

TDP-43 Proteinopatileri: Nörodejeneratif Konformasyon Bozukluğu Hastalıklarında Yeni Bir Oyuncu

TDP-43 Proteinopathies:

A New Player in Neurodegenerative Diseases with Defective Protein Folding

Suna Lahut*, Burçak Özeş*, Soykan Açar, A. Nazlı Başak
Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

*İlk iki yazar yazıya eşit katkıda bulunmuştur.

Özet

Hücredeki proteinlerin toplamına proteom, proteomun hücre içindeki stabil durumuna proteostaz denilir. Proteostazın korunması için, proteinlerin doğru konsantrasyonu, hatasız ekspresyonu, düzgün üç-boyutlu katlanması, translokasyonu ve gerekli durumlarda yıkımı sağlanmalıdır. Genetik ve çevresel faktörler sonucu proteinlerin yanlış katlanma ve agregasyona-yatkın bir konformasyona dönüşmesi, hücre stresini artırır. Birçok kanıt, hasarlı protein birikiminin, sadece hücre-içi süreçlerin verimliliği ve hassasiyetine doğrudan olumsuz etki yapmakla kalmadığını, düzeltilmedikleri takdirde, işlev bozukluğu şalesini tetikleyerek, proteinopatiler olarak adlandırılan bir dizi protein konformasyonu bozukluğu hastalığına neden olduğunu göstermektedir. Günümüzde özellikle yaşlı popülasyon oranları yüksek, gelişmiş toplumlarda tehdit eden, Alzheimer Hastalığı (AD), Parkinson Hastalığı (PD), Huntington Hastalığı (HD), Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS), kanser, diyabet vb. hastalıklar genelde protein katlanma bozukluğundan kaynaklanırlar. Bu yazıda, gerek güncelliği, gerekse birçok farklı hastalıkta etkin olması nedeniyle TDP-43 proteini, neden olduğu proteinopatilerin en iyi araştırılmış örnekleri olan ALS ve FTLD üzerinden incelenmiştir. (*Türk Nöroloji Dergisi 2012; 18:1-10*)

Anahtar Kelimeler: TDP-43, nörodejenerasyon, protein katlanması, agregasyon, ALS, FTLD, model sistemler

Summary

The proteome is the sum of all proteins inside a cell, and proteostasis (protein homeostasis) is the stable condition of the proteome. Proteostasis is essential for the cellular and organismal health. Stress, aging and the chronic expression of misfolded proteins challenge the proteostasis machinery and the vitality of the cell. There is increasing evidence that the accumulation of damaged proteins not only has direct consequences on the efficiency and fidelity of cellular processes but also, when not corrected, that they initiate a cascade of dysfunction, which in humans is associated with a plethora of diseases of protein conformation, referred to as proteinopathies. Alzheimer's Disease (AD), Parkinson's Disease (PD), Huntington's Disease (HD), Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), cancer and diabetes, whose frequencies have drastically increased in countries with aging populations, are all consequences of misfolded proteins. This paper focuses on TDP-43, which excelled as a key protein in neurodegenerative processes because of its association with different diseases, especially with ALS and Frontotemporal Lobar Dementia (FTLD), the two best studied examples of TDP-43 proteinopathies (*Turkish Journal of Neurology 2012; 18:1-10*)

Key Words: TDP-43, neurodegeneration, protein folding, aggregation, ALS, FTLD, model systems

Giriş

Proteom, Proteostaz ve Protein Katlanması

Bir hücrenin tüm proteinlerinin toplamına proteom denir. Proteomun işlevini hatasız bir şekilde yerine getirmesi, hücresel

süreçler için en temel şartlardan biridir ve canlı organizmaların oluşumları ve yaşamlarını sağlıklı bir şekilde sürdürmeleri için büyük önem taşır. Tüm hücrelerde, proteomun hatasız bir şekilde işlenmesinden, şaperon, transport molekülleri, ubikitin-temelli proteozom ve otofajik sistem gibi karmaşık yapıları barındıran moleküller bir ağ sorumludur (1-7).

Yazışma Adresi/ Address for Correspondence: Dr. Nazlı Başak, Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye
Tel.: +90 212 359 72 98 E-mail: basak@boun.edu.tr

Geliş Tarihi/Received: 27.01.2012 **Kabul Tarihi/Accepted:** 31.01.2012

Yeni bir terminoloji olan protein homeostazı ya da proteostaz, hücre içindeki proteinlerin (proteomun) birbirleri ile olan tüm moleküler ilişkilerinin düzenlenmesidir. Proteostaz için, proteinlerin doğru konsantrasyonu, hatasız ekspresyonu, düzgün üç-boyutlu katlanması, translokasyonu ve gerekli durumlarda yıkımı sağlanmalıdır. Hücre stresi ve yaşlanması, proteostazı ve sözü geçen karmaşık ağ yapısının dengesini olumsuz yönde etkiler ve belirli bir eşik değeri aşıldıktan sonra da özellikle nöron düzeyinde, hücre patolojisi ve hastalık riski ciddi şekilde artar (8-10) (Resim 1).

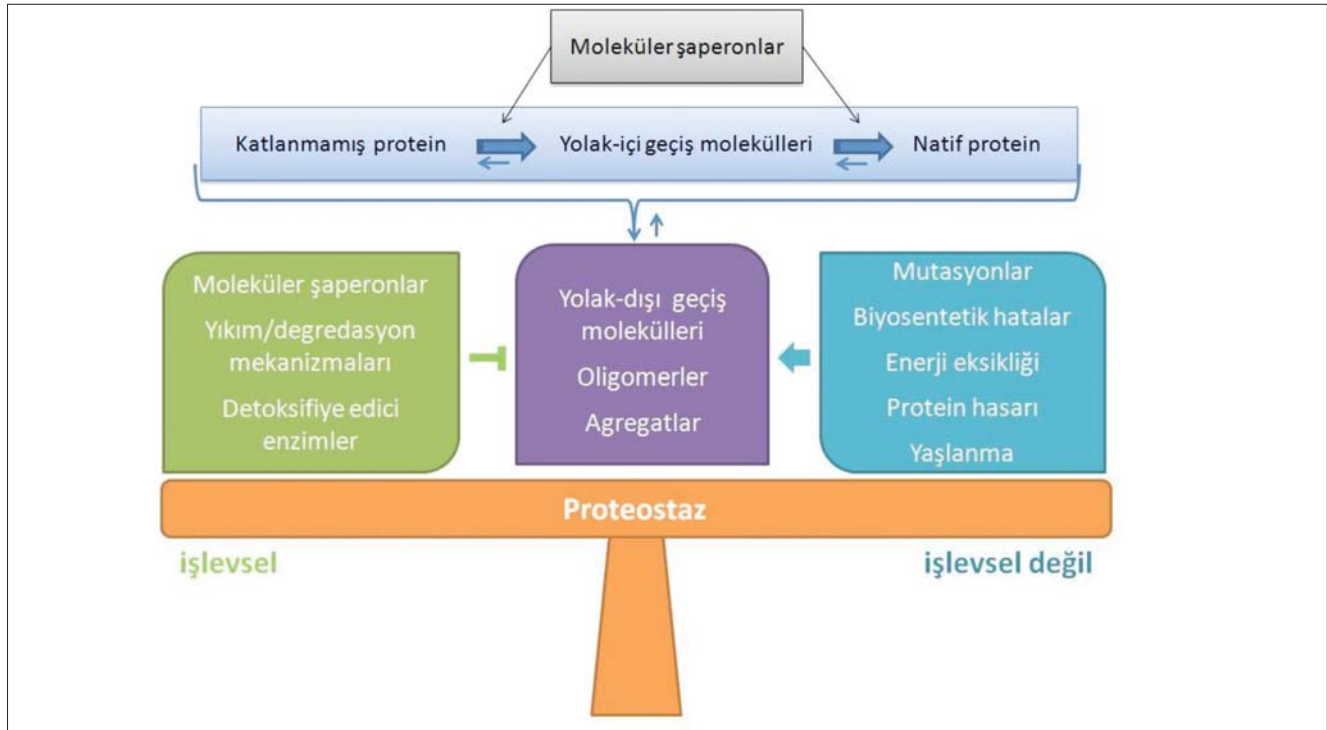
Proteinler, natif ya da doğal yapı diye adlandırılan yüksek çözünürlüklü işlevsel yapılarını kendilerine özgü, üç-boyutlu, fizyolojik katlanmalarıyla kazanırlar. Proteinin (polipeptid zincirinin) doğal yapısına katlanması birincil yapıdaki aminoasitlerin dizisine, moleküler şaperonların ve görevli protein ve enzimlerin işlevine bağlıdır. Her proteinin sınırlı bir katlanma kapasitesi vardır, hücresel kalite kontrol mekanizmalarından kurtulan yanlış katlanmış protein zincirleri kendi aralarında intermoleküler hidrojen bağları oluşturarak agregat olmaya çok yatkındır (1-3,5,12,13).

