

Joana Pinto da Silva

**Estudo do papel de uma proteína ligante de RNA
num modelo animal das doenças de poliglutaminas**



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2020

Joana Pinto da Silva

**Estudo do papel de uma proteína ligante de RNA
num modelo animal das doenças de poliglutaminas**

Mestrado em Ciências Biomédicas - Mecanismos de Doenças

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Clévio Nóbrega, Ph.D



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2020

Estudo do papel de uma proteína ligante de RNA num modelo animal das doenças de poliglutaminas

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam na listagem de referências incluída.

Universidade do Algarve,

(Joana Pinto da Silva)

Copyright © 2020 Joana Pinto da Silva

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

AGRADECIMENTOS

Chegada a meta final desta etapa académica, é fundamental reconhecer que devo agradecer a muitas pessoas por todo o apoio que me concederam na jornada que me conduziu à concretização deste trabalho.

Quero, primeiro, agradecer apoio e amizade de todos os membros que constituem o nosso grupo de laboratório, o Molecular Neuroscience And Gene Therapy lab (MNGT). Este grupo que, em particular neste ano, foi constituído por MoNtes de GenTe e não fugiu à sua fama de “Café Central”. Que este título não nos deixe enganar, pois os momentos de confraternização não impediram, de todo, o trabalho, dedicação e produtividade que todos estes estudantes e jovens cientistas constantemente demonstraram. Apreciei bastante o ambiente interpessoal que não se limitou à área de trabalho, mas se estendeu a vários dias de encontros e momentos de lazer que certamente não esquecerei.

Na verdade, foi um privilégio poder contar com pessoas com quem partilhei todo o meu percurso académico, desde a licenciatura até ao mestrado de Ciências Biomédicas. Por isso não podia deixar de mencionar a minha gratidão pela Inês, a Patrícia e o Ricardo, que nunca me fizeram sentir nada menos que muito bem acompanhada. Mas também queria agradecer a ajuda de todos os outros colegas e investigadores que impediram que o “laboratório pegasse fogo”.

Em particular, queria deixar o meu especial agradecimento à futura doutorada, Adriana Marcelo. Primeiro, porque me permitiu, de certa forma, contribuir para o trabalho que tem vindo a desenvolver na sua carreira académica. Mas, acima de tudo, quero agradecer a forma como foi incansável no acompanhamento que me prestou em todas as etapas do trabalho laboratorial. Agradeço por ter dispensado do seu tempo, tão precioso para realização das suas próprias tarefas.

De salientar, quero demonstrar a minha apreciação ao meu orientador, o Investigador Professor Doutor Clévio Nóbrega. Antes de mais, agradeço o facto de ter aceiteado a minha proposta de realizar a tese sob a sua supervisão. Foi capaz de me guiar neste caminho desconhecido de uma forma, a meu ver, exemplar. De facto excedeu as minhas expectativas, tendo em conta que teve muitos alunos para orientar, para não falar das inúmeras outras responsabilidades e preocupações com as quais tem de lidar. Foi uma honra poder colaborar com um investigador de renome e impacto tão importante na sua área de estudo. É, certamente, um privilégio para mim poder, de alguma forma, contribuir para acrescentar conhecimento à comunidade científica. Principalmente, numa área de estudo em que qualquer avanço pode trazer esperanças para indivíduos com este tipo de doenças raras, para os quais não existe cura.

Finalmente, quero manifestar a minha gratidão pela minha família, por me concederem todos os meios necessários à realização deste trabalho. Começo por agradecer o facto de me terem proporcionado a oportunidade de realizar todo este percurso académico, financiando toda a minha educação. Agradeço, também, todo o apoio prestado durante este ano, incluindo as múltiplas ocasiões que demonstraram ter interesse e preocupação sobre o avançar deste projeto. Não deixando de referir os meus pais e a minha irmã, que me concederam o espaço e o tempo necessários à escrita e desenvolvimento desta dissertação. Obrigada pela confiança que depositaram em mim sem a qual, certamente, não teria chegado aqui.

RESUMO

As doenças de poliglutaminas são um grupo de nove doenças neurodegenerativas raras causadas por uma expansão anormal do trinucleótido CAG no gene causador, que codifica um segmento de poliglutaminas expandido na respetiva proteína. Estas proteínas tendem a agregar, formando agregados de proteína insolúveis, que é uma característica neuropatológica das doenças de poliglutaminas. Os mecanismos moleculares da patogénese de doenças de poliglutaminas ainda não são completamente compreendidos. Além disso, atualmente não estão disponíveis opções terapêuticas para estas doenças raras, que parem ou atrasem a sua progressão e que infelizmente culmina com a morte dos doentes.

A regulação da expressão genética é um processo crucial através do qual as células eucarióticas respondem e adaptam-se a diferentes estímulos. Quando os mRNAs sofrem transcrição, eles são sujeitos a alterações que controlam a tradução e estabilidade do mRNA, eventos que são regulados por proteínas ligantes de RNA (RBPs). Os eventos de processamento de RNA desempenham um papel fundamental na regulação do desenvolvimento cerebral e funcionamento normal, o que significa que defeitos no metabolismo do RNA podem levar a comprometimentos neuronais e sinápticos, que podem acabar por desencadear patologias. Refletindo esta importância, mais de 50% dos RBPs conhecidos são expressos no cérebro, onde estão envolvidos em diferentes processos como *splicing* alternativo, transporte, localização, estabilidade e tradução de RNAs.

O nosso objetivo neste projeto foi estudar o impacto da sobreexpressão de G3BP1 num modelo transgénico de doenças de poliglutaminas. Foi possível verificar que o cruzamento de murganhos heterozigóticos SCA3/MDJ com animais *wild-type* gera murganhos transgénicos. Estudos *in vivo* revelaram que a sobreexpressão de G3BP1 conduz à melhoria do fenótipo motor e da neuropatologia de murganhos com SCA3/MJD. Em conclusão, estes resultados sugerem que a sobreexpressão de G3BP1 apresenta um efeito neuroprotetor. No entanto, são necessários mais estudos para compreender o mecanismo molecular responsável por este efeito.

Palavras-chave: proteínas ligantes de RNA; grânulos de *stress*; agregação; neurodegeneração; doenças de poliglutaminas.

ABSTRACT

Polyglutamine (PolyQ) diseases are a group of nine rare neurodegenerative disorders caused by an abnormal expansion of the trinucleotide CAG in the causative gene, which encodes a PolyQ tract in their respective protein. These proteins carrying an abnormally expanded PolyQ tract tend to aggregate, forming insoluble protein aggregates, which are a key feature of PolyQ diseases. The molecular mechanisms underlying PolyQ diseases pathogenesis are not yet fully understood. Moreover, currently there are no therapeutic options available for these rare diseases stopping or delaying the disease progression, which culminates with patient death.

The regulation of gene expression is a crucial process whereby eukaryotic cells respond and adapt to different stimuli. Once mRNAs undergo transcription, they are subjected to posttranscriptional changes controlling mRNA translation and stability, events that are regulated by the RNA-binding proteins (RBPs). The RNA processing events play a major role in the regulation of brain development and normal functioning, meaning that defects in RNA metabolism could lead to neuronal and synaptic impairments, which ultimately might lead to disease. Reflecting this importance, more than 50% of known RBPs are expressed in the brain, where they are involved in different processes such as alternative splicing, transport, localization, and stability and translation of RNAs.

Our goal in this project was to study the impact of the overexpression of G3BP1 in a transgenic mouse model of PolyQ diseases. It was possible to verify that the crossing of heterozygotic SCA3/MJD mice with wild-type animals generates transgenic mice. *In vivo* studies revealed that the G3BP1 overexpression can ameliorate the motor phenotype and neuropathology in SCA3/MJD mice. In conclusion, these results suggest that G3BP1 overexpression displays a neuroprotective effect. Although, further studies are required to fully understand the molecular mechanism of action responsible for this effect.

Keywords: RNA binding proteins; stress granules; aggregation; neurodegeneration; polyglutamine diseases.

ÍNDICE REMISSIVO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Neurodegeneração e agregação	1
1.1.1 - Doenças de Poliglutaminas	2
1.1.1.1 - Ataxia Espinocerebelosa do tipo 3 / Doença de Machado-Joseph	3
1.2 - Grânulos de RNA	7
1.2.1 - Grânulos de <i>stress</i>	8
1.2.1.1 - Funções dos grânulos de <i>stress</i>	9
1.2.1.2 - Formação de grânulos de <i>stress</i>	10
1.2.1.2.1 - Formação canónica de grânulos de <i>stress</i>	11
1.2.1.2.2 - Formação não-canónica de grânulos de <i>stress</i>	15
1.2.1.3 - Formação hiperativa de grânulos de <i>stress</i>	16
1.2.1.4 - Modificações pós-tradução e formação de grânulos de <i>stress</i>	16
1.2.1.5 - Grânulos de <i>stress</i> e neurodegeneração	18
1.3 - Proteínas ligantes de RNA	22
1.3.1 - Domínios estruturais das proteínas ligantes de RNA	23
1.3.2 - Funções das proteínas ligantes de RNA	26
1.4 - G3BPs	28
1.4.1 - Motivos estruturais dos G3BPs	30
1.4.2 - Função das G3BPs	32
1.4.3 - G3BPs e a formação de grânulos de <i>stress</i>	33
1.4.4 - G3BPs e a atividade mediada pela ubiquitina	35
1.4.5 - Implicação da G3BP1 na SCA2 e SCA3/MJD	36

2. OBJETIVO.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 - Animais e manutenção	39
3.2 - Genotipagem	40
3.3 - Desenho de plasmídeo LV e produção de vetor.....	41
3.4 - Injeções estereotáxicas no cerebelo dos murganhos	41
3.5 - Testes comportamentais	41
3.5.1 - Teste <i>rotarod</i>	42
3.5.2 - Teste de equilíbrio (em barras).....	42
3.5.3 - Teste de natação	42
3.5.4 - Teste de pegadas.....	43
3.6 - Processamento histológico de amostras de cérebro de murganho	43
3.7 - Imunohistoquímica.....	44
3.8 - Análise quantitativa de agregados e células de Purkinje	44
3.9 - Coloração cresilo violeta.....	45
3.10 - Análise estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1 - O cruzamento de murganhos heterozigóticos SCA3/MDJ Q69 com murganhos <i>wild-type</i> gera animais transgênicos	46
4.2 - A sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma melhoria moderada do fenótipo motor em murganhos com SCA3/MJD	47
4.3 - A sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma diminuição da neuropatologia em murganhos com SCA3/MJD	50
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	61
ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Modelo clássico de agregação patológica de proteínas	1
Figura 1.2 – Domínios estruturais da proteína Ataxina-3	4
Figura 1.3 – Mecanismo da patogénese celular na SCA3/MJD.....	6
Figura 1.4 – Formação de grânulos de <i>stress</i>	12
Figura 1.5 – Separação de fase líquido-líquido.....	14
Figura 1.6 – Fosforilação de G3BP1	17
Figura 1.7 – Ciclo de formação de SGs	20
Figura 1.8 – Domínios estruturais de RBPs	24
Figura 1.9 – LCDs e IDDs em proteínas nucleadoras de SGs	25
Figura 1.10 – Funções das RBPs.....	27
Figura 1.11 – Ciclo de ativação da proteína Ras.....	28
Figura 1.12 – Função da G3BP1 em vias de sinalização tumorais	29
Figura 1.13 – Domínios estruturais das G3BPs	30
Figura 1.14 – Redução da neuropatologia no modelo lentiviral de murganhos SCA3/MJD pela sobreexpressão de G3BP1	37
Figura 3.1 – Construção utilizada para gerar murganhos com SCA3/MDJ que apresentam acumulação de poliglutaminas nas células de Purkinje	39
Figura 3.2 – Linha cronológica experimental	42
Figura 4.1 – Genotipagem de murganhos resultantes do cruzamento de animais SCA3/MDJ Q69 com murganhos <i>wild-type</i>	46
Figura 4.2 – A sobreexpressão de G3BP1 induz uma tendência para a melhoria da coordenação motora em murganhos com SCA3/MJD.....	48
Figura 4.3 – A sobreexpressão de G3BP1 induz uma tendência para uma melhoria na marcha e ataxia em murganhos com SCA3/MJD.....	49
Figura 4.4 – A sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma diminuição de agregados de Ataxina-3 em murganhos com SCA3/MJD	51

