012), *Brain Res.*, 1462: 16-25

Di Giorgio F.P., Carrasco M.A., Siao M.C., Maniatis T., Eggan K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model, (2007), *Nat. Neurosci.*, 10(5): 608-614

Di Giorgio F.P., Gabriella L., Boulting G. L., Bobrowicz S., Eggan K.C. Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation, (2008), *Cell Stem Cell.*, 3(6): 637-648

Didiot M.C., Subramanian M., Flatter E., Mandel J.L, Moine H. Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly, (2009), *Mol Biol Cell.*, 20(1): 428-437

Duan W., Li X., Shi J., Guo Y., Li Z., Li C. Mutant TAR DNA-binding protein-43 induces oxidative injury in motor neuron-like cell, (2010), *Neuroscience*, 169: 1621-1629

Emara M. M., Ivanov P., Hickman T., Dawra N., Tisdale S., Kedersha N., Hu G.F., Anderson P.. Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly.,(2010), *J Biol Chem.*, 285(14): 10959-10968.

Ferraiuolo L., Kirby J., Grierson A.J., Sendtner M., Shaw P.J. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis, (2011), *Nat.Rev.Neurol.*, 7: 616-630

Fiesel F.C., Voigt A., Weber S.S., Van den Haute C., Waldenmaier A., Görner K., Walter M., Anderson M.L., Kern J.V., Rasse T.M., Schmidt T., Springer W., Kirchner R., Bonin M., Neumann M., Baekelandt V., Alunni-Fabbroni M., Schulz J.B., Kahle P.J. Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6, (2010), *EMBO J.*, 29(1): 209-221

Fitzmaurice P.S., Shaw I.C., Kleiner H.E., Miller R.T., Monks T. J., Lau S.S., Mitchel J.D., Lynch P.G. Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis, (1996), *Muscle Nerve*, 19(6): 797-798

Floris G, Borghero G, Cannas A, Di Stefano F, Murru MR, Corongiu D, Cuccu S, Tranquilli S, Cherchi MV, Serra A, Loi G, Marrosu MG, Chiò A, Marrosu F. Clinical phenotypes and radiological findings in frontotemporal dementia related to TARDBP mutations. *J Neurol.*, (2015), 262(2): 375-384.

Fornai F., Longone P., Ferrucci M., Lenzi P., Ciro Isidoro C., Ruggieri S., Paparelli A. Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis, (2008), *Autophagy*, 4: 527-530

Fuentealba R.A., Udan M., Bell S., Wegorzewska I., Shao J., Diamond M.I., Weihl C.C., Baloh R.H. Interaction with polyglutamine aggregates reveals a Q/N-rich domain in TDP-43, (2010), *J Biol Chem.*, 285(34): 26304-26314

Gijssels I., Van Langenhove T., van der Zee, J., Slegers K., Philtjens S., Kleinberger G., Janssens J., Bettens, K., Van Cauwenberghe C., Pereson S., Engelborghs S., Sieben A., De Jonghe P., Vandenberghe R., Santens P., De Bleecker J., Maes G., Bäumer V., Dillen L., Joris G., Cuijt I., Corsmit E., Elinck E., Van Dongen J., Vermeulen S., Van den Broeck M., Vaerenberg C., Mattheijssens M., Peeters K., Robberecht W., Cras P., Martin J.J., De Deyn P.P., Cruts M., VanBroeckhoven C. A C9ORF72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study, (2012), *Lancet Neurol.* 11: 54–65

Godena V.K., Romano G., Romano M., Appocher C., Klima R., Buratti E., Baralle F.E., Feiguin F. TDP-43 regulates Drosophila neuromuscular junctions growth by modulating Futsch/MAP1B levels and synaptic microtubules organization, (2011), *PLoS One*, 6(3): e17808

Greenway M.J., Andersen P.M., Russ C., Ennis S., Cashman S., Donaghy C., Patterson V., Swingler R., Kieran D., Prehn J., Morrison K.E., Green A., Acharya K.R., Brown R.H. Jr, Hardiman O. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis, *Nat Genet.*, (2006), 38(4): 411-413

Groušl T., Ivanov P., Frýdlová I., Vasicová P., Janda F., Vojtová J., Malínská K., Malcová I., Nováková L., Janosková D., Valásek L., Hasek J. Robust heat shock induces eIF2 α -phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, (2009), *J Cell Sci.*, 122(Pt 12): 2078-2088