Proteinlerin fizyolojik yapısını kazanması gibi, proteinin yanlış katlanması da tüm canlı organizmaların yaşamlarının doğal bir parçasıdır. Ökaryotlarda sentezi tanımlanan tüm proteinlerin üçte birinin şaperon yardımına rağmen fizyolojik konformasyonlarını kazanamadıkları tahmin edilmektedir.

Bunun yanında yanlış protein katlanması genetik mutasyonlar ve bir dizi post-translasyonel modifikasyon (oksidasyon, glikasyon, nitrosilasyon gibi) sonucu da olabilir (3).

Proteinin doğru katlanması, sadece proteinin kendisi için değil, hücre ve tüm organizma için yaşamsal önem taşır. Protein katlanması için gerekli olan bilgi, temelde proteinlerin birincil yapısında, yani amino asit dizilerinde kodlanmakla birlikte, hücresel ortamın etkisi de son derece önemlidir; benzer proteinler farklı ortamlarda farklı şekillerde katlanabilirler. Hücre ortamı proteinin doğal yapısının stabilitesini kontrol ederek işlevselliğini korur. Bu yoğun hücresel ortamın yanısıra, bireye özgün çeşitlilikler, polimorfizmler, ve zaman içinde yaşlanma ile biriken bir dizi protein translasyonu sonrası modifikasyon da protein katlanmasını olumsuz yönde etkiler. Tüm bu faktörler, stabil olan natif protein yapısının yanlış katlanma ve agregasyona-yatkın metastabil bir konformasyona dönüşmesine neden olur ve hücre stresini artırır (14,15) (Resim2).

Protein katlanma süreci hem kooperatif, hem de kompleks olduğu için, konformasyonel geçişleri ve kısa-ömürlü ara molekülleri karakterize etmek son derece güçtür. Agregasyonun öncüleri ne birincil yapıdaki ne de fizyolojik olan üçüncül yapıdaki proteinlerdir. Amiloid oluşumundan, hiç katlanmamış birincil yapıdaki protein zinciri ile natif yapıya çok yakın olan üç-boyutlu yapı arasındaki, aracı



Resim 1. Proteostaz, hücre içindeki tüm proteinlerin fizyolojik düzeylerinin, doğru katlanmalarının, ikincil ilişkilerinin ve hücrenin farklı kısımlarındaki lokalizasyonlarının sağlanabilmesi, korunabilmesi ve doğru dengede tutulabilmesidir. Özellikle nöron seviyesinde birçok kompleks mekanizmayı içeren bu dengenin sağlanmasının, ilerleyen yaş ile birlikte, gittikçe zorlaştığı ve bir dizi hastalığa yol açtığı gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır (11).

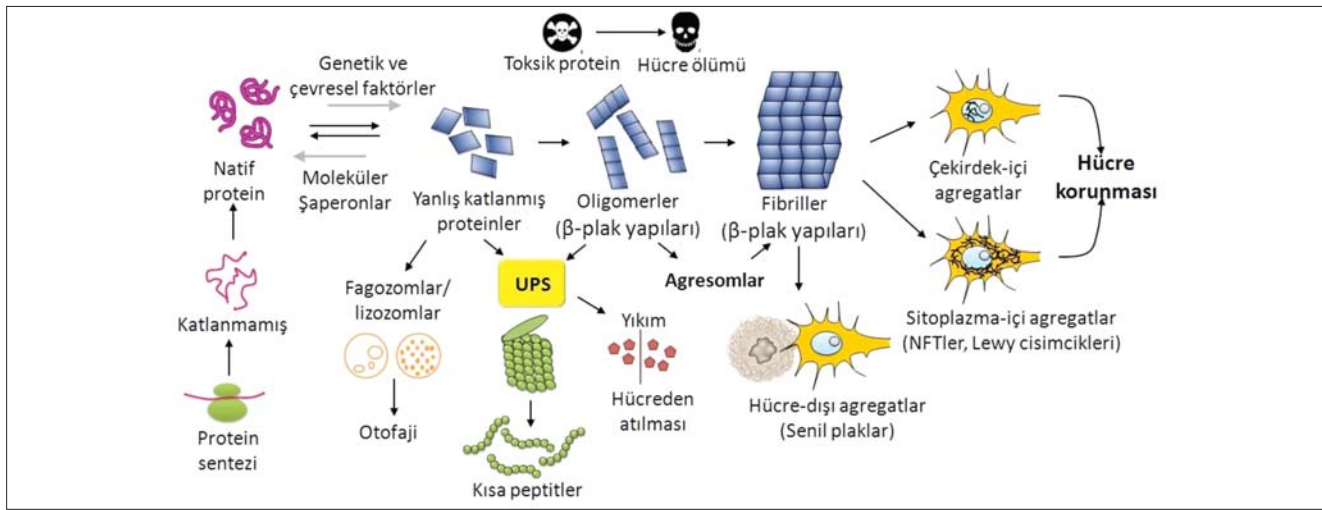
moleküller sorumludur, bunlar belirgin ikincil yapıları dolayısıyla agregasyona yatkındırlar (genellikle alfa heliksiden ziyade beta-plak). Amiloid fibrillerinin yapısı son derece stabil, degradasyona dayanıklı ve çözünürlükten uzaktır; bu yapılar düşük enerjileri dolayısıyla normal fizyolojik katlanma ile yarış halindedirler (Resim 3). Protein agregasyonunun en önemli nedenlerinden biri protein konformasyonunu değiştiren mutasyonlardır (4,16).

Proteom yapısının dinamik özelliğine karşın proteostaz çok kontrollüdür; hem hücrenin en ideal şartları oluşturabilmesi için özerk olarak (*cell autonomous*), hem de hücreler- ve dokular-arası özerkliği sağlamak açısından,

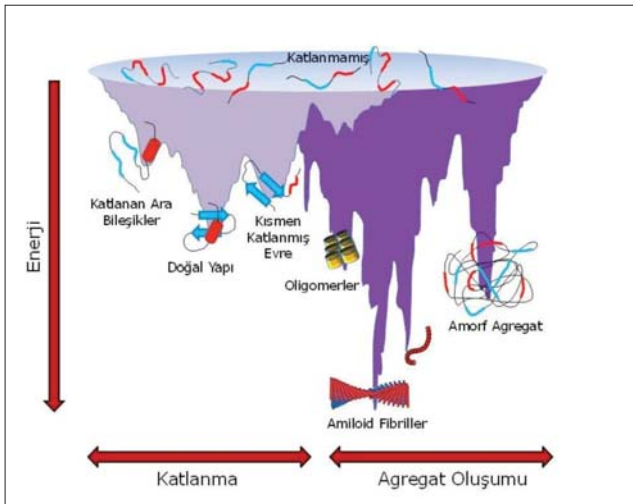
hücreden bağımsız olarak (*non-cell autonomous*) düzenlenir; bu işlevlerin hatasız işlemesi, hücrenin sağlığını ve organizmanın yaşam süresini belirler (18,19).