Figura 4.5 – A sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma preservação das células de Purkinje em murganhos com SCA3/MJD	52
Figura 4.6 – A sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma conservação das camadas neuronais de neurónios do cerebelo em murganhos com SCA3/MJD	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Classificação de grânulos de RNA citoplasmáticos	7
Tabela 1.2 – Resposta celular a diferentes tipos de <i>stress</i>	10
Tabela 1.3 – Semelhanças entre grânulos de <i>stress</i> e inclusões de proteínas mal-conformadas ..	19
Tabela 1.4 – Algumas proteínas ligantes de RNA associadas a doenças neurodegenerativas.....	23

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 – Resultados da genotipagem de animais resultantes do cruzamento de murganhos transgênicos machos heterozigóticos (+/-) com fêmeas C57BL/6 <i>wild-type</i>	79
Anexo 2 – Teste <i>rotarod</i>	80
Anexo 3 – Teste de natação	80
Anexo 4 – Teste de equilíbrio em barras	81
Anexo 5 – Teste de pegadas	82

LISTA DE ABREVIATURAS

AD - doença de Alzheimer

ALS - esclerose lateral amiotrófica

ANG - angiogenina

Atx2 - Ataxina-2

Atx3 - Ataxina-3

bp - pares de bases

C2 - domínio de ligação a fosfolípidos dependente de cálcio

CAG - citosina-adenina-guanina

CPEB - proteína de ligação ao elemento de poliadenilação citoplasmática

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

eIF2 α - fator de iniciação eucariótico 2 α

eIF4F - fator de iniciação eucariótico 4F

EMT - transição epitelial-mesenquimal

ER - retículo endoplasmático

FAK - quinase de adesão focal

FMRP - proteína do retardo mental do X frágil

FTD - demência frontotemporal

FUS - proteína *fused in sarcoma*

G3BP - proteína ligante do domínio SH3-domínio Ras-GAP humana

G3BP1 - proteína ligante da proteína ativadora da RasGTPase

GAP - proteína ativadora da GTPase

GEF - fator de troca de nucleótidos de guanina

GFP - proteína verde fluorescente

GL - camada granular

Grb-2 - proteína 2 ligada ao recetor de fator de crescimento

GTP - guanosina trifosfato

HA - hemaglutinina

HD - doença de Huntington

hnRNPA1 - ribonucleoproteína heterogénea nuclear 1

hnRNPA2 - ribonucleoproteína heterogénea nuclear 2

IDD - domínio intrinsecamente desordenado

IL - interleucina

ISG - gene estimulado por interferões

LCD - sequência de baixa complexidade

LLPS -separação de fase líquido-líquido

LV-G3BP1 - vetores lentivirais codificando para a proteína G3BP1

MATR3 - proteína matrin-3

miRNAs - microRNAs

ML - camada molecular

MMS - Metilmetanossulfonato

mRNP - ribonucleoproteína mensageira

NES - sinal de exporte nuclear

NGS - soro normal de cabra

NLS - sinal de localização nuclear

NTF2 - domínio do tipo fator de transporte nuclear 2

O-GlcNac - O-glicosilação com N-acetil-glucosamina

OPT - optineurina

PABP - proteína de ligação a poli(A)
PB - corpo de processamento
PCR - reação em cadeia de polimerase
PFA - paraformaldeído
PH - domínio de homologia à plecstrina
PIC - complexo de pré-iniciação
PKR - proteína quinase R
PolyQ - poliglutaminas
PTM - modificação pós-traducional
PxxP - regiões ricas em prolina
qPCR - PCR quantitativo
RasGAP - proteína ativadora da Ras-GTPase
RBP - proteína ligante de RNA
RGG - domínios ricos em arginina e glicina
RNP - ribonucleoproteína
RRM - motivo de reconhecimento de RNA
SCA - ataxia espinocerebelosa
SCA1 - ataxia espinocerebelosa do tipo 1
SCA2 - ataxia espinocerebelosa do tipo 2
SCA3 - ataxia espinocerebelosa do tipo 3
Scr - coativador do receptor de esteróides
Ser149 - resíduo serina-149
SG - grânulo de *stress*
shAtx3 - *short-hairpin* contra a Atx3 mutada
SIRT6 - sirtuína 6

SMA - atrofia muscular espinhal

SMN - proteína de sobrevivência do neurónio motor

TDP-43 - *transactive response DNA binding protein 43 kDa*

Tg - transgénico

TIA1 - antígeno intracelular de células T1

TIAR - proteína tipo-TIA

TTP - tristetraprolina

UIM - motivo de interação com a ubiquitina

USP - protease ubiquitina-específica

USP10 - protease ubiquitina-específica 10

UV - ultravioleta

WT - *wild-type*

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Neurodegeneração e agregação

De uma forma geral as doenças neurodegenerativas estão ligadas ao envelhecimento, afetando o sistema nervoso central e os seus neurónios, como na doença de Alzheimer, na esclerose lateral amiotrófica, na demência frontotemporal, na doença de Parkinson ou na doença de Huntington. Estas patologias apresentam características e sintomas muito diversos, mas todas elas demonstram a acumulação de proteínas defeituosas (mal conformadas) nas regiões afetadas do cérebro (Forman et al., 2004).

O modelo clássico de agregação proteica patológica das doenças neurodegenerativas baseia-se na ação de massas e minimização de energia (Jarrett & Lansbury, 1993; Dobson, 2003). Segundo este modelo (Figura 1.1), as proteínas ficam suscetíveis à agregação, inicialmente como monómeros, adquirindo uma conformação defeituosa, dando origem a uma oligomerização aleatória que culmina na formação de fibrilhas. Esta agregação proteica ocorre como uma reação química indesejada, uma vez que os seus produtos causam toxicidade, que pode conduzir a morte celular e inflamação. A diminuição da acumulação de oligómeros e fibrilhas é promovida pela degradação dos mesmos por ação de múltiplas proteínas chaperonas, assim como por ação do sistema autofágico e da ubiquitina-proteasoma (Bandyopadhyay & Cuervo, 2007; Powers et al., 2009).

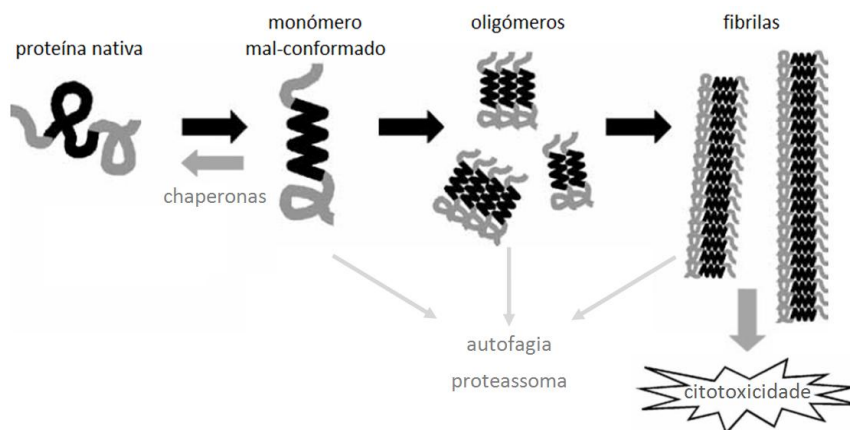


Figura 1.1 – Modelo clássico de agregação patológica de proteínas. As proteínas ligadas a doenças neurodegenerativas são alvo da oligomerização de monómeros que sofrem uma transição conformacional para estruturas fibrilares. As proteínas chaperonas, a via autofágica ou o sistema ubiquitina-proteasoma podem limitar este processo, evitando a toxicidade celular. Adaptado de (Y Nagai et al., 2007)

Durante muitos anos, pensou-se que os processos patológicos que levam à acumulação de agregados em doenças neurológicas resultavam principalmente da agregação não-fisiológica de proteínas. Do mesmo modo, presumiu-se que estas acumulavam-se devido a deficiências progressivas ligadas ao envelhecimento, nomeadamente a uma disfunção dos sistemas proteostáticos, como a via autofágica e o sistema da ubiquitina-proteasoma. No entanto, nos últimos anos, este tema tem sido revolucionado pela caracterização biológica da resposta do metabolismo de RNA ao *stress*. Esta resposta ao *stress* aparenta ter um papel importante na patofisiologia das doenças neurodegenerativas, particularmente na esclerose lateral amiotrófica, demências frontotemporais e doença de Alzheimer (Shukla & Parker, 2016; Vanderweyde et al., 2016).

1.1.1 - Doenças de Poliglutaminas

Diversas doenças neurodegenerativas são causadas por repetições anormais de aminoácidos em determinadas proteínas que, de outra forma, nomeadamente na sua função não estão relacionadas (Zoghbi & Orr, 2000). Quando estas repetições são expandidas para além de um limite crítico dão origem a diversas doenças, destacando-se as doenças de poliglutaminas, que são causadas por repetições consecutivas do trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) na região codificadora dos genes causadores das doenças (Cummings & Zoghbi, 2000). O grupo de doenças de poliglutaminas é formado por, pelo menos, nove patologias: doença de Huntington, atrofia dentatorubro-palidoluisiana, atrofia muscular bulbo-espinhal e várias ataxias espinocerebelosas (SCAs), dos tipos 1, 2, 3, 6, 7 e 17 (Zoghbi & Orr, 2000).

Estas patologias apresentam algumas semelhanças, incluindo uma neurodegeneração progressiva num conjunto de neurónios específico para cada doença, assim como a presença de agregados de proteínas insolúveis (Nóbrega et al., 2015). Atualmente sabe-se que a expansão de cadeias de poliglutaminas em cada uma das proteínas associadas a estas doenças neurodegenerativas altera a conformação das proteínas desencadeando a sua agregação patológica (Shao & Diamond, 2007). No entanto, ainda existem dúvidas acerca do mecanismo que origina a vulnerabilidade neuronal em cada doença. As alterações da função normal da proteína mutada e o ganho de função tóxica são fatores que podem estar interligados para tentar dar uma resposta a estas dúvidas.