Guil S., Long J.C., Cáceres J.F. hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response, (2006), *Mol Cell Biol.*, 26(15): 5744-5758

Guo W., Chen Y., Zhou X., Kar A., Ray P., Chen X., Rao E.J., Yang M., Ye H., Zhu L., Liu J., Xu M., Yang Y., Wang C., Zhang D., Bigio E.H., Mesulam M., Shen Y., Xu Q., Fushimi K., Wu J.Y. An ALS-associated mutation affecting TDP-43 enhances protein aggregation, fibril formation and neurotoxicity, (2011), *Nat Struct Mol Biol.*, 18(7): 822-830

Harding H.P., Zhang Y., Bertolotti A., Zeng H., Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response, (2000), *Mol Cell.*, 5(5): 897-904

Hewitt C., Kirby J., Highley J.R., Hartley J.A., Hibberd R., Hollinger H.C., Williams T.L., Ince P.G., McDermott C.J., Shaw P. Novel FUS/TLS mutations and pathology in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, (2010), *Arch Neurol.*, 67(4): 455-461

Hitomi J., Katayama T., Eguchi Y., Kudo T., Taniguchi M., Koyama Y., Manabe T., Yamagishi S., Bando Y., Imaizumi K., Tsujimoto Y., Tohyama M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death, (2004), *J Cell Biology*, 165 (3): 347-356

Hua Y, Zhou J. Rpp20 interacts with SMN and is re-distributed into SMN granules in response to stress.(2004) *Biochem Biophys Res Commun*. 314(1):268-76.

Hummel T., Krukkert K., Roos J., Davis G., Klämbt C. *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development, (2000), *Neuron*., 26(2): 357-370

Igaz L.M., Kwong L.K., Chen-Plotkin A., Winton M.J., Unger T.L., Xu Y., Neumann M., Trojanowski J.Q., Lee V.M. Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies, (2009), *J Biol Chem*., 284(13): 8516-8524

Igaz L.M., Kwong L.K., Lee E.B., Chen-Plotkin A., Swanson E., Unger T., Malunda J., Xu Y., Winton M.J., Trojanowski J.Q., Lee V.M. Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice, (2011), *J Clin Invest*.,121(2): 726-738

Iguchi Y., Katsuno M., Niwa J., Yamada S., Sone J., Waza M., Adachi H., Tanaka F., Nagata K., Arimura N., Watanabe T., Kaibuchi K., Sobue G. TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases, (2009), *J Biol Chem*., 284(33): 22059-22066

Imbert G., Saudou F., Yvert G., Devys D., Trottier Y., Garnier J.M., Weber C., Mandel J.L., Cancel G., Abbas N., Dürr A., Didierjean O., Stevanin G., Agid Y., Brice A. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats, (1996), *Nat Genet*.,14(3): 285-291

Ince P., Stout N., Shaw P., Slade J., Hunziker W., Heizmann C.W., Baimbridge K.G. Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease, (1993), *Neuropathol. Appl. Neurobiol*., 19(4): 291-299

Irvine K., Stirling R., Hume D., Kennedy D. Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP, (2004), *Int J Dev Biol*., 48(10): 1065-1077

Jaiswal M.K. ,Calcium, mitochondria, and the pathogenesis of ALS: the good, the bad, and the ugly, (2013), *Front Cell Neurosci*, 7: 199

Jiang H.Y., Wek S.A., McGrath B.C., Scheuner D., Kaufman R.J., Cavener D.R., Wek R.C. Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required

for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses, (2003), *Mol Cell Biol.*, 23(16): 5651-5663

Johnson B.S., Snead D., Lee J.J., McCaffery J.M., Shorter J., Gitler A.D. TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity, (2009), *J Biol Chem.*, 284(30): 20329-20339

Johnson J.O., Mandrioli J., Benatar M., Abramzon Y., Van Deerlin V.M., Trojanowski J.Q., Gibbs J.R., Brunetti M., Gronka S., Wu J., Ding J., McCluskey L., Martinez-Lage M., Falcone D., Hernandez D.G., Arepalli S., Chong S., Schymick J.C., Rothstein J., Landi F., Wang Y.D., Calvo A., Mora G., Sabatelli M., Monsurrò M.R., Battistini S., Salvi F., Spataro R., Sola P., Borghero G.; ITALSGEN Consortium, Galassi G., Scholz S.W., Taylor J.P., Restagno G., Chiò A., Traynor B.J. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS, (2010), *Neuron.*, 68 (5): 857–864