Protein konformasyon değişikliğinin neden olduğu stres, proteostaz ve hücre için önceden tahmin edilemeyen, son derece olumsuz bir etkidir ve hücrenin buna hazırlıklı olması gereklidir (Resim 4). Yaşlanma sürecinde ortaya çıkan, örneğin mutant ve zarar görmüş proteinlerin ekspresyonu sonucu oluşan ısı şoku, oksidanlar, metabolik ve kronik stres gittikçe biriken hücre hasarına neden olurlar (20,21).

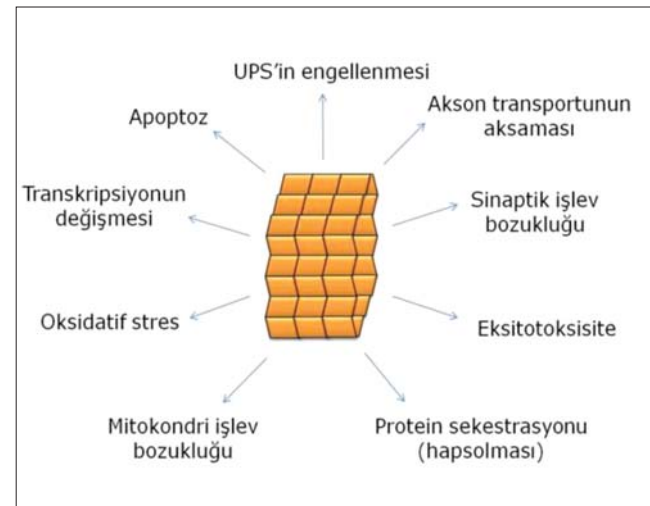
Mutant proteinlerin birikimi, sadece hücresel süreçlerin etkinliğini ve düzenli çalışmasını olumsuz olarak etkilemekle



Resim 2. Protein katlanması ve yanlış katlanmış proteinlerin oluşturduğu stres durumları UPS: Ubikülin Proteozom sistemi, NFT: Nörofibriler yumakları (15).



Resim 3. Protein katlanmasının ve agregasyonunun enerji haritası: eflatan kısım intramoleküler ilişkilerle desteklenen natif konformasyonları, mor kısım ise intermoleküler bağlantılardan oluşan agregasyon ve amiloid fibrilleri destekleyen konformasyonları göstermektedir. Her iki enerji düzeyi örtüşmektedir; agregasyonlar hem yeni zincirlerin oluşumundan, hem de natif konformasyonun destabilizasyonundan kaynaklanabilir ve normalde moleküler şaperonlar tarafından engellenir (17).



Resim 4. Protein konformasyon değişikliğinin neden olduğu toksik mekanizmalar (22).

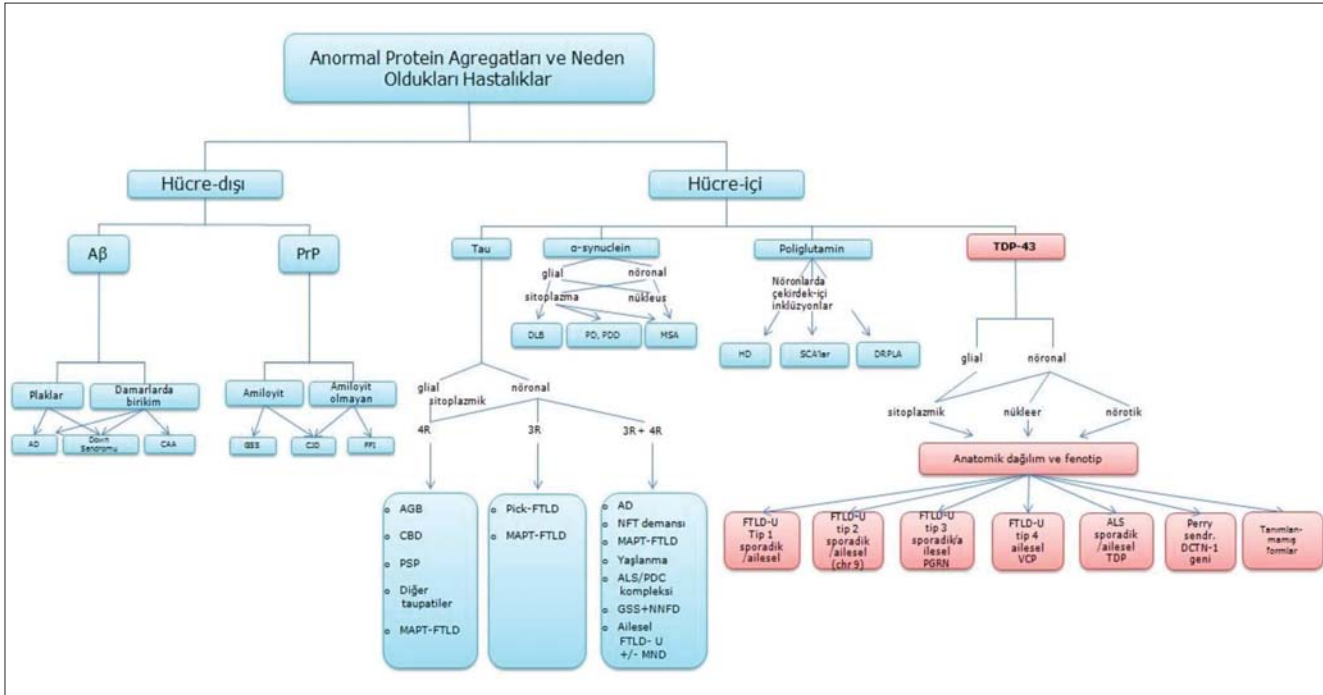
kalmaz, hücre tarafından tamir edilmedikleri sürece birbirini zincirleme takip eden bir dizi işlev bozukluğuna neden olurlar. Bunların sonucunda, günümüzde özellikle yaşlı popülasyon oranları yüksek olan gelişmiş toplumları ciddi bir şekilde tehdit eden, AD (23,24), PD (26), HD (27), ALS (28), kanser (29), diyabet (30) vb. protein katlanma bozukluğu hastalıkları (*foldopathies*) ortaya çıkar. Her ne kadar bu hastalıklar kendilerine özgü hücre ve dokuları etkileyerek özgün klinik fenotiplere yol açsalar da, hepsinin ortak noktası agregasyona yatkın proteinlerin varlığıdır (Resim 5). Bu yazının konusu, gerek güncelliği, gerekse birçok farklı hastalıkta etkin olması nedeniyle TDP-43 proteini ve son yıllarda, özellikle nörodejenerasyon araştırmalarının odak noktası olan TDP-43 proteinopatileri ile en iyi incelenmiş örnekleri olan ALS ve FTLD'dir (31).

TDP-43 Geni, Proteini ve Agregasyonu

TDP-43 [TAR (Transactive Response) DNA-Binding-Protein-43] ilk olarak HIV1 virüsünün TAR DNA-dizisine bağlanarak transkripsiyonunu baskılama özelliğine sahip bir protein olarak tanımlandı. Daha sonra, kistik fibrozis'de alternatif kırılma işlemi düzenleyen bir faktör olduğu görüldü. Tüm dokularda yüksek miktarda sentezlenen 414 aminoasit uzunluğundaki TDP-43 proteini, omurgasızlardan memelilere kadar bütün canlılarda evrimsel olarak çok iyi korunmuştur. Sağlıklı hücredeki lokalizasyonu çekirdekte olan TDP-43, DNA/RNA bağlayıcı, heterojen ribonükleer protein (hnRNP) A/B ailesine ait bir proteindir ve bir dizi farklı görevi vardır (3,32-34).