Diversas hipóteses para o mecanismo patológico das doenças de poliglutaminas incluem a perturbação na regulação molecular da expressão genética a nível transcripcional, atribuída às proteínas mutadas; assim como o empacotamento incorreto, acumulação e agregação das proteínas expandidas, que perturbam o equilíbrio de RNA e a homeostasia proteica (Shao & Diamond, 2007; Matos et al., 2019). O papel dos agregados na patologia molecular das doenças de poliglutaminas é um aspeto controverso, mas diversos estudos sugeriram que contribui para a patogénese destas doenças (Paulson et al., 1997; Bichelmeier et al., 2007) através de alterações da transcrição (McCampbell et al., 2000; F Li et al., 2002) ou perturbação da função e organização nuclear (Sun et al., 2007). No entanto, existem evidências contraditórias a esta ideia, que indicam que os agregados proteicos podem representar uma resposta celular protetora (Taylor et al., 2003; Arrasate et al., 2004).

1.1.1.1 - Ataxia Espinocerebelosa do tipo 3 / Doença de Machado-Joseph

A ataxia espinocerebelosa do tipo 3 (SCA3), também conhecida como doença de Machado-Joseph, é uma doença neurodegenerativa hereditária autossómica dominante progressiva (Durr et al., 1996). Esta patologia é a segunda doença de poliglutaminas mais comum (Nóbrega et al., 2015), mas é a ataxia espinocerebelosa autossómica dominante mais comum no mundo (Durr et al., 1996; Schöls et al., 2004; Riess et al., 2008). A sua frequência relativa é mais alta em países como o Brasil (Jardim et al., 2001), Portugal (Silveira et al., 1998; Vale et al., 2010) ou Japão (Maruyama et al., 2002; Shibata-Hamaguchi et al., 2009), mas também em países como o Canadá (Kraft et al., 2005), EUA (Moseley et al., 1998) ou Austrália (Storey et al., 2000). No entanto, a SCA3/MJD apresenta maior prevalência a nível mundial nos Açores, com cerca de 1: 140 doentes na ilha de Flores (Sudarsky & Coutinho, 1995).

A SCA3/MJD é causada por uma expansão anormal de repetições CAGs na zona codificadora do gene *ATXN3/MJD1* localizado no cromossoma 14q32.1, que origina numa cadeia expandida de poliglutaminas na região codificante da proteína Ataxina-3 (Atx3) (Takiyama et al., 1993; Kawaguchi et al., 1994). A Ataxina-3 é uma enzima desubiquitinante envolvida na proteólise mediada pela ubiquitina (Doss-Pepe et al., 2003), com implicações na regulação da tradução, do citoesqueleto e do transporte vesicular (Weissman, 2001; Mazzucchelli et al., 2009; Rodrigues et al., 2010). A Ataxina-3 mutante pode conter na sua

sequência 55-84 glutaminas consecutivas, em contraste com a proteína normal que tem 10-51 glutaminas (Maciel et al., 2001) (Figura 1.2).

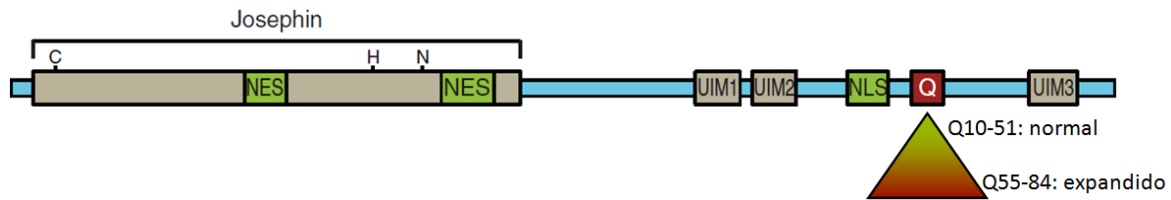


Figura 1.2 – Domínios estruturais da proteína Ataxina-3. A Ataxina-3 tem um domínio catalítico (Josephin) no terminal-N (com os aminoácidos C, H e N), responsável pela sua atividade de isopeptidase, e 2 sinais de exporte nuclear (NES). No terminal-C, tem 3 motivos de interação com a ubiquitina (UIMs), um sinal de localização nuclear (NLS) e uma região rica em poliglutaminas. Está representada a amplitude da cadeia de poliglutaminas desde o estado normal até à condição patológica. Adaptado de (Evers et al., 2014).

Apesar da causa genética da SCA3/MJD estar claramente definida, os mecanismos neurodegenerativos que estão subjacentes à doença ainda não estão completamente compreendidos. Admite-se que expansão de poliglutaminas confere um ganho de função tóxica à Ataxina-3 expandida, levando à formação de inclusões neuronais intranucleares, assim como à disfunção e degeneração neuronal observadas (Schmidt et al., 1998; Schöls et al., 2004; Orr & Zoghbi, 2007). Esta neurodegeneração envolve o comprometimento estrutural e funcional de diversas zonas cerebrais, incluindo o núcleo dentado (no cerebelo), núcleos da ponte, o estriado, a *substantia nigra*, os núcleos do nervo motor cranial, mas também a espinal medula (Sudarsky & Coutinho, 1995; Durr et al., 1996; Maciel et al., 2001).

A principal característica clínica da SCA3/MJD é a ataxia progressiva, uma disfunção da coordenação motora que pode afetar a visão, o discurso, a marcha e o equilíbrio (Sudarsky & Coutinho, 1995; Riess et al., 2008), apesar de a doença ser também caracterizada por vários sinais piramidais associados a uma síndrome extrapiramidal distónica-rígida e/ou amiotrofia (Fowler, 1984; Durr et al., 1996; Schöls et al., 2004). Assim, a SCA3/MJD é caracterizada por um amplo espectro de sintomas incluindo ataxia, instabilidade postural, rigidez, distonia, amiotrofia, deficiências oculomotoras, disartria (Takiyama et al., 1993; Sudarsky & Coutinho, 1995; Riess et al., 2008) e, nalguns casos, parkinsonismo (Gwinn-Hardy et al., 2001; Subramony et al., 2002; Lu et al., 2004). O perfil da doença inclui ainda disfagia e perda de peso levando, em casos graves, a morte prematura (Fowler, 1984; Sudarsky & Coutinho,

1995; Durr et al., 1996). No entanto, mesmo com os importantes avanços feitos nos últimos anos, ainda não existem tratamentos para esta patologia.

A enorme variedade de fenótipos clínicos existente realça a heterogeneidade desta doença, o que levou ao reconhecimento de diferentes subtipos de SCA3/MJD, tendo em conta a apresentação dos sintomas (Durr et al., 1996; Maciel et al., 2001; Riess et al., 2008): doença de início precoce com sinais extrapiramidais e espasticidade mas ataxia mínima; ataxia progressiva na meia-idade; ataxia de início tardio acompanhada por neuropatia, amiotrofia e perda de reflexos; e parkinsonismo com ou sem ataxia (Riess et al., 2008). Esta variabilidade nas características patológicas pode, também, ser parcialmente atribuída a diferenças no tamanho das expansões de repetições de poliglutaminas. Sendo que, maiores expansões originam sintomas neurológicos mais precoces e mais severos (Durr et al., 1996; Zoghbi & Orr, 2000; Maciel et al., 2001; Riess et al., 2008).

A SCA3/MJD tem diversos aspetos em comum com outras doenças de poliglutaminas, incluindo a toxicidade celular associada à expansão do gene *ATXN3/MJD1* que resulta na expressão da Ataxina-3 expandida, sendo que recentemente tem sido descrita a hipótese de que os mRNAs expandidos podem ser tóxicos por si próprios (Evers et al., 2014). Mas além disso os agregados de Ataxina-3 expandida e outras espécies formadas ao longo do processo de patogénese perturbam também o correto funcionamento celular (Shao & Diamond, 2007) (Figura 1.3). Estas alterações afetam vários sistemas, incluindo vias de degradação proteica, regulação de transcrição genética, resposta celular ao *stress*, organização do citoesqueleto, mitocôndria e componentes responsáveis pela manutenção da homeostasia do cálcio (Shao & Diamond, 2007). As propriedades da Ataxina-3 podem também estar alteradas por modificações pós-transducionais, tais como o processamento proteolítico ou fosforilação que, por sua vez, modulam a toxicidade da proteína (Matos et al., 2016).

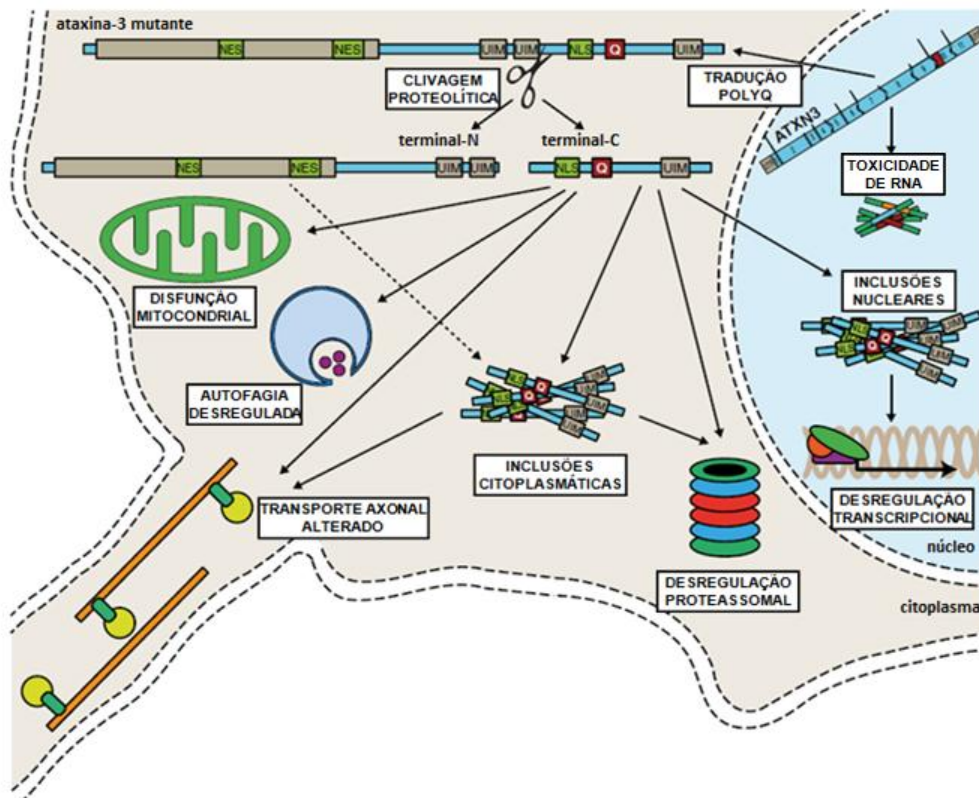


Figura 1.3 – Mecanismo da patogênese celular na SCA3/MJD. A expansão anormal de poliglutaminas nas proteínas mutantes da Ataxina-3 conduz a uma cascata de eventos, incluindo a disfunção de diferentes vias celulares, resultando em morte neuronal. Para além da toxicidade associada a segmentos de poliglutaminas expandidos, os respetivos mRNAs podem estar envolvidos na patogênese da doença. (Evers et al., 2014)

A Ataxina-3 é uma proteína preferencialmente citoplasmática, cuja expressão foi detetada praticamente em todas as regiões do cérebro (Paulson et al., 1997; Schmidt et al., 1998). No entanto, a expansão da cadeia de poliglutaminas despoleta alterações conformacionais, que impedem o correto empacotamento da proteína (Masino et al., 2003; Y Nagai et al., 2007). Em situações de *stress* celular, como o observado na SCA3/MJD, estas alterações causam agregação de proteínas mutadas e a sua acumulação no núcleo em zonas neuronais específicas (Paulson et al., 1997). Esta realocação nuclear parece contribuir para a toxicidade da Ataxina-3 expandida (Bichelmeier et al., 2007), mas continua pouco claro como é que a presença no núcleo contribui para este efeito. De facto, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que esta agregação é necessária para que se dê a disfunção e degeneração associadas à doença (Bichelmeier et al., 2007; Y Nagai et al., 2007). Mesmo assim, não existe uma correlação clara entre a presença de agregados e a neurodegeneração, parecendo que estes não são suficientes para causar degeneração (Trottier et al., 1998; Warrick et al., 1998; Boy et al., 2010; Silva-Fernandes et al., 2010).