Kabashi E., Lin L., Tradewell M.L., Dion P.A., Bercier V., Bourguin P., Rochefort D., Bel Hadj S., Durham H.D., VandeVelde C., Rouleau G.A., Drapeau P. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo, (2010), *Hum Mol Genet.*, 19(4): 671-683

Kabashi E., Valdmanis P.N., Dion P., Spiegelman D., McConkey B. J., Vande Velde C., Bouchard J.-P., Lacomblez .L., Pochigaeva K., Francois Salachas.F., Pradat P.-F., Camu W., Meininger V., Dupre N., Rouleau G.A. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis, (2008), *Nat. Genet.*, 40 (5): 572 – 574

Kaufman R.J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease, (2002), *J.Clin. Invest.*, 110: 1389-1398

Kaur S.J., McKeown S.R., Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis, (2016), *Gene*, 577: 109-18

Kayali F., Montie H.L., Rafols J.A., DeGracia D.J. Prolonged translation arrest in reperfused hippocampal cornu Ammonis 1 is mediated by stress granules, (2005), *Neuroscience*, 134(4): 1223-1245

Kedersha N., Stoecklin G., Ayodele M., Yacono P., Lykke-Andersen J., Fritzler M.J., Scheuner D., Kaufman R.J., Golan D.E., Anderson P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling, (2005), *J Cell Biol.*, 169(6): 871-884

Kedersha N.L., Gupta M., Li W., Miller I. Anderson P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules, (1999), *J Cell Biol.*, 147(7): 1431-1442

Kiernan M.C., Vucic S., Cheah B.C., Turner M.R., Eisen A., Orla Hardiman O., Burrell J.R. , Zoing M.C. Amyotrophic lateral sclerosis, (2011), *Lancet*, 377: 942-955

Kim SH1, Dong WK, Weiler IJ, Greenough WT. Fragile X mental retardation protein shifts between polyribosomes and stress granules after neuronal injury by arsenite stress or in vivo hippocampal electrode insertion.(2006) *J Neurosci.*26(9):2413-8.

Kim S.H., Shanware N.P., Bowler M.J., Tibbetts R.S. Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA, (2010), *J Biol Chem.*, 285(44): 34097-34105

Kim W.J., Back S.H., Kim V., Ryu I., Jang S.K. Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions, (2005), *Mol Cell Biol.*, 25(6): 2450-2462

Kraemer B.C., Schuck T., Wheeler J.M., Robinson L.C., Trojanowski J.Q., Lee V.M., Schellenberg G.D. Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis, (2010), *Acta Neuropathol.*, 119(4): 409-419

Kramer S., Queiroz R., Ellis L., Webb H., Hoheisel J.D., Clayton C., Carrington M. Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169, (2008), *J Cell Sci.*, 121(Pt 18): 3002-3014

Kühnlein P, Sperfeld A.D., Vanmassenhove B., Van Deerlin V., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Kretzschmar H.A., Ludolph A.C., Neumann M. Two German kindreds with familial amyotrophic lateral sclerosis due to TARDBP mutations, (2008), *Arch Neurol.*, 65(9): 1185-1189

Kwiatkowski Jr T.J., Bosco D.A., Leclerc A.L., Tamrazian E., Vanderburg C.R., Russ C., Davis A., Gilchrist J., Kasarskis E.J., Munsat T., Valdmanis P., Rouleau G.A., Hosler B.A., Cortelli P., de Jong P.J., Yoshinaga Y., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Yan J., Ticozzi N., Siddique T., McKenna-Yasek D., Sapp P.C., Horvitz H.R., Landers J.E., Brown R.H. Jr. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis, (2009), *Science*, 323: 1205–1208

Kwon S., Zhang Y., Matthias P. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response, (2007), *Genes Dev.*, 21(24): 3381-3394