TDP-43'ün işlevsel bölgeleri, nükleer lokalizasyon ve nükleer eksport sinyalleri, nükleik asitlere bağlandığı iki RNA tanıyıcı motifi, ve glisin amino asitince zengin ve protein-protein ilişkilerinden sorumlu karboksil (C-) terminalidir (Resim 6). C-terminal bölgesi hem diğer hnRNP proteinleri ile olan ilişkiler için, hem de alternatif kırılmanın ve transkripsiyonel baskılamanın kontrolü için gereklidir. mRNA'ya ve DNA'ya bağlanabilen TDP-43, RNA metabolizmasının farklı aşamalarını (mRNA kırılması, stabilitesi, translasyonu ve gen transkripsiyonunu) çekirdek ile sitoplazma arasında mekik dokuyarak (NLS ve NES sayesinde) düzenler. C-terminal bölgesi TDP-43 agregasyonu için kritiktir; normal şartlarda çekirdekte bulunan protein, patolojik durumda inklüzyonlar halinde sitoplazmada ve distrofik nöronların uzantılarında (nöritlerde) agregat olur, buna karşılık TDP-43 inklüzyonları hücre çekirdeğinde oldukça nadirdir. TDP-43'ün hücre çekirdeğinden eksilmesi, sitoplazma ve nöritlerdeki inklüzyonların neden olduğu toksik işlev kazanma mekanizmasına ek olarak, bir işlev kaybı türü mekanizmanın varlığına da işaret etmektedir (3,13,20).

TDP-43'de tanımlanmış olan, biri hariç tüm mutasyonların C-terminalinde bulunması, bu bölgedeki yapı ve işlev değişikliğinin -henüz bilinmeyen bir mekanizmayla- nörodejenerasyonu tetiklediğini düşündürmektedir. Hastalık durumunda sadece karboksil terminalini içeren, farklı uzunluklarda fragmentlere parçalanan ve fosforile olan TDP-43 proteini bu haliyle agregasyona çok yatkındır. Tipik fibriler oluşumlar göstermeyen ve kongofilik boyalarla

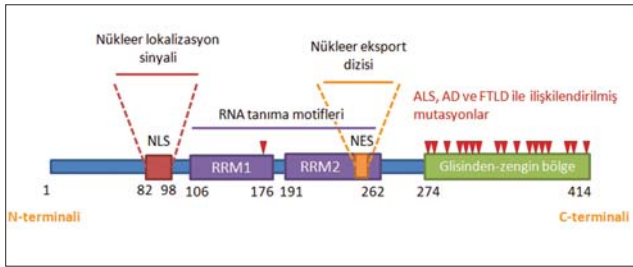


Resim 5. Anormal Protein agregatları, hücre-dışı ve hücre-içi olmak üzere iki büyük gruba ayrılırlar (15).

boyanmayan TDP-43 agregatlarının yapıları, bilinen amiloid özelliklerini taşımaz, dolayısıyla özgün TDP-43 patolojisi adı altında anılırlar (13,35).

TDP-43 ve Nörodejenerasyon

TDP-43 ilk olarak sadece ALS ve birkaç FTLD olgusuyla ilişkilendirilmiş olmakla birlikte (FTLD-TDP), çok kısa zamanda TDP-43 patolojisinin AD, PD, Difüz Lewy Cisimcikli Hastalık gibi bir dizi nörodejeneratif hastalıkta da etkin olduğu anlaşılmış, hatta son zamanlarda benzer patolojinin 65 yaş üzerindeki sağlıklı popülasyonun yaklaşık %30'unda da mevcut olduğu görülmüştür (36). Tüm bu olgularda, TDP-43 içeren



Resim 6. 43 kDa büyüklüğündeki TDP-43 proteinini kodlayan 1. kromozomdaki TARDBP geni. TDP-43'ün, bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), iki RNA tanıma motifi, bir nükleer eksport dizisi (NES) ve C-terminal bölgesi vardır. Nörodejenerasyona neden olan mutasyonların büyük çoğunluğunu içeren C-terminal bölgesi, hem TDP-43'ün diğer proteinlerle olan ilişkilerinden sorumludur, hem de alternatif kırılma ve transkripsiyonel baskılama için gereklidir, dolayısıyla bu bölgedeki mutasyonlar protein işlevini olumsuz etkiler (3,13).

nöronal ve glial sitoplazmik inklüzyonlar, distrofik nöritler ve çok nadir durumlarda intra-nükleer inklüzyon içeren tipik histolojik özellikler mevcuttur, diğer taraftan TDP-43 patolojisinin dağılımı hepsinde farklıdır. ALS ve FTLD-TDP olgularında, neokorteks de dahil, beyin çok geniş bölgeleri etkilenirken, TDP-43 agregasyonu diğer nörodejeneratif hastalıklarda ve sağlıklı yaşlı bireylerde genellikle limbik sisteme kısıtlıdır. Bu bulgular TDP-43 patolojisinin varlığı ya da yokluğunun her zaman bir hastalık göstergesi olmadığını, buna karşılık anormal TDP-43 dağılımının farklı hastalıklara özgün olabileceğine işaret etmektedir. Anormal TDP-43 boyanması, fizyolojik yapıları bozuk olan proteinlerin sitoplazmada agregasyonlar oluşturduğu iki kas hastalığında, inklüzyon cisimcikli miyopatiler ve miyofibriler miyopatiler'de de görülmektedir. Miyofibriler miyopatiler, sitoplazmadaki miyofibriler sistem proteinlerinin mutasyon sonucu üç boyutlu yapılarını kaybederek çökmeleri ile ortaya çıkan hastalıklardır (37,38). Bu olgularda TDP-43 patolojisinin gözlenmesi, sitosoldeki anormal protein agregatlarının yarattığı strese, TDP-43'ün çekirdekte sitoplazmaya geçip agregat oluşumuyla verdiği tepki olarak açıklanabilir. Hücre-içi TDP-43 patolojisi pek çok nörodejeneratif hastalıkta gözlenmesine, yani tek bir hastalığa özgü olmamasına rağmen, TDP-43 mutasyonları yalnızca ALS ve nadiren de FTLD'ye neden olur, diğer hastalıklarda bugüne kadar tanımlanmamıştır. Bu sonuç, TDP-

Tablo 1. Nörodejeneratif hastalıklarda TDP-43 patolojisinin hücre-içi yerleşimi, fizyolojik dağılımı ve görülme sıklığı (13)

Nörodejeneratif hastalık	Hücre-içi	Fizyolojik yerleşimi	Görülme sıklığı (96)
Amiyotrofik lateral skleroz	NCI ve GCI» Nil, DN, nükleustayok	Yaygın: spinal motor nöronlar, frontal ve temporalneokorteks, basal ganglia, limbik yapılar	~100 ^c
Frontotemporal demans- TDP	NCI ve GCI» Nil, DN, nükleusta yok ^b	Yaygın: frontal ve temporal neokorteks, basal ganglia, limbik yapılar	100e
Alzheimer	NCI ve GCI» Nil, DN, nükleusta yok	Çoğunlukla limbik: amigdala, entorhinal, hipokampus, dentat, aingulat, insula	33-57
Parkinson	NCI ve GCI, DN, nükleusta yok	Çoğunlukla limbik	19
Lewy cisimcikli demans	NCI ve GCI» Nil, DN, nükleusta yok	Çoğunlukla limbik	45
Kortikobazal dejenerasyon	NCI ve GCI» Nil, DN, nükleusta yok	Değişken: çoğunlukla limbik, bazen yaygın	0-33
Progresif supranükleer palsi	NCI ve GCI» Nil, DN, nükleusta yok	Çoğunlukla limbik	0-26
Demans-Parkinsonizm,- ALSGuam kompleksi	NCI ve GCI» Nil, DN, nükleusta yok	Yaygın: frontal ve temporal neokorteks, basal ganglia, limbik yapılar, spinal motor nöronlar	100
Huntington	NCI, DN	Aşağı neokortikal katmanlar, bazalganglia	100

^aSODI mutasyonu takmayan adasal va (um «por»dak ALS hastalarında ger lAır.