Nos últimos anos, diversos estudos identificaram diferentes mecanismos moleculares e vias celulares que estão desreguladas na SCA3/MJD. Entre estes destacam-se processos de autofagia, proteólise e modificações pós-tradução. A partir destes estudos foi possível identificar novos alvos terapêuticos, tendo alguns já sido comprovadamente bem-sucedidos em modelos de doença (Matos et al., 2019).

1.2 - Grânulos de RNA

Os grânulos de RNA, ou grânulos de ribonucleoproteínas (RNPs), são complexos macromoleculares que contêm proteínas ligantes de RNA (RBPs), maquinaria translacional e diversos mRNAs, que se formam em resposta a sinais extra e intracelulares (Krichevsky & Kosik, 2001). Estes grânulos partilham componentes proteicos comuns, mas cada tipo de grânulo de RNA contém uma população distinta de proteínas e desempenha funções diferentes. A classificação dos grânulos de RNA varia de acordo com a sua localização, composição e funções propostas, englobando grânulos de *stress* (*stress granules* em inglês, SGs), corpos de processamento (*processing bodies* em inglês, PBs), entre outros (resumido na Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Classificação de grânulos de RNA citoplasmáticos

Tipo de grânulo de RNA	Funções	Referência
Grânulos de <i>stress</i> (SG)	Resposta ao <i>stress</i> em mamíferos; reprogramação da tradução de RNA	(Anderson & Kedersha, 2008; Nancy Kedersha & Anderson, 2009)
Corpos de processamento (PBs)	Degradação de RNA	(N. Kedersha et al., 2005)
Grânulos de RNA neuronais	Transporte de transcritos reprimidos para a sinapse dos neurónios	(Krichevsky & Kosik, 2001)
Grânulos de armazenamento	Armazenamento de mRNAs num estado de repressão; encaminhamento de mRNAs para ativação, repressão ou inibição	(R Parker & Sheth, 2007; Nancy Kedersha & Anderson, 2009)
Grânulos dependentes da atividade	Síntese proteica dependente da atividade; plasticidade sináptica, habituação e memória	(Hoeffler & Klann, 2010)

Para além dos grânulos citoplasmáticos, os grânulos podem ser encontrados no núcleo, sendo os mais bem caracterizados os nucléolos (Savino et al., 2001), os corpos de Cajal (Nizami et al., 2010), os agregados granulares inter-cromatínicos (*speckles*) (Spector & Lamond, 2011), *paraspeckles* (Bond & Fox, 2009), corpos PML (do inglês, *promyelocytic leukaemia*) (Bernardi & Pandolfi, 2007). Os SGs, apesar de maioritariamente citoplasmáticos, também se podem formar no núcleo, onde são chamados de corpos de *stress* nucleares, tendo também já sido descritos em organelos celulares (Uniacke & Zerges, 2008).

1.2.1 - Grânulos de *stress*

Os SGs são um tipo de grânulo de RNA que surge em resposta a diferentes condições de *stress* (Pothof et al., 2009; Souquere et al., 2009; Ghisolfi et al., 2012). Os SGs foram inicialmente descritos em células de tomate expostas a choque térmico (Nover et al., 1983), mas também se verificou a sua existência noutras plantas, protozoários, leveduras, *C. elegans*, drosófila e células de mamíferos (Thomas et al., 2011; Gutierrez-Beltran et al., 2015). Estes grânulos também foram estudados em vários modelos, desde linhas de células imortalizadas até células primárias, tecidos animais e amostras de doentes (Brown et al., 2011; Vanderweyde et al., 2012; Ghosh & Geahlen, 2015).

O termo “grânulo de stress”, historicamente, era usado para descrever partículas citoplasmáticas que contêm mRNAs poli-adenilados, proteína de ligação a poli(A) (PABP) e antigénios intracelulares de células T1 (TIA1) (NL Kedersha et al., 1999; N. Kedersha et al., 2000). Mais recentemente, uma análise composicional dos SGs mais ampla revelou que os componentes essenciais dos SGs são complexos de RNPs mensageiras (mRNPs), incluindo complexos de pré-iniciação (PICs) com tradução bloqueada, que consistem em subunidades ribossomais pequenas (40S), mRNAs e fatores de iniciação de tradução (N. Kedersha et al., 2002; Markmiller et al., 2018). No entanto, atualmente sabe-se que os principais componentes dos SGs são RBPs e mRNAs não-polissomais, que interagem entre si para formar estruturas micrométricas através de interações multivalentes, responsáveis pelas suas propriedades semelhantes a líquidos (Nunes et al., 2019). Os SGs são compartimentos fribriilo-granulares irregularmente moldados produzidos transientemente (Mahboubi & Stochaj, 2017). O seu tamanho pode variar entre 100 a 1000nm de diâmetro nas células de mamíferos, mas apresentam tipicamente 200 a 400 nm (Wolozin & Ivanov, 2019).

Durante o envelhecimento, os neurónios são expostos a um nível aumentado de *stress* oxidativo e de outros tipos (Vanderweyde et al., 2013). Desta forma, com a idade, dá-se um aumento da expressão de genes envolvidos na resposta celular ao *stress* no cérebro, enquanto esta diminui para a maioria dos restantes genes (Bishop et al., 2010). A resposta celular é executada por SGs (Anderson & Kedersha, 2002), cuja dinâmica, composição e tamanho dependem do tipo de *stress* e da respetiva intensidade e duração (Buchan et al., 2011; Thomas et al., 2011; Aulas & Vande Velde, 2015; Aulas et al., 2017). Para além disso, podem ocorrer transformações destes SGs com a progressão da resposta (Thomas et al., 2011) (Vanderweyde et al., 2013). Em estudos nos quais se impede a maturação dos SGs por agentes inibidores dos microtúbulos é evidenciada a incorporação sequencial de componentes (Fujimura et al., 2009; Kolobova et al., 2009). Por sua vez, os SGs induzidos por vírus podem demonstrar uma alteração progressiva na composição como consequência da atividade viral (Piotrowska et al., 2010). Para além disso, os SGs incorporam PBs ou componentes destes numa fase tardia (Thomas et al., 2009).

1.2.1.1 - Funções dos grânulos de *stress*

As células eucariotas respondem a condições prejudiciais ativando um conjunto de mecanismos conservados que têm como propósito reestabelecer a homeostasia celular. A resposta ao *stress* envolve a repressão traducional de proteínas não-*housekeeping* e o aprisionamento de transcritos de mRNA não relevantes para a resposta ao *stress* nos SGs (Anderson & Kedersha, 2008; Protter & Parker, 2016). A inibição de tradução permite poupar energia e responder ao dano induzido por *stress* (N. Kedersha & Anderson, 2002).

Diversos estudos demonstraram que os SGs recrutam proteínas que estão envolvidas em vias de sinalização que influenciam o metabolismo e sobrevivência celulares (W Li et al., 2004; WJ Kim et al., 2005). Durante esta resposta ao *stress*, ocorrem mudanças na tradução para gerar proteínas com função protetora de forma rápida (N. Kedersha et al., 2000). O padrão exato de tradução ou degradação depende do *stress* aplicado (Munchel et al., 2011). As alterações da tradução, por sua vez, ativam vias bioquímicas específicas e influenciam o local de formação dos SGs, bem como o padrão de aprisionamento do RNA (Wolozin, 2012).

A triagem de mRNAs é uma função essencial dos SGs (N. Kedersha & Anderson, 2002), que selecionam de forma dinâmica mRNAs para reiniciação, armazenamento ou

degradação, podendo ser necessária para a tradução de mRNAs anti-apoptóticos, como respostas a situações de *stress* (N. Kedersha et al., 2013). Do mesmo modo, a reprogramação da expressão proteica induzida por *stress* também inclui a estabilização ou destabilização de certos mRNAs. Assim, a reprogramação pós-transcricional da tradução de mRNAs reconfigura o proteoma durante condições adversas (Anderson & Kedersha, 2008).

É, assim, claro o papel dos SGs como pontos de sinalização transiente que regulam a resposta a uma variedade de estímulos (Souquere et al., 2009; Ghisolfi et al., 2012). A formação de SGs tem grandes vantagens para a fisiologia celular, como a minimização do consumo de energia, o controlo proteico e melhoria da sobrevivência celular em condições prejudiciais (Arimoto et al., 2008; Panas et al., 2016).

1.2.1.2 - Formação de grânulos de *stress*

O contexto celular é importante na formação de SGs, uma vez que influencia a composição e função destes. As condições indutoras de SGs incluem a privação de nutrientes, choque térmico, inibição do proteossoma, bem como *stress* oxidativo, osmótico e genotóxico, como a radiação ultravioleta (UV) (Pothof et al., 2009; Thomas et al., 2011; N. Kedersha et al., 2013). A resposta ao *stress* nas células eucarióticas envolve a ativação de mecanismos de defesa que podem promover a sobrevivência celular ou iniciar a apoptose, o que também depende do tipo de *stress* aplicado (Tabela 1.2). Os SGs formam-se como mecanismo de defesa anti-apoptótico, por exemplo, após tratamento com *stress* de choque térmico ou arsenito de sódio, que causam múltiplos tipos de *stress*, como o *stress* oxidativo (NL Kedersha et al., 1999).

Tabela 1.2 – Resposta celular a diferentes tipos de *stress*

Agentes anti-apoptóticos				
Hipóxia		Choque térmico		<i>Stress</i> oxidativo (Arsenito de sódio)
Agentes apoptóticos				
Raios-X e irradiação UV	Genotoxinas (ex.: MMS)	Peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	<i>Stress</i> osmótico (ex.: sorbitol)	Fármacos quimioterapêutico (ex.: etoposido)

Abreviaturas: UV, ultravioleta; MMS, Metilmetanossulfonato. Baseado em (Arimoto et al., 2008)

A formação de SGs é caracterizada por uma agregação proteica regulada e reversível, que contrasta com a formação de vesículas, o principal mecanismo de consolidação de moléculas (NL Kedersha et al., 1999). Uma vez que os SGs se dissolvem rapidamente após a remoção do *stress*, pensa-se que estes servem como locais temporários de armazenamento e triagem de mRNA (Anderson & Kedersha, 2008). De facto, os SGs formam-se entre minutos a horas em resposta ao *stress* e desaparecem de forma igualmente rápida (NL Kedersha et al., 1999). A natureza dinâmica dos SGs depende do equilíbrio entre os seus componentes e o citoplasma.