- Lansbury P.T., Lashuel H.A. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic, (2006), *Nature*, 443 (7113): 774-779
- Le Quesne J.P., Spriggs K.A., Bushell M., Willis A.E. Dysregulation of protein synthesis and disease, (2010), *J Pathol.*, 220(2): 140-151
- Lee E.B., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration, (2011), *Nat Rev Neurosci.*, 13(1): 38-50
- Leigh P.N. Chapter 13 Amyotrophic lateral sclerosis. *Handb Clin Neurol* / Ed by PJ Vinken GW Bruyn, (2007), 82: 249–278
- Lenzi J., De Santis R., de Turris V., Morlando M., Laneve P., Calvo A., Caliendo V., Chiò A., Rosa A., Bozzoni I. ALS mutant FUS proteins are recruited into stress granules in induced pluripotent stem cell-derived motoneurons, (2015), *Dis Model Mech.*, 8(7): 755-766
- Li .Y, Ray P., Rao E.J., Shi C., Guo W., Chen X., Woodruff E.A. 3rd, Fushimi K., Wu J.Y. A Drosophila model for TDP-43 proteinopathy., (2010), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(7): 3169-3174
- Li Y.R., King O.D., Shorter J., Gitler A.D. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis, (2013), *J. Cell Biol.* 201: 361–372
- Liachko N.F., Guthrie C.R., Kraemer B.C. Phosphorylation promotes neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of TDP-43 proteinopathy, (2010), *J Neurosci.*, 30(48): 16208-16219
- Lin C.L., Bristol L.A., Jin L., Dykes-Hoberg M., Crawford T., Clawson L., Rothstein J.D. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis, (1998), *Neuron.*, 20(3): 589-602
- Liu-Yesucevitz L., Bilgutay A., Zhang Y.J., Vanderweyde T., Citro A., Mehta T., Zaarur N., McKee A., Bowser R., Sherman M., Petrucelli L., Wolozin B. Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue, (2010), *PLoS One*, 5(10): e13250
- Logroscino G., Traynor B.J., Hardiman O., Chiò A., Mitchell D., Swingler R.J., Millul A., Benn E., Beghi E.. EURALS. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe, (2010), *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, 81(4): 385-390
- Loschi M., Leishman C.C., Berardone N., Boccaccio G.L. Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics, (2009), *J Cell Sci.*, 122(Pt 21): 3973-3982

Lu Y., Ferris J., Gao F.B. Frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis-associated disease protein TDP-43 promotes dendritic branching, (2009), *Mol Brain.*, 2:30

Mackenzie I.R., Bigio E.H., Ince P.G., Geser F., Neumann M., Cairns N.J., Kwong L.K., Forman M.S., Ravits J., Stewart H., Eisen A., McClusky L., Kretzschmar H.A., Monoranu C.M., Highley J.R., Kirby J., Siddique T., Shaw P.J., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations, (2007), *Ann Neurol.*, 61(5): 427-434

Mackenzie I.R., Rademakers R., Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, (2010), *Lancet Neurol.*, 9(10): 995-1007

Marangi G, Traynor BJ. Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: new genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges, (2015), *Brain Res.* 1607: 75-93.

Maruyama H., Morino H., Ito H., Izumi Y., Kato H., Watanabe Y., Kinoshita Y., Kamada M., Nodera H., Suzuki H., Komure O., Matsuura S., Kobatake K., Morimoto N., Abe K., Suzuki N., Aoki M., Kawata A., Hirai T., Kato T., Ogasawara K., Hirano A., Takumi T., Kusaka H., Hagiwara K., Kaji R., Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis, (2010), *Nature*, 465: 223–226

Matter C., Pribadi M., Liu X., Trachtenberg J.T. Delta-catenin is required for the maintenance of neural structure and function in mature cortex in vivo, (2009), *Neuron.*, 64(3): 320-327

McDonald K.K., Aulas A., Destroismaisons L., Pickles S., Beleac E., Camu W., Rouleau G.A., Vande Velde C. TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1, (2011), *Hum Mol Genet.*, 20(7): 1400-1410

McEwen E., Kedersha N., Song B., Scheuner D., Gilks N., Han A., Chen J.J., Anderson P., Kaufman R.J. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure, (2005), *J Biol Chem.*, 280(17): 16925-16933

Meyerowitz J., Parker S.J., Vella L.J., Ng DCh, Price K.A., Liddell J.R., Caragounis A., Li QX, Masters C.L., Nonaka T., Hasegawa M., Bogoyevitch M.A., Kanninen K.M., Crouch P.J., White A.R.C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress, (2011), *Mol Neurodegener.*, 6: 57

Mitchell J., Paul P., Chen H.J., Morris A., Payling M., Falchi M., Habgood J., Panoutsou S., Winkler S., Tisato V., Hajitou A., Smith B., Vance C., Shaw C.,