^b farklı FTO-TOP formlarında farklı (distinct) aK-t«>1«r goruleMr.

^c UtexkiCn nkluzyonları i; er an tum FTD tçileri dahi adıkıtgmd, T0P-43 patoVojm %80-04 çerukr.

NCI. rMronal ntoplarmk infcbzyonlar; GCI, 9la' srtopl arrrk nkluzyonlar ; Nil, nsronal ır*ern.kleer mkluzyonlar; ON, distrofik ojitler.

43 işlev kaybı ile ALS/FTLD arasındaki özgün ilişkiyi desteklemekle birlikte, bu bağlantının mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (39).

İnsanda TDP-43 patolojisi çalışmaları üç farklı sonuç halinde özetlenebilir: (i) TDP-43 proteininin normalde lokalize olduğu çekirdekten çıkarak sitoplazmada agregat oluşturması, bugüne kadar bilinen TDP-43 hastalıklarında ortak ve tutarlı bir patolojidir, (ii) TDP-43 patolojisinin hücre-içi dağılımı farklı nörodejeneratif hastalıklarda değişkenlik göstermektedir, (iii) TDP-43 patolojisi ALS veya FTLD'ye özgü değildir; pek çok nörodejeneratif hastalıkta ve 65 yaş üstü sağlıklı bireylerde sıklıkla görülmektedir. Hücre-içi TDP-43 agregasyonunun, tüm nörolojik hastalıklarda görülmesi, bu patolojinin ALS/FTLD dışı olgularda da önemli olduğunu ve hatta bu hastalıklarda da TDP-43 agregasyonu ya da işlevini hedef alan tedavi yöntemlerinin faydalı olabileceğini düşündürmektedir (10,13,36,40) (Tablo 1).

TDP-43 ve ALS/FTLD İlişkisi

ALS hastalarında sıklıkla frontal lob bozukluğu /degenerasyonu görülmesi, ALS ve FTLD'nin benzer, hatta ortak bir patofizyolojiye sahip olduklarını uzun zamandan beri düşündürmekteydi (41), 1990'lı yıllardan başlayarak, otopsi yapılan ALS hastalarının motor nöronlarında sıklıkla ub-pozitif inklüzyonlara rastlanmakla birlikte, bu inklüzyonların yapıları ve içerdikleri protein türlerine 15 yıl boyunca fazla değer biçilmedi. Ancak 2006 yılında ALS ve FTLD'de görülen çözümlürlüğü düşük, ve ub-pozitif, alfa-sinüklein ve tau-negatif inklüzyonların ana maddesinin TDP-43 olduğu anlaşıldı (40). ALS ve FTLD olgularında TDP-43 pozitif agregatlar, hem sporadik hastaların çoğunluğunda, hem de TDP-43, VCP (*Valosin containing protein*) ve progranulin-temelli ailesel ALS vakalarında görülmekteydi (42).

Patolojik TDP-43, hiperfosforile ve ubiquitin ile işaretli idi, yıkıma uğradığında proteinin sadece C-terminal fragmentlerini içeriyordu ve merkezi sinir sisteminin hastalıktan etkilenen, hipokampus, neokorteks ve omurilik bölgelerinde görülüyordu. Kısa zamanda TDP-43'deki dominant geçişli nokta mutasyonlarının ALS'ye ve nadiren de FTLD'ye neden oldukları ve değişen TDP-43 işlevinin nörodejenerasyonu doğrudan tetiklediği gösterildi (43-48). Bu, o güne kadar SOD1'in mutlak hakimiyetindeki ALS araştırmalarını (18,49-51) altüst eden önemli bulgu, protein agregasyonunu, diğer bir dizi nörodejeneratif hastalıkta olduğu gibi, ALS araştırmalarının en önemli konularından biri haline getirdi. TDP-43 ve bir yıl sonra tanımlanan FUS (52,53), SOD1'in antioksidan enzimatik aktivitesinden çok farklı olarak, RNA biyolojisinde etkin olan çekirdek proteinleridir ve etki mekanizmalarının anlaşılması yolunda bir dizi soruyu gündeme getirirler: ALS RNA-temelli bir hastalık mıdır? Inklüzyonların önemi nedir? Bu inklüzyonlar primer nörotoksisite nedeni mi, yoksa sadece yan ürün, yoksa

da hücrenin anormal duruma koruyucu yanıtı mıdır? TDP-43 proteinopatileri yaşamsal işlevlerin kaybı ile mi, yeni bir toksik işlev kazancı türü bir mekanizma ile mi etki etmektedir? Son 5 yıldaki çok hızlı gelişmelere rağmen bu sorular henüz tam olarak yanıtlanamamıştır, yoğun araştırmalar devam etmektedir (54,55).

Sitoplazmik TDP-43 Agregatları: Inklüzyon Yapıları mı, RNA Granülleri mi?

Sitoplazmadaki TDP-43 agregatları ile ilgili ilk çalışmalarda, bu agregatların hücre tarafından gerektiği şekilde yıkılamayan inklüzyonları temsil ettiği düşünülüyse de, RNA bağlayıcı proteinler ile çalışan araştırmacılar, çekirdekten sitoplazmaya taşınmanın ve sitoplazmadaki RNA granülleri (*stress granules/processing bodies*) ile birleşmenin, bu proteinlerin ortak özellikleri olduğunu gözlemledi. Birçok hücre hattında, TDP-43'ün oksidatif stres, proteozom inhibisyonu, ısı şoku veya ozmotik strese bağlı oluşan sitoplazmik stres granülleri ile birleştiği gösterildi. Stres granülleri, yukarıda belirtilen hücresel stres durumlarında translasyonel baskılanmada görev alan çok sayıda mRNA ve RNA bağlayıcı proteinleri içeren, dinamik sitoplazmik yapılardır. TDP-43'ün varlığı da, yokluğu da stres granülü oluşumunu etkilemez, dolayısıyla bu yapıların oluşumu TDP-43'ün temel işlevlerinden biri değildir. Bunlara karşın, sitoplazmik TDP-43 agregatlarının aslında işlevsel ribonükleoprotein kompleksleri olduğu düşünülmektedir. Bu durum, TDP-43 agregatlarının proteotoksik stres altında, neden birçok nörodejeneratif hastalıkta görüldüğünü açıklayabilir. Stres altında, TDP-43'ün sitoplazmik RNA granülleri ile birleşmesi normal bir eğilim olabilir. Bu bulguları takiben yapılan araştırmalarda benzer sonuçlar elde edilemediğinden, bu durumu netleştirecek çalışmalar yapılmaktadır (56-62).

Nörondaki sitoplazmik RNA granüllerinin kendilerine özgü özellikleri olduğu da dikkate alınmalıdır (63). Diğer hücrelerin aksine, nöronlarda TDP-43, stres granüllerinde değil, P-cisimciklerinde (*processing bodies*) lokalizedir. İçerdikleri proteinler ve RNAlar açısından stres granülleri ile kısmen örtüşen P-cisimciklerinin, RNA yıkımında görev aldıkları düşünülmektedir (64). Dolayısıyla, TDP-43'ün hangi sitoplazmik RNA granülüne bağlanacağı hücre tipine ve ortama göre değişir.

TDP-43 ve Model Sistemler

Bugüne kadar yapılan modeller sadece mutant TDP-43'ün değil, yabancıl proteinin de yüksek miktarlarda sentezinin solucan, sıçan, fare, zebra balığı, sinek gibi pek çok hayvan modelinde doza bağlı olarak nörotoksisiteye neden olduğunu göstermiştir. TDP-43 inklüzyonlarının, toksik etki için gerekli olmadığı, aksine, RNA bağlayıcı motifin (RRM1) varlığının, TDP-43'ün aşırı ekspresyonu sonucu oluşan toksisite için gerekli olduğu görülmüştür (21,65-67).