Os SGs estão em equilíbrio dinâmico com os polissomas (N. Kedersha et al., 2000), que são agrupamentos de ribossomas citoplasmáticos com tradução ativa. Em resposta ao *stress*, os polissomas são desassociados, causando um aumento do *pool* de mRNPs não-traduzidos, o que favorece a formação de SGs (N. Kedersha et al., 2000). Por sua vez, o aumento de mRNPs associados a polissomas desfavorece a formação de SGs (N. Kedersha et al., 2000). A formação de SGs está fortemente ligada ao estado da tradução da célula, o que os distingue dos restantes grânulos de RNA (Wolozin & Ivanov, 2019).

A formação de SGs é um processo com várias etapas (Wheeler et al., 2016), recebendo sinais de diversos processos celulares, incluindo a tradução, a dinâmica do citoesqueleto e o transporte núcleo-citoplasma (Rajgor & Shanahan, 2014; Protter & Parker, 2016). Este processo pode ser iniciado por múltiplas vias, sendo tipicamente induzido pela repressão da tradução de proteínas (Thomas et al., 2011). A iniciação da tradução é principalmente regulada por duas vias de sinalização, que também regulam a dinâmica dos polissomas e SGs. Uma delas é dependente da fosforilação do fator de iniciação eucariótico 2 α (eIF2 α) e outra depende da formação do complexo do fator de iniciação eucariótico 4F (eIF4F) (Thomas et al., 2011). No entanto, a grande variedade de diferentes tipos de *stress* e de células, sugere a existência de uma rede muito mais vasta de vias de sinalização que regulam a síntese proteica e dinâmica entre SGs e polissomas.

1.2.1.2.1 - Formação canónica de grânulos de stress

A maioria das condições ou compostos que induzem a formação de SGs impedem a iniciação da tradução (Reineke et al., 2012). A formação canónica de SGs depende da fosforilação de eIF2 α , que é induzida pela fosforilação de quinases serina/treonina, específicas para diferentes tipos de *stress* (Wek et al., 2006). Isto conduz à desassociação dos

polissomas e consequente acumulação de complexos de iniciação bloqueados na tradução (N. Kedersha et al., 2002). Estes são chamados de complexos de pré-iniciação (PICs) (Wheeler et al., 2016) que recrutam RBPs e mRNAs para os SGs (NL Kedersha et al., 1999; McDonald et al., 2011) (Figura 1.4).

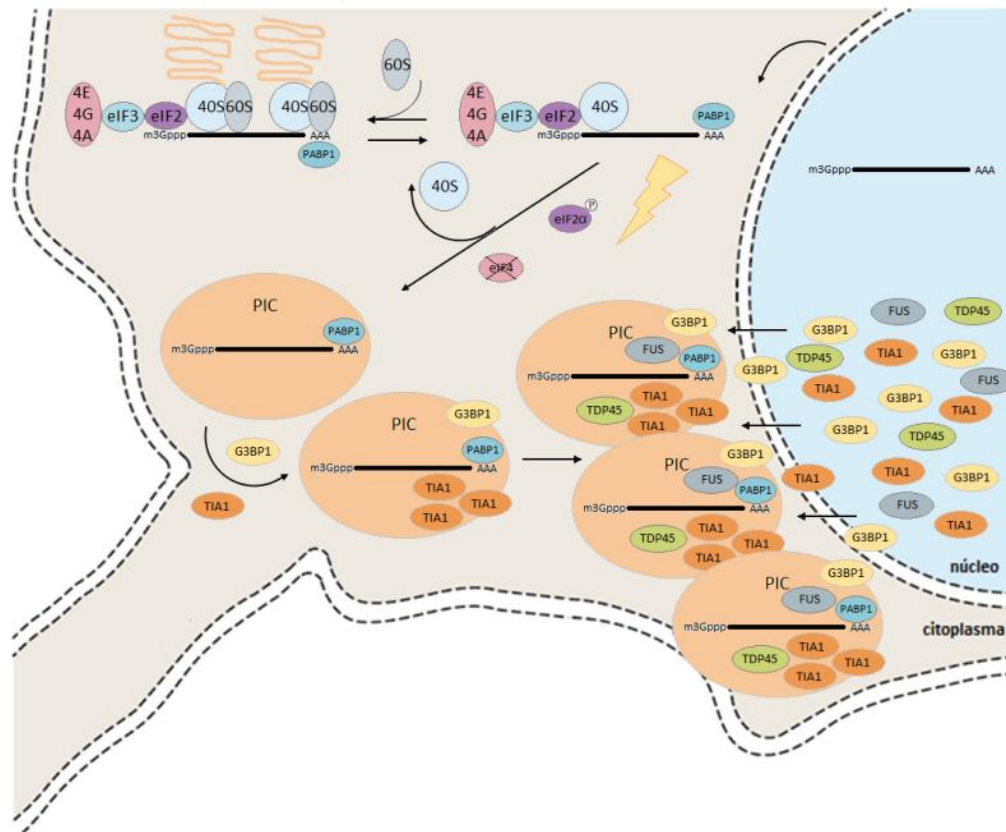


Figura 1.4 – Formação de grânulos de stress. Em situações normais, o complexo de pré-iniciação eIF4F interage com a subunidade 40S e a síntese proteica começa com a associação deste ao complexo 60S. Em caso de *stress*, dá-se a fosforilação da eIF2 α ou a inibição da formação do complexo eIF4F. Isto leva à inibição da tradução, que promove a desassociação dos polissomas e surgimento de PICs. A formação de SGs começa com o recrutamento de RBPs nucleadoras (ex.: G3BP1 e TIA1), que se associam aos transcritos de RNA. Estas RBPs acabam por estabelecer ligações com mRNA e outras RBPs secundárias (ex.: TDP43 e FUS), aumentando a complexidade destes grânulos. Baseado em (Wolozin, 2012).

O *stress* induz a translocação de muitas RBPs do núcleo dos neurónios, onde se encontram na maior parte do cérebro normal (Apicco et al., 2018), para o citoplasma (N. Kedersha et al., 2000). Durante situações de *stress*, o mRNA permanece ligado ao complexo de pré-iniciação (PICs), ligado a eIF3, poli(A) e a RBPs nucleadoras (N. Kedersha et al., 2000). Esta família de RBPs contém domínios tipo-prião e domínios ricos em poliglicina, que conferem a capacidade de se agregar reversivelmente (Gilks et al., 2004). As proteínas nucleadoras dos SGs incluem a proteína ligante da proteína ativadora da RasGTPase (G3BP1),

a tristetraprolina (TTP), antigénio intracelular de células T1 (TIA1), a proteína tipo-TIA (TIAR), a proteína do atraso mental do X frágil (FMRP), a proteína de ligação ao elemento de poliadenilação citoplasmática (CPEB), a proteína de sobrevivência do neurónio motor (SMN), a proteína de ligação a poli(A) (PABP), entre outras (N. Kedersha et al., 2000; Mazroui et al., 2002; Tourriere et al., 2003; Stoecklin et al., 2004). As RBPs nucleadoras são necessárias à condensação de PICs em SGs e atuam ao ligar-se diretamente a outros mRNAs e/ou interagindo com a maquinaria de tradução (N. Kedersha et al., 2016; Lastres-Becker et al., 2016). Outras RBPs desempenham papéis secundários ao estabelecerem ligação com mRNAs específicos, permitindo interações com os alvos de mRNA.

A formação de SGs é um processo reversível que implica interações que envolvem moléculas de RNA e proteínas. As interações essenciais que regulam a formação de SGs e respetiva persistência podem ser divididas em três classes. A primeira é a representada pelas interações estáveis e específicas proteína-proteína, ocorrendo entre domínios globulares que reconhecem parceiros de interação (Mittag & Parker, 2018). A segunda representa interações não-específicas e menos estáveis, que ocorrem normalmente entre domínios intrinsecamente desordenados (IDDs) de proteínas (Protter & Parker, 2016). Finalmente, as interações RNA-RNA resultam de sequências de mRNA expostas após a paragem da tradução (Van Treeck & Parker, 2018). Todas estas interações são importantes para a estrutura e função dos SGs, mas podem depender do tipo e duração do *stress*.

As interações não-específicas são mediadas por RBPs (N. Kedersha et al., 2013; Lin et al., 2015; Protter & Parker, 2016) e permitem formar uma estrutura que facilita o recrutamento de outras proteínas (Gilks et al., 2004; Buchan, 2014). A nucleação primária de SGs envolve RBPs que se agregam no citoplasma (Bounedjah et al., 2014), através da sua ligação com mRNAs expostos (N. Kedersha et al., 2000). São as suas sequências de baixa complexidade (LCDs) e domínios intrinsecamente desordenados (IDDs) (Kato et al., 2012; Lin et al., 2015) que, através de interações electrostáticas, promovem a separação de fase líquido-líquido (LLPS), que contribui para a formação de SGs (Lin et al., 2015; Protter & Parker, 2016) (Figura 1.5). A LLPS é um processo físico que ocorre numa solução de proteínas muito concentrada na qual a proteína se separa espontaneamente em fases estáveis e densas (Protter & Parker, 2016). A agregação das RBPs relaciona-se com a capacidade destas proteínas se ligarem ao mRNA, assim, a maior concentração de mRNA nos SGs comparada com a do citoplasma promove a agregação destas proteínas (Schwartz et al., 2013).