Mazarakis N.D., de Bellerocche J. Familial amyotrophic lateralsclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase, (2010), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (16): 7556–7561

Mitchell J.D. Amyotrophic lateral sclerosis: toxins and environment, (2000), *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 1(4): 235–250

Moreno J.A., Radford H., Peretti D., Steinert J.R., Verity N., Martin M.G., Halliday M., Morgan J., Dinsdale D., Ortori C.A., Barrett D.A., Tsaytler P., Bertolotti A., Willis A.E., Bushell M., Mallucci G.R. Sustained translational repression by eIF2 α -P mediates prion neurodegeneration, (2012), *Nature*, 485(7399): 507-511

Mutihac R., Alegre-Abarrategui J., Gordon D., Farrimond L., Yamasaki-Mann M., Talbot K., Wade-Martins R. TARDBP pathogenic mutations increase cytoplasmic translocation of TDP-43 and cause reduction of endoplasmic reticulum Ca²⁺ signaling in motor neurons, (2015), *Neurobiol Dis.*, 75: 64-77

Nagai M., Re D.B., Nagata T., Chalazonitis A., Jessell T.M., Wichterle H., Przedborski S. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motoneurons, (2007), *Nat. Neurosci.*, 10: 615-622

Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., Truax A.C., Micsenyi M.C., Chou T.T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C.M., McCluskey L.F., Miller B.L., Masliah E., Mackenzie I.R., Feldman H., Feiden W., Kretschmar H.A., Trojanowski J.Q., Lee V.M. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, (2006), *Science*, 314 (5796): 130–133

Nishimura A.L., Mitne-Neto M., Silva H.C., Richieri- Costa A., Middleton S., Cascio D., Kok F., Oliveira J.R.M., Gillingwater T., Webb J., Skehel P., Zatz M. A mutation in the vesicle trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis, (2004), *Am J Hum Genet.*, 75: 822-831

Nishimura A.L., Zupunski V., Troakes C., Kathe C., Fratta P., Howell M., Gallo J.M., Hortobágyi T., Shaw C.E., Rogelj B. Nuclear import impairment causes cytoplasmic trans-activation response DNA-binding protein accumulation and is associated with frontotemporal lobar degeneration, (2010), *Brain*, 133(Pt 6): 1763-1771

Nonaka T., Kametani F., Arai T., Akiyama H., Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43, (2009), *Hum Mol Genet.*, 18(18): 3353-3364

Nonhoff U., Ralser M., Welzel F., Piccini I., Balzereit D., Yaspo M.L., Lehrach H., Krobitsch S. Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules, (2007), *Mol Biol Cell.*, 18(4): 1385-1396

Orrù S., Manolakos E., Orrù N., Kokotas H., Mascia V., Carcassi C., Petersen M., High frequency of the TARDBP p.Ala382Thr mutation in Sardinian patients with amyotrophic lateral sclerosis, (2012), *Clin.Genet.*, 81(2): 172–178

Ou S.H., Wu F., Harrich D., García-Martínez L.F., Gaynor R.B. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs, (1995), *J. Virol.*, 69 (6): 3584-3596

Parker S.J., Meyerowitz J., James J.L., Liddell JR, Crouch P.J., Kanninen K.M., White A.R. Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates, (2012), *Neurochem Int.*, 60(4): 415- 424

Pasinelli P., Belford M.E., Lennon N., Bacskai B.J., Hyman B.T., Trotti D., Brown R.H. Jr Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria, (2004), *Neuron.*, 43(1): 19-30

Pedrini S., Sau D., Guareschi S., Bogush M., Brown R.H. Jr, Naniche N., Kia A., Trotti D., Pasinelli P. ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2, (2010), *Hum Mol Genet.*, 19(15): 2974-2986

Phillips K., Kedersha N., Shen L., Blackshear P.J., Anderson P. Arthritis suppressor genes TIA-1 and TTP dampen the expression of tumor necrosis factor alpha, cyclooxygenase 2, and inflammatory arthritis (2004), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7): 2011-2016

Polymenidou M., Lagier-Tourenne C., Hutt K.R., Huelga S.C., Moran J., Liang T.Y., Ling S.C., Sun E., Wancewicz E., Mazur C., Kordasiewicz H., Sedaghat Y., Donohue J.P., Shiue L., Bennett C.F., Yeo G.W., Cleveland D.W. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43, (2011), *Nat Neurosci.*, 14(4):459-468