Drosophila modelindeki son çalışmalar nörotoksitenin, RNA bağlama kapasitesinden ve/veya TDP-43'ün hücre içindeki yanlış konumundan kaynaklandığına işaret etmektedir. TDP-43'den yoksun homozigot fare ve sinekler (*knockdown*), embriyonal evrede öldükleri için, proteinin işlevini anlama çabaları bu modellerde sonuç vermemiştir. TDP-43 işlevi ile ilgili bugüne kadar elde edilen bilgilerin çoğu hücre kültürü modellerinden kaynaklanmaktadır (68-73).

TDP-43'ün aşırı üretimi, hayvan modellerinde olduğu gibi mayada da toksik etki yapar. Maya modelinde, SCA2 ile ilişkilendirilmiş ataksin-2 proteininin ortologu olan Pbp1'in, TDP-43 aşırı üretimine bağlı toksisiteyi düzenlediğinin görülmesi üzerine ALS hastalarında yapılan çalışmalar, ataksin-2'nin ALS oluşumu için bugüne kadar bulunmuş en önemli risk faktörü olduğunu göstermiştir. Ataksin-2 ve TDP-43'ün etkileşim mekanizması henüz netlik kazanmamıştır (74-81).

Memeli kültür hücrelerinde veya primer nöronlarda yapılan çalışmaların çoğunda, aşırı üretilen TDP-43 proteininin natif halde çekirdekte kaldığı gösterilmiştir. Bu durum, TDP-43'ün aşırı üretiminin, hücre işlevini bozmak için sadece agregasyon ya da inklüzyon mekanizmalarına bağlı olmadığını gösterir. Son bulgulara göre fazla sentezlenen eksojen TDP-43, endojen TDP-43 mRNA'larının 3'UTR bölgelerine bağlanarak bunları yıkıma uğratar (otoregülasyon döngüsü). TDP-43 bağlanma bölgeleri birçok mRNA'da bulunduğu için TDP-43'ün aşırı üretimi, çok sayıda hedef RNA'nın kırılmasını ve stabilitesini doğrudan değiştirir. Böylece, memeli hücrelerindeki aşırı TDP-43 üretimi, sitozol ve proteotoksik stres altında oluşan TDP-43 agregatları veya hedef mRNA'ların kırılmasında ve stabilitesindeki değişimler tarafından tetiklenebilir. Bu olasılıklardan hangisinin daha birincil önemi olduğu ve hastalıkla ilişkileri yoğun araştırma konusudur (82-90).

Sonsöz

Nöronal dejenerasyon ve reaktif gliyoz yanında yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonu birçok nörodejeneratif hastalığın ortak noktasıdır. TDP-43-temelli ALS ve FTLD araştırmaları son beş yılda çok hızlı ilerlemeler göstermesine rağmen, TDP-43 proteinopatilerinin patolojisi hala birçok bilinmezler içermektedir. Nörodejeneratif hastalıkların çoğunluğunda, mutasyonlar sonucu ve/veya posttranslasyonel süreçlerde çözünürlüğü azalan ve agregasyon oluşturan moleküllerin yeni bir toksik işlev kazandığı düşünülmektedir (*GOF: gain of function*). Bu da yaşlanmış hücrenin detoksifikasyon ve agregatı yıkma kapasitesini zorlamaktadır. SMA ve FA gibi nörodejeneratif hastalıklarda ise farklı bir mekanizma etkindir, hastalık yaşamsal önemi olan bir proteinin işlevini kaybetmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (*LOF: loss of function*). Bu mekanizmaların hangisinin TDP-43 (ve FUS) için geçerli olduğu henüz bilinmemektedir. Belki ikisi de geçerlidir ve her iki mekanizma birbiri ile etkileşmektedir. Bu etkileşim esnasında RNA işlenmesinde önemli olan bazı proteinlerin de TDP-43

agregatları tarafından hapsedilerek, RNA metabolizmasında ek hasarlara yol açtıkları düşünülebilir. Ya da RNA metabolizmasındaki TDP-43 kaynaklı bozuklukların, posttranslasyonel modifikasyon, protein sentezi ve yıkımını düzenleyen kilit moleküllerin ekspresyon düzeylerini değiştirerek, TDP-43 agregasyonuna olumsuz katkılarda bulunması da mümkündür.

TDP-43 patogenezi anlamak için, TDP-43 agregasyonunu ve inklüzyon cisimciği oluşumunu düzenleyen önemli mekanizmaları aydınlatmak, olası birlikte çöken proteinleri tanımlamak ve patolojik mutasyonların etki mekanizmalarını çözmek gerekmektedir. Mevcut ve gelecekte planlanan hücre ve hayvan modellerinin kapsamlı analizleri hastalık sürecinde etkin olan hedef RNA'ları ve genelde RNA metabolizmasını anlamak açısından büyük önem taşımaktadır. Hedef genlerin sayısı hızla artmakla birlikte, bugüne kadar, pleiotropik TDP-43'ün RNA metabolizmasındaki kesin rolünün ne olduğuna ışık tutacak moleküller bulunmamıştır. TDP-43'ün, hücre-içi kompartmanlar, hücre türleri ve hastalık evresine göre değişiklik gösteren büyük hnRNP kompleksleri çerçevesinde görev yapması da olasıdır. Ancak bu kompleks katmanların çözülmesiyle TDP-43 proteinopatilerinin patojenik etki mekanizmaları anlaşılacaktır.

ALS'yi örnek alacak olursak: Son yıllarda birçok araştırmacı ALS'nin tek tip bir hastalık olmadığını, örtüşmeyen bir dizi mekanizmanın neden olduğu hastalıklardan oluşan bir spektrum olduğunu dile getirmektedir. Bu durumda yukarıda bahsedilen proteostaz temelli terapi yaklaşımları her ALS tipi için farklı olacaktır, bu da çok güçtür. Belki de tüm ALS türleri –ailesel ve sporadik-RNA-temelli ortak bir etiyolojiye sahiptir. Bu durumda ALS için sadece proteostaza dayalı tedavi yaklaşımları (örneğin ilgili proteinin natif formunu stabilize etmek ve katlanma bozukluğunu tetikleyen kovalent bağları engellemek gibi) geliştirmek yeterli olmayabilir. Buna ilaveten RNA biyolojisi yollarını hedef alan farklı tedaviler gerekebilir. Eğer ALS'nin tüm formları RNA kalite kontrol yollarındaki hatalardan kaynaklanıyorsa, proteostazdan ziyade RNAsis türü daha da yeni kavramların ve mekanizmaların devreye girmesi ve araştırılması kaçınılmazdır (54).

Teşekkür

Suna ve İnan Kıraç Vakfı'na ve Boğaziçi Üniversitesi Araştırma Fonuna destekleri için, Ece Kartal'a yazıya katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Sözlük

Amiloid fibril: Çapraz β yapısı ve bir takım özgül özellikleri olan protein agregasyonları

Beta(β)-plakları: İkincil yapıları beta plili yapraklardan oluşan hücre-dışı protein agregatları

İnklüzyon cisimcikleri: Hücre-içi protein agregatları

İşlevsel amiloid: Canlı sistemler için yararlı işlevleri olan amiloid yapısı

Oligomer: Sınırlı sayıda monomer içeren bir polimer

P-cisimcikleri (Processing bodies): Sitoplasmik RNA depolama veyıkımı molekülleri

Pleiotropik: tek bir alelin, bir organizmanın fenotipinin daha önceden bağlantılı oldukları bilinmeyen farklı yönlerini değiştirme özelliği.