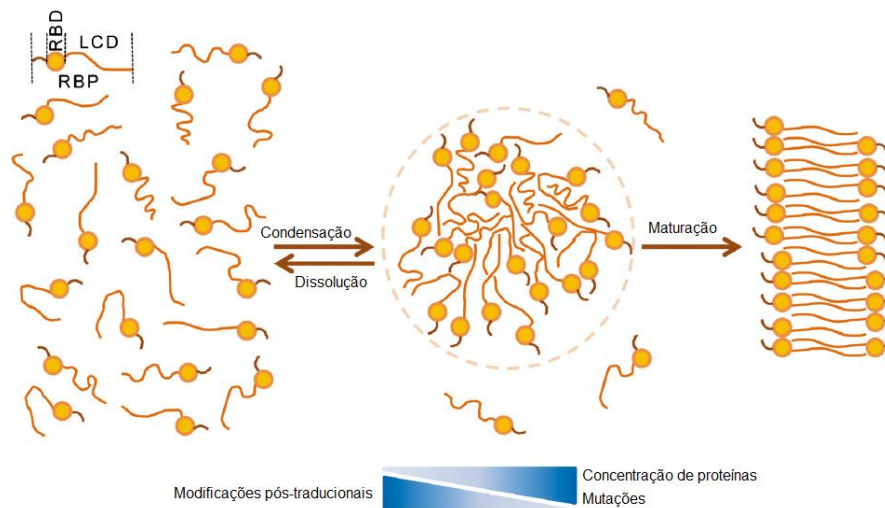


Figura 1.5 – Separação de fase líquido-líquido. As RBPs que possuem LCDs podem sofrer uma transição de um estado disperso para condensado. A maturação desta estrutura pode promover a produção de agregados fibrilares insolúveis. Diversos fatores influenciam a LLPS, incluindo PTMs, mutações nas RBPs e concentração proteica. Adaptado de (Dobra et al., 2018)

Na agregação secundária, os SGs que são inicialmente pequenos, aumentam em tamanho à medida que as RBPs se consolidam, ligando-se entre si (N. Kedersha et al., 2000). A agregação primária de RBPs com mRNAs bloqueados induz interações proteína-proteína e a ligação cruzada de proteína-mRNA, como o recrutamento de outras RBPs e proteínas de sinalização por ação da proteína de ligação poli(A) (PABP) (Anderson & Kedersha, 2008). As RBPs nucleadoras podem formar hetero-oligómeros como, por exemplo, G3BP1/TIA1 (Anderson & Kedersha, 2008). Para além destas, algumas proteínas ligadas a doenças associam-se aos SGs à medida que estes se expandem, tais como a TDP-43 (*transactive response DNA binding protein 43 kDa*), FUS (*fused in sarcoma*) e a Ataxina-2 (Atx2) (N. Kedersha et al., 2000; Anderson & Kedersha, 2008). No entanto, os SGs maturam com o tempo para incluir microRNAs, proteínas de iniciação de tradução e outras proteínas regulatórias, como as quinases e GTPases (Thomas et al., 2011; N. Kedersha et al., 2013). Ainda assim, estudos proteómicos e genéticos sugerem que só os PICs e um número limitado de RBPs específicas são essenciais para a formação de “núcleos” de SGs estáveis (Jain et al., 2016; Wheeler et al., 2017).

Recentemente, vários estudos *in vivo* sugeriram que os SGs são constituídos por um centro estável rodeado por uma superfície mais dinâmica (Wheeler et al., 2016). Pensa-se que os transcritos não-traduzidos possam atuar como plataformas que oligomerizam para formar o “núcleo” dos SGs (Molliex et al., 2015; Jain et al., 2016). Uma vez estabelecido este “núcleo”,

podem ser recrutados mais moléculas nucleadoras que servem como plataforma para a formação de estruturas periféricas dinâmicas tipo “casca”, constituídas por outras proteínas e mRNPs (Jain et al., 2016; Wheeler et al., 2016). Esta camada dinâmica, favorece a troca de constituintes entre SGs e o citoplasma circundante (Wheeler et al., 2016).

1.2.1.2.2 - Formação não-canónica de grânulos de *stress*

A principal diferença entre as vias de formação de SGs canónica e não-canónica é o modo de indução. A formação não-canónica de SGs pode depender da regulação do complexo do fator de iniciação eucariótico 4F (eIF4F). Este complexo é um ponto de controlo do início da tradução, sendo composto pelos fatores de iniciação de tradução eIF4E, eIF4G e eIF4A (N. Kedersha et al., 2002). Alterações na composição e atividade do complexo eIF4F levam à inibição da iniciação da tradução e consequente formação de PICs, que recrutam RBPs, resultando na formação de SGs (N. Kedersha et al., 2013). A ação de agentes de *stress* agudos, como selenito ou peróxido de hidrogénio, induzem esta formação não-canónica de SGs (Emara et al., 2012; Fujimura et al., 2012).

Tendo em conta a sua atividade nucleadora, a sobreexpressão de G3BP1, TIA1, TTP ou FMRP permite a formação de SGs, mesmo na ausência de *stress* (Mazroui et al., 2002; Tourriere et al., 2003; Gilks et al., 2004; Stoecklin et al., 2004). Os SGs também podem ser gerados na ausência, quer da fosforilação da eIF2 α , quer da inibição da tradução, sobre a ação da radiação UV e de proteínas nucleadores dos SGs (Mazroui et al., 2002; Tourriere et al., 2003; Gilks et al., 2004; Moutaoufik et al., 2014). De facto, quando sintetizadas em altas concentrações, muitas proteínas associadas aos SGs estabelecem interações mediadas pelos seus LCDs e IDDs (N. Kedersha et al., 2013). Por exemplo, a sobreexpressão de TIA1 conduz à formação acrescida de agregados citoplasmáticos e recrutamento de grânulos de RNA (Gilks et al., 2004). A formação de SGs também pode ser promovida por processos de oligomerização, como no caso da sobreexpressão de G3BP1 (Tourriere et al., 2003). Por outro lado, são ainda necessários estudos para que seja possível melhor compreender o mecanismo formação de SGs induzida pela radiação UV (Moutaoufik et al., 2014).

1.2.1.3 - Formação hiperativa de grânulos de *stress*

As mutações associadas a proteínas ligadas a doenças, nomeadamente expansões anormais repetidas, aumentam a tendência de agregação, o que pode conduzir a uma formação de SGs excessiva (Wolozin, 2012). Do mesmo modo, as condições de *stress* ambientais e patológicas crónicas podem levar a uma estimulação hiperativa da formação de SGs. Por exemplo, o *stress* oxidativo associado ao envelhecimento, o *stress* trófico associado à diabetes ou o *stress* físico associado a encefalopatia traumática crónica podem todos aumentar a formação de SGs, criando as condições para uma agregação patológica e irreversível (Craft, 2009; Butterfield & Dalle-Donne, 2012; Goldstein et al., 2012).

Em culturas celulares, os SGs formam-se numa questão de minutos quando estão sob um *stress* severo, desaparecendo 1-2 horas após a remoção do *stress* (NL Kedersha et al., 1999). Assim, a resposta dos SGs é necessária para lidar com *stress* transiente e desaparecer rapidamente uma vez removido o *stress* (NL Kedersha et al., 1999). A degradação de SGs pode, potencialmente, ocorrer por dissociação de IDs, por encaminhamento de alguns componentes para autofagossomas, expressão aumentada ou ativação de chaperonas, via ubiquitina-proteassoma ou, alternativamente, degradação dos constituintes dos SGs (Buchan, 2014). De facto, sabe-se muito pouco sobre o mecanismo de dispersão de SGs, mas a sua identificação é essencial no contexto das doenças neurodegenerativas, onde a formação de SGs tem tendência a ser hiperativa.

1.2.1.4 - Modificações pós-tradução e formação de grânulos de *stress*

Diversos estudos conectam modificações pós-tradução (*Post Translational Modifications* em inglês, PTMs) a componentes particulares dos SGs ou a funções especificamente ligadas a estes. A dinâmica dos SGs é altamente influenciada por múltiplas PTMs, incluindo a deacetilação, a desmetilação da arginina, a poliADP-ribosilação, O-glicosilação com N-acetil-glucosamina (O-GlcNac) e a fosforilação. Várias destas PTMs ocorrem em proteínas nucleadoras de SGs, logo espera-se que influenciem a formação de SGs. Por exemplo, a poliADP-ribosilação (Leung et al., 2011), desfosforilação (Tourriere et al., 2003; Reineke et al., 2017) e desmetilação da proteína G3BP1 promovem a formação de SGs (Tsai et al., 2016). Por sua vez, a TIA1 pode sofrer ADP-ribosilação e gerar SGs (Leung et al., 2011), mas também pode ser oxidada e inibir a formação de SGs (Arimoto-Matsuzaki et al.,

2016). Por outro lado, a modificação por O-GlcNac de proteínas ribossomais parece regular a condensação de SGs (Ohn et al., 2008).

A fosforilação de G3BP1 (Figura 1.6), TTP ou FUS interfere na formação de SGs (Tourriere et al., 2003; Reineke et al., 2017). Por exemplo, a FUS encontrada nos SGs no contexto de doenças neurológicas pode estar fosforilada, ficando menos propensa a agregar (Monahan et al., 2017). Estas alterações podem ser atribuídas, em parte, à prevenção da ligação de transportinas, que atuam como desagregases, mas também à indução da separação de fase (Guo et al., 2018; Hofweber et al., 2018; Qamar et al., 2018). Por sua vez, a inibição da fosforilação das proteínas TTP ou FUS impede o recrutamento das componentes dos SGs (Kato et al., 2012; N. Kedersha et al., 2013).

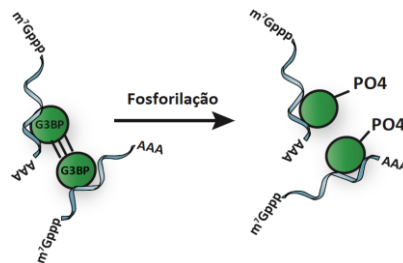


Figura 1.6 – Fosforilação de G3BP1. A fosforilação de G3BP1 inibe a sua capacidade de dimerizar, o que impede a formação de grânulos de *stress*. Adaptado de (Protter & Parker, 2016).

As PTMs presentes em proteínas que regulam a dinâmica dos SGs, como a G3BP1 e a FUS, concentram-se nos IDDs destas proteínas, podendo servir para despoletar a separação de fase dos SGs (Tsai et al., 2016; Reineke et al., 2017). De facto, recentemente foi demonstrado que as PTMs controlam a separação de fase de FUS por fosforilação e metilação (Monahan et al., 2017; Qamar et al., 2018). Outro exemplo é fosforilação de Tau, que é um indicador de doença de Alzheimer e promove a agregação proteica e separação de fase *in vitro* (Ambadipudi et al., 2017). A expressão de Tau está normalmente restrita ao axónio mas, em caso de *stress*, esta proteína é fosforilada e passa para o corpo celular e dendrites, onde pode interagir com RBPs e mRNAs (Stamer et al., 2002; Hoover et al., 2010). Esta proteína forma oligómeros e fibrilhas tóxicas, mas também tem a capacidade de acelerar a formação de SGs (Vanderweyde et al., 2016). Apesar da acetilação e ubiquitinação terem sido associadas à regulação da dinâmica dos SGs (Kwon et al., 2007; Marrone et al., 2018), ainda não foi clarificado se estes efeitos são uma consequência de modificações de proteínas nucleadoras de

SGs ou se são a consequência indireta do *stress* celular. Apesar destes avanços, continua por explorar, o mecanismo pelo qual as PTMs presentes nestas proteínas e outras presentes nas RBPs influenciam a formação e o funcionamento dos SGs.

1.2.1.5 - Grânulos de stress e neurodegeneração

Como mencionado anteriormente, os SGs são estruturas transientes que se formam e dispersam rapidamente em caso de *stress* agudo. Por sua vez, o *stress* crônico associado ao envelhecimento leva à persistência de SGs, que podem servir de plataforma para a agregação de proteínas associadas a doenças (Wolozin, 2012; Vanderweyde et al., 2013). Os SGs clássicos são complexos com a tradução inativa, contendo mRNAs, RBPs e componentes ribossomais; enquanto os SGs patológicos são inclusões que se acumulam em tecidos patológicos que contêm muitas das proteínas constituídas nestes grânulos (Wolozin & Ivanov, 2019). A relação entre inclusões patológicas que contêm marcadores de SGs e a funcionalidade dos SGs não foi ainda estudada. Mas, os defeitos na formação de SGs e sensibilidade ao *stress* são comuns numa variedade de patologias debilitantes, incluindo cancro, doenças neurodegenerativas, infeções virais, doenças autoimunes, cataratas, glaucoma, diabetes e isquemia cerebral (Merchant et al., 2009; Lachke et al., 2011; Buchan, 2014; Anderson et al., 2015; Dash et al., 2016; ME Johnson et al., 2016; Shukla & Parker, 2016).