Pulst S.M., Nechiporuk A., Nechiporuk T., Gispert S., Chen X.N., Lopes-Cendes I., Pearlman S., Starkman S., Orozco-Diaz G., Lunke A., DeJong P., Rouleau G.A., Auburger G., Korenberg J.R., Figueroa C., Sahba S. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2, *Nat Genet.*, (1996), 14(3): 269-276

Renton A.E, Chiò A., Traynor B.J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics, (2014), *Nat Neurosci.*, 17(1): 17-23

Renton A.E., Majounie E., Waite A., Simón-Sánchez J., Rollinson S., Gibbs J.R., Schymick J.C., Laaksovirta H., van Swieten J.C., Myllykangas L., Kalimo H., Paetau A., Abramzon Y., Remes A.M., Kaganovich A., Scholz S.W., Duckworth J., Ding J., Harmer D.W., Hernandez D.G., Johnson J.O., Mok K., Ryten M., Toulson G., Richardson A., Gerhard A., Snowden J., Mann D., Neary D., Nalls M.A., Peuralinna T., Jansson L., Isoviita V.M., Kaivorinne A.L., Hölttä-Vuori M., Ikonen E., Sulkava

R., Benatar M., Wu J., Chiò A., Restagno G., Borghero G., Sabatelli M., the ITALSGEN Consortium, Heckerman D., Rogaeva E., Zinman L., Rothstein J.D., Sendtner M., Drepper C., Eichler E.E., Alkan C., Abdullaev Z., Pack S.D., Dutra A., Pak E., Hardy J., Singleton A., Williams N.M., Heutink P., Pickering-Brown S., Morris H.R., Tienari P.J., Traynor B.J., 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD, (2011), *Neuron*, 72(2): 257–268

Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, (1993), *Nature*, 362: 59–62

Rutherford N.J., Zhang Y.J., Baker M., Gass J.M., Finch N.A., Xu Y.F., Stewart H., Kelley B.J., Kuntz K., Crook R.J., Sreedharan J., Vance C., Sorenson E., Lipka C., Bigio E.H., Geschwind D.H., Knopman D.S., Mitsumoto H., Petersen R.C., Cashman N.R., Hutton M., Shaw C.E., Boylan K.B., Boeve B., Graff-Radford N.R., Wszolek Z.K., Caselli R.J., Dickson D.W., Mackenzie I.R., Petrucelli L., Rademakers R. Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis, (2008), *PLoS Genet.*, 4(9): e1000193

Sabatelli M., Conforti F.L., Zollino M., Mora G., Monsurrò M.R., Volanti P., Marinou K., Salvi F., Corbo M., Giannini F., Battistini S., Penco S., Lunetta C., Quattrone A., Gambardella A., Giancarlo Logroscino G., Simone I., Bartolomei I., Pisano F., Tedeschi G., Conte A., Spataro R., La Bella V., Caponnetto C., Mancardi G., Mandich P., Sola P., Mandrioli J., Renton A. E., Majounie E., Abramzon Y., Marrosu F., Marrosu M.G., Murru M. R., Sotgiu M.A., Pugliatti M., Rodolico C., the ITALSGEN Consortium2, Moglia C., Calvo A., Ossola I., Brunetti M., Traynor B. J., Borghero G., Restagno G., Chiò A., C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions in the Italian sporadic ALS population, (2012), *Neurobiology of Aging*, 33: 1848.e15–1848.e20

Sabatelli M., Zollino M., Conte A., Del Grande A., Marangi G., Lucchini M., Mirabella M., Romano A., Piacentini R., Bisogni G., Lattante S., Luigetti M., Rossini P.M., Moncada A: Primary fibroblasts cultures reveal TDP-43 abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis patients with and without SOD1 mutations , (2015), *Neurobiol Aging*. 36(5): 2005.e5-2005.e13

Sasaki S. and Iwata M. Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis, (2007), *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 66(1): 10–16

Sephton C.F., Good S.K., Atkin S., Dewey C.M., Mayer P. 3rd, Herz J., Yu G. TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development, (2010), *J Biol Chem.*, 285(9): 6826-6834

Sephton C.F., Cenik C., Kucukural A., Dammer E.B., Cenik B., Han Y., Dewey C.M., Roth F.P., Herz J., Peng J., Moore M.J., Yu G. Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes, (2011), *J Biol Chem.*, 286(2):1204-1215