Polipeptit: Amino asitlerden oluşan kısa protein zincirleri (Genelde 100 amino asitten kısa olduğu durumlarda kullanılır.)

Protein birikimi hastalıkları: Hücre içi ve hücre dışı protein birikimlerinin yol açtığı patolojik durumlar

Protein yanlış katlanması: Proteinin natif/doğal yapısından farklı bir yapıya dönüşmesi

Proteinopati: Hatalı katlanan proteinlerin etkisiyle ortaya çıkan hastalıklara verilen genel isim

Proteom: Bir hücredeki proteinlerin tümü

Proteostaz: Protein ve homeostaz kelimelerinden üretilen proteostaz kavramı, hücre içinde proteinlerin üretim, katlanma, taşınma ve yıkım aşamalarını düzenleyen tüm biyolojik yolları ifade eder.

Protofibriller: Belirgin beta-plak yapıları olan izole ya da toplu halde görülen toksik olduğu düşünülen protein agregatları

Stres granülleri: Sitoplazmik RNA depolama molekülleri

Şaperon: Proteinlerin üç boyutlu hâle gelmesi işleminde görev alan yardımcı proteinler

Ubikitin Proteozom Sistemi (UPS): Ubikitin olarak adlandırılan proteinin bağlanması ile başlayan proteozomal yıkım sisteminin genel adı

Kısaltmalar

3'UTR: 3' Çevrilmeyen Bölge

AD: Alzheimer Hastalığı

ALS: Amiyotrofik Lateral Skleroz

DN: Distrofik nöritler

DNA: Deoksiribonükleik asit

FTLD: Frontotemporal Lobar Demans

FUS: (Fused in Sarcoma)

GCI: Gliyal sitoplazmik inklüzyonlar

GOF: İşlev kazanma

HD: Huntington Hastalığı

hnRNP: Heterojen ribonükleoprotein

LOF: İşlev kaybı

mRNA: Mesajcı RNA

N: Asparajin

NCI: Nöronal sitoplazmik inklüzyonlar

NES: Nükleer eksport sinyali

NII: Nöronal internükleer inklüzyonlar

NLS: Nükleer lokalizasyon sinyali

PD: Parkinson Hastalığı

Q: Glutamin

RNA: Ribonükleik asit

RRM: RNA tanıma motifi

SCA: Spinoserebellar Ataksi

SOD: Süperoksit dismutaz

TDP-43: TAR DNA-bağlanma proteini 43

Ub: Ubikitin

UPS: Ubikitin Proteozom Sistemi

VCP: Valozin içeren protein

Kaynaklar

1. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 2006;75:333-66.
2. Soto C, Estrada LD. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol* 2008;65:184-9.
3. Cohen TJ, Lee VM, Trojanowski JQ. TDP-43 functions and pathogenic mechanisms implicated in TDP-43 proteinopathies. *Trends Mol Med* 2011;17:659-67.
4. Vendruscolo M, Knowles TPJ, Dobson CM. In: Morimoto R, Selkoe D, Kelly J (eds). *Protein Homeostasis*. 1 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011:1-12.
5. Ovadi J, Orosz F. *Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases (Focus on structural biology 7)*. EDITION. BASIM YERİ: Springer pres, 2008.
6. Smith HJ, Simons C, Sewell RDE. *Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutic Strategies (Enzyme Inhibitor Series)*. 1st ed. Florida: CRC Press, 2008.
7. Naem A, Fazili NA. Defective protein folding and aggregation as the basis of neurodegenerative diseases: the darker aspect of proteins. *Cell Biochem Biophys* 2011;61:237-50.
8. Pierre S, Vernace V, Wang Z, Figueiredo-Pereira ME. Assembly of Protein Aggregates in Neurodegeneration: Mechanisms Linking the Ubiquitin/Proteasome Pathway and Chaperones. *Springer Press* 2007;67-79.
9. Tai HC, Schuman EM. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:826-38.
10. Calamini B, Silva MC, Madoux F, Hutt DM, Khanna S, Chalfant MA, et al. Small-molecule proteostasis regulators for protein conformational diseases. *Nat Chem Biol* 2011;8:185-96.
11. Gidalevitz T, Prahlad V, Morimoto RI. The Stress of Protein Misfolding: From Single Cells to Multicellular Organisms. In: Morimoto R, Selkoe D, Kelly J (eds). *Protein Homeostasis*. 1st ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011:87.
12. Wong ESP, Tan JMM, Lim K. Dynamic Role of Ubiquitination in the Management of Misfolded Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases. *Springer Pres* 2009:77-95.
13. Baloh RH. TDP-43: the relationship between protein aggregation and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *FEBS J* 2011;278:3539-49.
14. Luheshi LM, Crowther DC, Dobson CM. Protein misfolding and disease: from the test tube to the organism. *Curr Opin Chem Biol* 2008;12:25-31.
15. Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm* 2009;116:1111-62.
16. Treusch S, Cyr DM, Lindquist S. Amyloid deposits: protection against toxic protein species? *Cell Cycle* 2009;8:1668-74.
17. Vabulas RM, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Protein Folding in the Cytoplasm and the Heat Shock Response. *Morimoto R, Selkoe D, Kelly J. Protein Homeostasis*. 1st ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011: 104.
18. Lobsiger CS, Cleveland DW. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci* 2007;10:1355-60.
19. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 2009;187:761-72.
20. Buratti E, Baralle FE. The molecular links between TDP-43 dysfunction and neurodegeneration. *Adv Genet* 2009;66:1-34.
21. Silva MC, Fox S, Beam M, Thakkar H, Amaral MD, Morimoto RI. A genetic screening strategy identifies novel regulators of the proteostasis network. *PLoS Genet* 2011;7:e1002438.
22. Forman MS, Trojansowski JQ, Lee VM. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for the therapeutic breakthroughs. *Nature* 2004;410:1055-63.
23. Yokeş MB, Başak AN. Alzheimer Hastalığının Moleküler Biyolojisi. *TJN* 2005;11-2:201-22.
24. Taner NE. Alzheimer Hastalığının Genetiği: Son 20 Yılda Öğrenilen Dersler. *TJN* 2010;16-1:1-11.
25. Yüksel G, Karlıkkaya G, Tireli H. İdiyopatik Parkinson Hastalığında Transkraniyal Manyetik Stimülasyon. *TJN* 2006;12-2:106-11.
26. Ozansoy M, Başak AN. Parkinson Hastalığının Genetiği ve Nörodejenerasyonun Moleküler Biyolojisi, Parkinson Hast. Hareket Boz Der 2004;7-2:109-20.
27. Ersoy N, Başak AN. Huntington Hastalığı'nın Moleküler Biyolojisi. *TJN* 2005;11-1:27-44.
28. Şener HÖ, Parman Y, Şengün İ, Koç F, Ofllazer P. Amiyotrofik Lateral Sklerozda Kök Hücre Uygulamaları. *TJN* 2009;15-3:105-08.