O sistema nervoso é especialmente suscetível a episódios de *stress*, uma vez que o cérebro apresenta necessidades energéticas por volta dos 20% da energia total consumida pelo corpo humano e os neurónios têm um tempo de vida muito longo (Dobra et al., 2018). Assim, vários estudos sugerem que a formação de SGs esteja associada a diversas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, a esclerose lateral amiotrófica, a demência frontotemporal, a doença de Huntington e as ataxias espinocerebelosas (Shukla & Parker, 2016; Vanderweyde et al., 2016). A neurodegeneração está, muitas vezes, associada a uma agregação desregulada que pode levar à formação de depósitos de proteínas intra e extracelularmente (Wolozin, 2014; Shukla & Parker, 2016). Uma agregação prolongada de proteínas de SGs pode promover a formação de fibrilhas, que acabam por recrutar agregados patológicos, causando alterações na comunicação e sobrevivência de células neuronais (Vanderweyde et al., 2012; Ash et al., 2014).

Tem também sido sugerida uma relação entre os SGs e as inclusões citoplasmáticas de proteínas, presentes em diversas doenças neurodegenerativas (Tabela 1.3). Por um lado, as RBPs são integradas em grânulos dinâmicos formados maioritariamente por RNA e proteínas, no citoplasma de células expostas a *stress*. Por outro lado, as mesmas proteínas formam agregados que são insolúveis no citoplasma dos neurónios de doentes que sofrem de certas patologias neurodegenerativas. Para apoiar esta relação, já foram testadas diversas abordagens terapêuticas demonstrando que a inibição da acumulação de SGs protege contra a progressão das doenças em modelos animais de doenças neurodegenerativas (HJ Kim et al., 2014; Radford et al., 2015).

Tabela 1.3 – Semelhanças entre grânulos de *stress* e inclusões de proteínas mal-conformadas

Grânulos de <i>stress</i>	Inclusões patológicas
Formação por domínios tipo-prião e domínios RGG	Agregação por domínios tipo-prião e domínios contendo poliglicinas
Induzidos por agentes de <i>stress</i>	Presentes em patologias que envolvem <i>stress</i> do ER e/ou <i>stress</i> oxidativo
Induzidos por inibidores de proteassoma ou autofagia	Dissolução pela via ubiquitina-proteassoma ou autofágica
Agregação modelada por chaperonas	Agregação de proteínas mal-conformadas modulada por chaperonas
Contém proteínas O-glicosiladas	Contém proteínas O-glicosiladas
Dependente do microtúbulo e dineína	Dependente do microtúbulo e dineína
Formado por proteínas ubiquitinadas	Constituído por proteínas ubiquitinadas

Abreviaturas: RGG, domínios ricos em glicina; ER, retículo endoplasmático. Adaptado de (Thomas et al., 2011; Vanderweyde et al., 2013)

De facto, existem diversos aspetos dos SGs que se assemelham aos agressomas (agregados volumosos de proteínas citoplasmáticas) e agregados de proteínas mal-conformadas presentes em patologias neurodegenerativas. Estas semelhanças tornam tentadora a especulação de que os SGs e os agregados proteicos intracelulares podem interagir.

No entanto, o processo de agregação característico dos RBPs difere dos modelos convencionais de agregação proteica, uma vez que desempenham funções biológicas distintas, para além de serem reversíveis. Por outro lado, os agressomas apresentam tendência a formar inclusões singulares e volumosas, que se originam no centro organizador do microtúbulo (Johnston et al., 1998), enquanto que os SGs normalmente ocorrem em múltiplos complexos difundidos pelo citoplasma (Panas et al., 2016). Ainda assim, pode existir uma relação entre estas estruturas, porque quando os SGs se desassociam, os seus componentes podem ser direcionados para agressomas para degradação ou servir para a formação de novos SGs após uma nova exposição a *stress* (Dobra et al., 2018) (Figura 1.7).

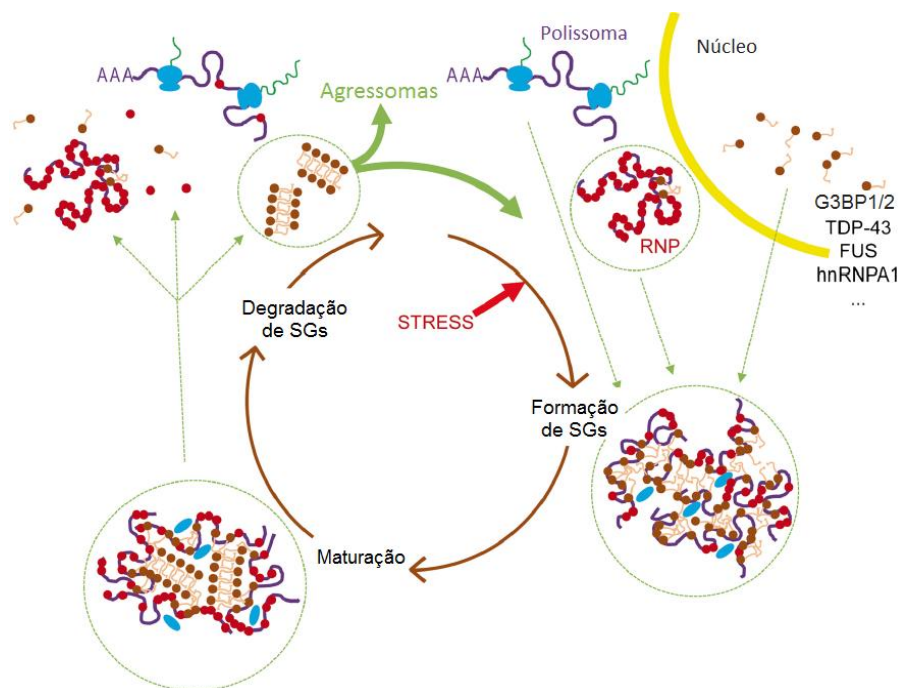


Figura 1.7 – Ciclo de formação de SGs. A formação de agregados insolúveis de RBPs, que contêm LCDs, envolve SGs e RNA. Em caso de exposição a *stress*, os polissomas são dissociados e RNAs poli-adenilados, pequenas subunidades ribossomais e RBPs são incorporados nos SGs. A maturação dos SGs pode levar à formação de centros densos constituídos por RBPs, possivelmente com uma estrutura fibrilar. Quando os SGs são desagregados, os seus componentes podem ser encaminhados para agressomas para degradação ou servir como plataformas para a formação de novos SGs. Adaptado de (Dobra et al., 2018)

A importância dos SGs para as doenças neurodegenerativas torna-se evidente, porque o processo de formação de SGs é um processo baseado na agregação biológica, que pode ser vulnerável à agregação de proteínas que se acumulam em doenças neurodegenerativas (Wolozin, 2014; Shukla & Parker, 2016). A expressão de RBPs mutadas associadas a doenças neurodegenerativas promove a agregação de SGs que, por sua vez, originam fibrilhas

associadas a estas doenças (Molliex et al., 2015; Monahan et al., 2017; Guo et al., 2018). A patofisiologia destas doenças pode surgir de uma vulnerabilidade intrínseca no metabolismo de controlo de RNA por parte das RBPs, ao coalescerem em grânulos que os tornam propensos a agregação patológicas (Wolozin & Ivanov, 2019). Assim, a resposta ao *stress* origina a formação de SGs transientes, mas os defeitos na dinâmica destes grânulos parecem acelerar a neurodegeneração (YR Li et al., 2013; Wolozin, 2014; Shukla & Parker, 2016).

Como mencionado anteriormente, estudos recentes apontam para a existência de um modelo em que os SGs são constituídos por um centro estável envolvido por uma camada mais dinâmica (Wheeler et al., 2016). Esta hipótese implica que as RBPs com LCDs estão concentradas no centro dos SGs, logo, um aumento local da concentração destas proteínas aumenta a probabilidade de que, interações proteicas levem à formação de oligómeros e fibrilhas, originando agregados citoplasmáticos patológicos (Patel et al., 2015). Assim, no caso das doenças neurodegenerativas, a acumulação citoplasmática de proteínas específicas contendo LCDs e/ou mutações, combinadas com episódios de *stress* celular podem levar à formação de centros de SGs (Molliex et al., 2015; Murakami et al., 2015; Patel et al., 2015). Estes centros facilitam a maturação de agregados insolúveis, especialmente se os mecanismos de degradação já não forem eficazes (Dobra et al., 2018). Sob estas condições, os produtos ribossomais são retidos em SGs, o que interfere com a remoção de SGs e promove a formação de grânulos anormais e persistentes (Mahboubi & Stochaj, 2017).

Passou mais de uma década desde o estabelecimento de uma relação entre a dinâmica dos SGs e a formação de agregados citoplasmáticos de RBPs em neurónios de doentes com doenças neurodegenerativas (Dobra et al., 2018). Já se conhecem múltiplos mecanismos que prejudicam a função e sobrevivência neuronal, sendo os principais a hiper-agregação, a formação de grânulos persistentes por parte de proteínas de SGs mutadas, a diminuição de formação de SGs ou falta de remoção destes grânulos. Ainda assim, continua a ser necessária uma demonstração de que a inibição seletiva da formação da SGs previne a progressão da doença em doentes (Wolozin & Ivanov, 2019). Apesar dos avanços já alcançados, ainda não é possível afirmar que os SGs são as estruturas que despoletam a nucleação e maturação de agregados de proteínas tóxicas.

1.3 - Proteínas ligantes de RNA

As proteínas ligantes de RNA (RBPs) são um grupo de proteínas que naturalmente formam agregados insolúveis, cujo material agregado pode dispersar e resolubilizar (N. Kedersha et al., 2000). Estima-se que mais de 1000 genes de mamíferos codifiquem para RBPs (Gerstberger et al., 2014), sendo mais de metade delas expressas no cérebro (Bryant & Yazdani, 2016). A maioria das RBPs ligadas a doenças neurodegenerativas, associam-se aos SGs em cultura de células. A TDP43, FUS, Ataxina-2, SMN, optineurina (OPT) e angiogenina (ANG) colocalizam-se com marcadores de SGs (TIA1, TTP e/ou G3BP1) em células expostas a *stress* (Colombrita et al., 2009; Bosco et al., 2010; Liu-Yesucevitz et al., 2010; Hart & Gitler, 2012; Murakami et al., 2015). As proteínas dos SGs como a TIA1, eIF3 e PABP também se co-localizam com achados neuropatológicos em tecidos cerebrais de doentes de Alzheimer e com esclerose lateral amiotrófica, assim como em modelos animais destas doenças (Liu-Yesucevitz et al., 2010; Vanderweyde et al., 2012).