Shaw P.J., Forrest V., Ince P.G., Richardson J.P., Wastell H.J. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients, (1995b), *Neurodegeneration*, 4(2): 209-216

Shaw P.J., Ince P.G., Falkous G., Mantle D. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord, (1995a), *Ann. Neurol.*, 38(4): 691-695

Shibata N., Nagai R., Uchida K., Horiuchi S., Yamada S., Hirano A., Kawaguchi M., Yamamoto T., Sasaki S., Kobayashi. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients, (2001), *Brain Research*, 917(1): 97-104

Singh R.K., Cooper T.A. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics, (2012), *Trends Mol Med*, 18(8): 472-482

Srivastava S.P., Kumar K.U., Kaufman R.J. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, (1998), *J Biol Chem.*, 273(4): 2416-2423

Stallings N.R., Puttaparthi K., Luther C.M., Burns D.K., Elliott J.L. Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43, (2010), *Neurobiol Dis.*, 40(2): 404-414

Synofzik M., Ronchi D., Keskin I., Basak A.N., Wilhelm Gobbi C., Birve A., Biskup S., zecca C., Fernández-Santiago R., Kaugesaar T., Shöls L., Marklund S.L., Andersen P.M. Mutant superoxide dismutase-1 indistinguishable from wild-type causes ALS, (2012), *Hum Mol Genet.*, 21(16): 3568-3574

Tafuri F., Ronchi D., Magri F., Comi G.P., Corti S. SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis, (2015), *Front Cell Neurosci.*, 9:336

Thomas M.G., Loschi M., Desbats M.A., Boccaccio G.L. RNA granules: the good, the bad and the ugly, (2011), *Cell Signal.*, 23(2): 324-334

Tollervey J.R., Curk T., Rogelj B., Briese M., Cereda M., Kayikci M., König J., Hortobágyi T., Nishimura A.L., Zupunski V., Patani R., Chandran S., Rot G., Zupan B., Shaw C.E., Ule J. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43, (2011), *Nat Neurosci.*, 14(4): 452-458

Tourrière H., Chebli K., Zekri L., Courselaud B., Blanchard J.M., Bertrand E., Tazi J. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules, (2003), *J Cell Biol.*, 160(6): 823-831

van Blitterswijk M. and Landers J.E. RNA processing pathways in amyotrophic lateral sclerosis, (2010), *Neurogenetics*, 11(3): 275-290

Van Deerlin V.M., Leverenz J.B., Bekris L.M., Bird T.D., Yuan W., Elman L.B., Clay D., Wood E.M., Chen-Plotkin A.S., Martinez-Lage M., Steinbart E., McCluskey L., Grossman M., Neumann M., Wu I.L., Yang W.S., Kalb R., Galasko D.R., Montine T.J., Trojanowski J.Q., Lee V.M., Schellenberg G.D., Yu C.E. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis, (2008), *Lancet Neurol.*, 7(5): 409-416

van Eersel J., Ke Y.D., Gladbach A., Bi M., Götz J., Kril J.J., Ittner L.M. Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon proteasome inhibition in cultured neurons, (2011), *PLoS One*, 6(7): e22850

Vucic S., Rothstein J.D., Kiernan M.C. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies, (2014), *Trends Neurosci.*, (8): 433-442

Walker A.K., Soo K.Y., Sundaramoorthy V., Parakh S., Ma Y., Farg M.A., Wallace R.H., Crouch P.J., Turner B.J., Horne M.K., Atkin J.D. ALS-associated TDP-43 induces endoplasmic reticulum stress, which drives cytoplasmic TDP-43 accumulation and stress granule formation, (2013), *PLoS One*, 8(11): e81170

Walsh M.J., Cooper-Knock J., Dodd J.E., Stopford M.J., Mihaylov S.R., Kirby J., Shaw P.J., Hautbergue G.M. Invited review: decoding the pathophysiological mechanisms that underlie RNA dysregulation in neurodegenerative disorders: a review of the current state of the art, (2015), *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 41(2): 109-134

Wang J.W., Brent J.R., Tomlinson A., Shneider N.A., McCabe B.D. The ALS-associated proteins FUS and TDP-43 function together to affect *Drosophila* locomotion and life span, (2011), *J Clin Invest.*, 121(10): 4118-4126