29. Ali AB, Nin DS, Tam J, Khan M. Role of chaperone mediated autophagy (CMA) in the degradation of misfolded N-CoR protein in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *PLoS One* 2011;6:e25268.
30. Thomas SE, Dalton L, Malzer E, Marciniak SJ. Unravelling the story of protein misfolding in diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2011;2:114-8.
31. Geser F, Martinez-Lage M, Kwong LK, Lee VM, Trojanowski JQ. Amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia and beyond: the TDP-43 diseases. *J Neurol* 2009;256:1205-14.
32. Ou SH, Wu F, Harrich D, Garcia-Martinez LF, Gaynor RB. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol* 1995;69:3584-96.
33. Buratti E, Dork T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, Baralle FE. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J* 2001;20:1774-84.
34. He Y, Smith R. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1239-56.
35. Kwong LK, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM. TDP-43 proteinopathies: neurodegenerative protein misfolding diseases without amyloidosis. *Neurosignals* 2008;16:41-51.
36. Geser F, Robinson JL, Malunda JA, Xie SX, Clark CM, Kwong LK, et al. Pathological 43-kDa transactivation response DNA-binding protein in older adults with and without severe mental illness. *Arch Neurol* 2010;67:1238-50.
37. Wehl CC, Temiz P, Miller SE, Watts G, Smith C, Forman M, et al. TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:1186-9.
38. Olive M, Janue A, Moreno D, Gamez J, Torrejon-Escribano B, Ferrer I. TAR DNA-Binding protein 43 accumulation in protein aggregate myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:262-73.
39. Neumann M. Molecular neuropathology of TDP-43 proteinopathies. *Int J Mol Sci* 2009;10:232-46.
40. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314:130-3.
41. Fecto F, Siddique T. Making connections: pathology and genetics link amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobe dementia. *J Mol Neurosci* 2011;45:663-75.
42. Ritson GP, Custer SK, Freibaum BD, Guinto JB, Geffel D, Moore J, et al. TDP-43 mediates degeneration in a novel *Drosophila* model of disease caused by mutations in VCP/p97. *J Neurosci* 2010;30:7729-39.
43. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008;319:1668-72.
44. Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch NA, Xu YE, et al. Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet* 2008;4:e1000193.
45. Daoud H, Valdmans PN, Kabashi E, Dion P, Dupre N, Camu W, et al. Contribution of TARDBP mutations to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Genet* 2009;46:112-4.
46. Borroni B, Bonvicini C, Alberici A, Buratti E, Agosti C, Archetti S, et al. Mutation within TARDBP leads to frontotemporal dementia without motor neuron disease. *Hum Mutat* 2009;30:E974-83.
47. Benajiba L, Le Ber I, Camuzat A, Lacoste M, Thomas-Anterion C, Couratier P, et al. TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol* 2009;65:470-3.
48. Chen-Plotkin AS, Lee VM, Trojanowski JQ. TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2010;6:211-20.
49. Dion PA, Daoud H, Rouleau GA. Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. *Nat Rev Genet* 2009;10:769-82.
50. Belega-Meireles A, Al-Chalabi A. Genetic studies of amyotrophic lateral sclerosis: controversies and perspectives. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10:1-14.
51. Rothstein JD. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2009;65 Suppl 1:S3-9.
52. Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009;323:1208-11.
53. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009;323:1205-8.
54. Bosco DA, LaVoie MJ, Petsko GA, and Ringe D. *Proteostasis and Movement Disorders: Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Morimoto R, Selkoe D, Kelly J. Protein Homeostasis. 1st ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011:234-258.
55. Lagier-Tourenne C, Cleveland DW. Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell* 2009;136:1001-4.
56. Anderson P, Kedersha N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:430-6.
57. Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, Buratti E, et al. TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J Neurochem* 2009;111:1051-61.
58. Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang YJ, Vanderweyde T, Citro A, Mehta T, et al. Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One* 2010;5:e13250.
59. Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP. Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *J Proteome Res* 2010;9:1104-20.
60. Strong MJ, Volkening K. TDP-43 and FUS/TLS: sending a complex message about messenger RNA in amyotrophic lateral sclerosis? *FEBS J* 2011;278:3569-77.
61. Thomas MG, Loschi M, Desbats MA, Boccaccio GL. RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell Signal* 2011;23:324-34.
62. Dewey CM, Cenik B, Sephton CE, Dries DR, Mayer P, 3rd, Good SK, et al. TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Mol Cell Biol* 2011;31:1098-108.
63. Kiebler MA, Bassell GJ. Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* 2006;51:685-90.
64. Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 2009;36:932-41.
65. Swarup V, Phaneuf D, Bareil C, Robertson J, Rouleau GA, Kriz J, et al. Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain* 2011;134:2610-26.
66. Joyce PI, Fratta P, Fisher EM, Acevedo-Aroza A. SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mamm Genome* 2011;22:420-48.
67. Xu YF, Zhang YJ, Lin WL, Cao X, Stetler C, Dickson DW, et al. Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Mol Neurodegener* 2011; 6:73.
68. Liachko NE, Guthrie CR, Kraemer BC. Phosphorylation promotes neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of TDP-43 proteinopathy. *J Neurosci* 2010;30:16208-19.
69. Ash PE, Zhang YJ, Roberts CM, Saldi T, Hutter H, Buratti E, et al. Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*. *Hum Mol Genet* 2010;19:3206-18.
70. Laird AS, Van Hoecke A, De Muyneck L, Timmers M, Van den Bosch L, Van Damme P, et al. Progranulin is neurotrophic in vivo and protects against a mutant TDP-43 induced axonopathy. *PLoS One* 2010;5:e13368.
71. Miguel L, Frebourg T, Champion D, Lecourtis M. Both cytoplasmic and nuclear accumulations of the protein are neurotoxic in *Drosophila* models of TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis* 2011;41:398-406.
72. Voigt A, Herholz D, Fiesel FC, Kaur K, Muller D, Karsten P, et al. TDP-43-mediated neuron loss in vivo requires RNA-binding activity. *PLoS One* 2010;5:e12247.
73. Li Y, Ray P, Rao EJ, Shi C, Guo W, Chen X, et al. A *Drosophila* model for TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3169-74.
74. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 2010;466:1069-75.

75. Lee T, Li YR, Ingre C, Weber M, Grehl T, Gredal O, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Hum Mol Genet* 2011;20:1697-700.
76. Ross OA, Rutherford NJ, Baker M, Soto-Ortolaza A, Carrasquillo MM, DeJesus-Hernandez M, et al. Ataxin-2 repeat-length variation and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 2011;20:3207-12.
77. Corrado L, Mazzini L, Oggioni GD, Luciano B, Godi M, Brusco A, et al. ATXN-2 CAG repeat expansions are interrupted in ALS patients. *Hum Genet* 2011;130:575-80.
78. Van Damme P, Veldink JH, van Blitterswijk M, Corveleyn A, van Vught PWJ, Thijs V, et al. Expanded ATXN2 CAG repeat size in ALS identifies genetic overlap between ALS and SCA2. *Neurology* 2011;76:2066-72.
79. Gispert S, Kurz A, Waibel S, Bauer P, Liepelt I, Geissen C, et al. The modulation of Amyotrophic Lateral Sclerosis risk by Ataxin-2 intermediate polyglutamine expansions is a specific effect. *Neurobiol Dis* 2012;45:356-61.
80. Daoud H, Belzil V, Martins S, Sabbagh M, Provencher P, Lacomblez L, et al. Association of long ATXN2 CAG repeat sizes with increased risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2011;68:739-42.
81. Chen Y, Huang R, Yang Y, Chen K, Song W, Pen P, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine: a possible risk factor for Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2011;32:1925 e1921-5.
82. Wang HY, Wang IF, Bose J, Shen CK. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics* 2004;83:130-9.
83. Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu YF, Petrucelli L, Buratti E, et al. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J Cell Sci* 2008;121:3778-85.
84. Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J Biol Chem* 2008, 283:13302-9.
85. Zhang YJ, Xu YF, Cook C, Gendron TF, Roettges P, Link CD, et al. Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:7607-12.
86. Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* 2009;18:3353-64.
87. Barmada SJ, Skibinski G, Korb E, Rao EJ, Wu JY, Finkbeiner S. Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2010;30:639-49.
88. Ayala YM, De Conti L, Avendano-Vazquez SE, Dhir A, Romano M, D'Ambrogio A, et al. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J* 2011;30:277-88.
89. Buratti E, Baralle FE. TDP-43: new aspects of autoregulation mechanisms in RNA binding proteins and their connection with human disease. *FEBS J* 2011;278:3530-8.
90. Sephton CF, Cenik C, Kucukural A, Dammer EB, Cenik B, Han Y, et al. Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem* 2011;286:1204-15.