Warraich S.T., Yang S., Nicholson G.A., Blair I.P. TDP-43: a DNA and RNA binding protein with roles in neurodegenerative diseases, (2010), *Int J Biochem Cell Biol.*, 42(10): 1606-1609

Watanabe S, Kaneko K, Yamanaka K. Accelerated disease onset with stabilized familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked mutant TDP-43 proteins, (2013), *J. Biol. Chem.*, 288(5): 3641-3654

Wek S.A., Zhu S., Wek R.C. The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids, (1995), *Mol Cell Biol.*, 15(8): 4497-4506

Wilczynska A., Aigueperse C., Kress M., Dautry F., Weil D. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules, (2005), *J Cell Sci.*, 118(Pt 5): 981-992

Williams B.R. Signal integration via PKR, (2001), *Sci STKE*, (89):re2

Williams T.L., Day N.C., Ince P.G., Kamboj R.K., Shaw P.J. Calcium permeable α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis, (1997), *Ann. neurol.*, 42(2): 200-207

Wils H., Kleinberger G., Janssens J., Pereson S., Joris G., Cuijt I., Smits V., Ceuterick-de Groote C., Van Broeckhoven C., Kumar-Singh S. TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration, (2010), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(8): 3858-3863

Wolozin B. Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration, (2012), *Mol Neurodegener.*, 7: 56

Wood-Allum C., and Shaw P.J. Motor neuron disease: a practical update on diagnosis and management (2010), *Clin. Med.*, 10(3): 252-258

Wu L.S., Cheng W.C., Hou S.C., Yan Y.T., Jiang S.T., Shen C.K. TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis, (2010), *Genesis*, 48(1): 56-62

Xu Y.F., Gendron T.F., Zhang Y.J., Lin W.L., D'Alton S., Sheng H., Casey M.C., Tong J., Knight J., Yu X., Rademakers R., Boylan K., Hutton M., McGowan E., Dickson D.W., Lewis J., Petrucelli L. Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice, (2010), *J Neurosci.*, 30(32): 10851-10859

Xu Z.S. Does a loss of TDP-43 function cause neurodegeneration?, (2012), *Mol. Neurodegener.*, 7: 27

Yamagishi S., Koyama Y., Katayama T., Taniguchi M., Hitomi J., Kato M., Aoki M., Itoyama Y., Kato S., Tohyama M. An in vitro model for Lewy Body-Like Hyaline inclusion/astrocytic hyaline inclusion: induction by ER Stress with an ALS-Linked SOD1 Mutation, (2007), *PLoSOne* 2(10): e1030

Yang C., Tan W., Whittle C., Qiu L., Cao L., Akbarian S., Xu Z.. The C-terminal TDP-43 fragments have a high aggregation propensity and harm neurons by a dominant-negative mechanism, (2010), PLoS One, 5(12): e15878

Yang Y., Hentati A., Deng H.X., Dabbagh O., Sasaki T., Hirano M., Hung W.Y., Ouahchi K., Yan J., Azim A.C., Cole N., Gascon G., Yagmour A, Ben-Hamida M., Pericak-Vance M., Hentati F., Siddique T.. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis, (2001), Nat Genet., 29(2): 160-165

Zekri L., Chebli K., Tourrière H., Nielsen F.C., Hansen T.V., Rami A., Tazi J. Control of fetal growth and neonatal survival by the RasGAP-associated endoribonuclease G3BP, (2005), Mol Cell Biol., 25(19): 8703-8716

Zhang Y.J., Xu Y.F., Cook C., Gendron T.F., Roettges P., Link C.D., Lin W.L., Tong J., Castanedes-Casey M., Ash P., Gass J., Rangachari V., Buratti E., Baralle F., Golde T.E., Dickson D.W., Petrucelli L. Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity, (2009), Proc Natl Acad Sci U S A, 106(18): 7607-7612

Zou Z.Y., Liu M.S., Li X.G., Cui L.Y. Mutations in SOD1 and FUS caused juvenile-onset sporadic amyotrophic lateral sclerosis with aggressive progression, (2015), Ann Transl Med., 3(15): 221

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Professoressa Sogos e la Dottoressa Carla Brancia per avermi seguito in questi tre anni; ringrazio tutti i colleghi del laboratorio.

Ringrazio inoltre il Dottor Sandro Orrù, della sezione di Genetica Medica del Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università di Cagliari che ha allestito le colture di fibroblasti, utilizzati per portare avanti questo lavoro.