Pouco depois da descoberta da TDP43 como a principal proteína patológica na esclerose lateral amiotrófica, provou-se que esta estava associada a mutações no gene que codifica a TDP43 (Sreedharan et al., 2008). Seguiram-se descobertas de mutações ligadas a esta patologia com outras RBPs (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009), que apoiaram o consenso crescente de que existe algum aspeto da biologia das RBPs que as podem tornar causadoras de doenças neurodegenerativas.

Atualmente, foram já identificadas mutações em genes que codificam para diferentes RBPs em vários casos de doenças neurodegenerativas hereditárias (Sreedharan et al., 2008; Kwiatkowski et al., 2009). Algumas patologias ligadas a estas mutações incluem a esclerose lateral amiotrófica, demência frontotemporal e atrofia muscular espinhal (Tabela 1.4). De facto, as mutações associadas a estas doenças ocorrem em genes que codificam para RBPs e conduzem à acumulação excessiva de SGs em células expostas a *stress* e subsequente acumulação destas proteínas no cérebro humano (Bosco et al., 2010; Liu-Yesucevitz et al., 2010; Dormann & Haass, 2011).

As mutações observadas em diversas RBPs, como na TDP43 (Neumann et al., 2006; Schwab et al., 2008; Hart & Gitler, 2012; Youmans & Wolozin, 2012), FUS (Doi et al., 2008; Kwiatkowski et al., 2009; Polymenidou & Cleveland, 2011), SMN (Corcia et al., 2009; Yamazaki et al., 2012), Atx2 (YR Li et al., 2013; Koyano et al., 2014), ANG (Thiyagarajan et al., 2012), hnRNPA1 e hnRNPA2 (HJ Kim et al., 2013), MATR3 (JO Johnson et al., 2014) e

na TIA1 (Mackenzie et al., 2017), causam todas doenças neuronais motoras. É o caso das mutações ligadas a doenças da TDP43, FUS e Atx2 que promovem a agregação. (Dormann et al., 2010; Liu-Yesucevitz et al., 2010; Hart & Gitler, 2012).

Tabela 1.4 – Algumas proteínas ligantes de RNA associadas a doenças neurodegenerativas

RBP	Doenças neurodegenerativas
TDP43	ALS, FTD, AD, HD, SCA2
TIA1	ALS, FTD
FUS	ALS, FTD
Atx2	ALS, SCA2
hnRNPA1 hnRNPA2	ALS
ANG	ALS
SMN	ALS, SMA

Abreviaturas: TIA1, antígeno intracelular de células T1; Atx2, Ataxina-2; hnRNPA1/2, ribonucleoproteína heterogênea nuclear 1/2; ANG, angiogenina; SMN, proteína de sobrevivência do neurônio motor; ALS, esclerose lateral amiotrófica; FTD, demência frontotemporal; AD, doença de Alzheimer; HD, doença de Huntington; SCA2, ataxia espinocerebelosa do tipo 2; SMA, atrofia muscular espinhal. Dados baseados nos estudos referenciados no texto.

1.3.1 - Domínios estruturais das proteínas ligantes de RNA

A família das RBPs é composta por cerca de 800 proteínas que exibem domínios estruturais conservados e funções relacionadas (Figura 1.8). Estas RBPs contêm geralmente dois tipos de domínios conservados: domínios ricos em glicina (RGG) e domínios de reconhecimento de RNA (RRM) (Birney et al., 1993). O domínio RGG é hidrofóbico e medeia a agregação reversível destas proteínas; enquanto os RRM também interferem na agregação, mas são mais importantes na regulação da ligação ao RNA (Burd & Dreyfuss, 1994).

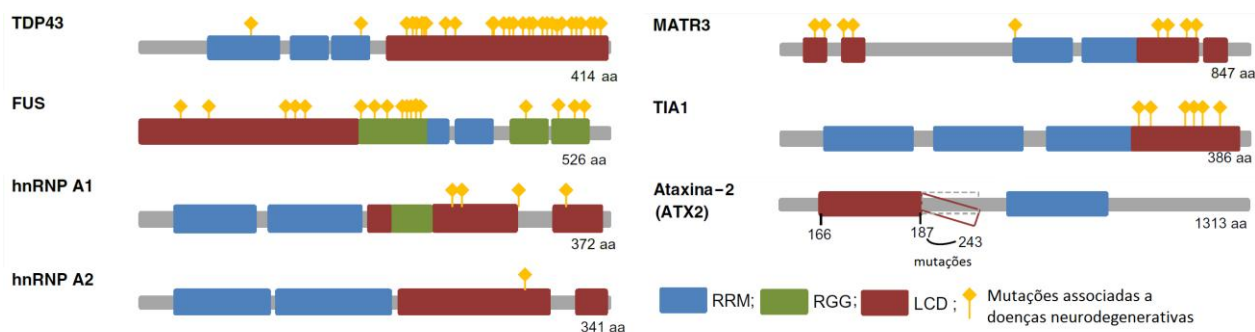


Figura 1.8 – Domínios estruturais de RBPs. Motivos estruturais de algumas RBPs e mutações associadas a doenças neurodegenerativas. Na estrutura da Ataxina-2 está representada a expansão de poliglutaminas que resulta de mutações associadas a SCA2. Adaptado de (Dobra et al., 2018).

Os domínios RRM são compostos por dois motivos, RNP1 e RNP2, separados por sequências de aminoácidos de composições e tamanhos variáveis (Kenan et al., 1991). Estes RRM tem uma especificidade ampla, uma vez que se ligam a motivos pequenos (<10bp), mas apresentam ligação incompleta das sequências (Lopez de Silanes et al., 2004; Lopez de Silanes et al., 2005; HS Kim et al., 2007). Os RRM regulam a separação de fase líquido-líquido (LLPS), em parte através da ligação ao RNA que leva ao aumento local da concentração de RNA. Do mesmo modo, estes domínios também se ligam a proteínas, como as chaperonas e transportadoras núcleo-citoplasmáticas (importina e transportina), que controlam diretamente a tendência das RBPs se agregarem (Guo et al., 2018; Hofweber et al., 2018; Qamar et al., 2018). Para além disso, os RRM servem como centros de controlo, através de modificações pós-tradução. Nestes domínios pode ocorrer a metilação da arginina através de metil-transferases que promovem a ligação de chaperonas, o que previne a separação de fase (Hofweber et al., 2018; Qamar et al., 2018).

Os RGGs são formados por agrupamentos de arginina-glicina-glicina. Os domínios RGG são encontrados em RBPs e podem conferir ligação cooperativa aos motivos de RRM (Ghisolfi et al., 1992; Burd & Dreyfuss, 1994; Mayeda et al., 1994). As regiões que contêm RGGs apresentam uma estrutura exposta indefinida devida ao aminoácido arginina, que apresenta um grande grupo polar à volta dos resíduos de glicina. Esta estrutura exposta influencia as interações com proteínas e RNA, para além de facilitar PTMs. Os RGGs também demonstraram estar envolvidos na translocação nuclear. Por exemplo, a metilação da arginina na RGG da hnRNPA2 promove a sua translocação para o núcleo (Nichols et al., 2000).

As RBPs formam grânulos de RNA, que são complexos macromoleculares que contêm RBPs e mRNAs, como referido anteriormente (Krichevsky & Kosik, 2001). Estas proteínas e transcritos são consolidados em grânulos através de interações proteína-proteína, mediadas pelos domínios RGG, e por interações proteína-mRNA, mediadas por RRM (Krichevsky & Kosik, 2001). Os SGs são inicialmente pequenos, mas aumentam em tamanho à medida que as RBPs se consolidam ao interagirem por domínios RGG. Os complexos do SGs começam por formar uma estrutura que é conceptualmente análoga a uma árvore, com os domínios de agregação RGG no centro da estrutura e mRNAs ligados por domínios RRM, a sobressair das RBPs. Os complexos de RBPs crescem com o tempo à medida que outras RBPs são recrutadas através de ligações aos transcritos associados e aos domínios de agregação de outras RBPs (Wolozin, 2012).

Muitas RBPs também possuem domínios de baixa complexidade (LCDs) que estabelecem interações fracas (Gilks et al., 2004; Bounedjah et al., 2014). Os LCDs são domínios proteicos que contêm um pequeno número de tipos diferentes de aminoácidos (Kato et al., 2012). Estes domínios localizam-se na zona central da proteína contendo, principalmente, resíduos de alanina, glicina, glutamina e prolina. Também são constituídos por resíduos de arginina e asparagina intercalados, constituindo domínios intrinsecamente desordenados (IDDs) (Prilusky et al., 2005; Toombs et al., 2012). Estes LCDs contêm aminoácidos com propensão para ter estruturas desordenadas e flexibilidade (Figura 1.9). Estas características tornam-nos altamente dinâmicos e com uma conformação diversa, permitindo interações promíscuas, mesmo entre domínios da mesma proteína (Protter et al., 2018).



Figura 1.9 – LCDs e IDD em proteínas nucleadoras de SGs. Representação à escala de exemplos de RBPs nucleadoras, assim como os respetivos LCDs e IDDs. Adaptado de (N. Kedersha et al., 2013).

A ligação das doenças neurodegenerativas aos LCDs das RBPs, surgiu inicialmente com a descoberta de que as mutações nos genes que codificam para a Ataxina-1 conduziam à formação de tratos de poliglutaminas nos LCDs destas proteínas. Isto promovia a agregação da Ataxina-1 e causava o desenvolvimento da SCA1 (Banfi et al., 1994). Observações semelhantes foram realizadas com a Ataxina-2, ligada à SCA2 (Lorenzetti et al., 1997). A maioria das RBPs com domínios LCDs, que agregam em células de doentes afetados por diversas doenças neurodegenerativas, fazem parte dos SGs (Aulas & Vande Velde, 2015). Assim, existe uma relação muito próxima entre RBPs, SGs e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

1.3.2 - Funções das proteínas ligantes de RNA

As proteínas ligantes de RNA (RBPs) desempenham múltiplas funções celulares, através da sua ligação a RNA de cadeia simples ou dupla, controlando eventos de tradução e pós-tradução (Hogan et al., 2008). As funções das RBPs estão geralmente divididas em atividades nucleares e citoplasmáticas (Figura 1.10). No núcleo, as RBPs regulam a maturação do mRNA, incluindo o *splicing* alternativo, a atividade de helicase do RNA, a alongação realizada pela RNA polimerase e a exportação nuclear (Heyd & Lynch, 2011). No citoplasma, as RBPs regulam o transporte, o silenciamento, a tradução e a degradação de RNA (Liu-Yesucevitz et al., 2011).

As RBPs e os grânulos de RNA regulam muitos aspetos da biogénese de RNA. Estas proteínas estabelecem interações dinâmicas com RNAs codificantes, não-traduzidos e não-codificantes, em complexos de ribonucleoproteínas (RNPs) (Shukla & Parker, 2016). As RBPs presentes nestes complexos de RNPs podem permanecer estavelmente ligadas ao RNA desde a síntese até à sua degradação ou associar-se temporariamente a RNAs (Lukong et al., 2008). As RBPs também podem interagir com os microRNAs, uma vez ambos regulam a síntese de proteínas (Gibbins et al., 2009; Schratt, 2009). As interações de microRNA com RBPs adicionam assim uma camada adicional de controlo regulatório.

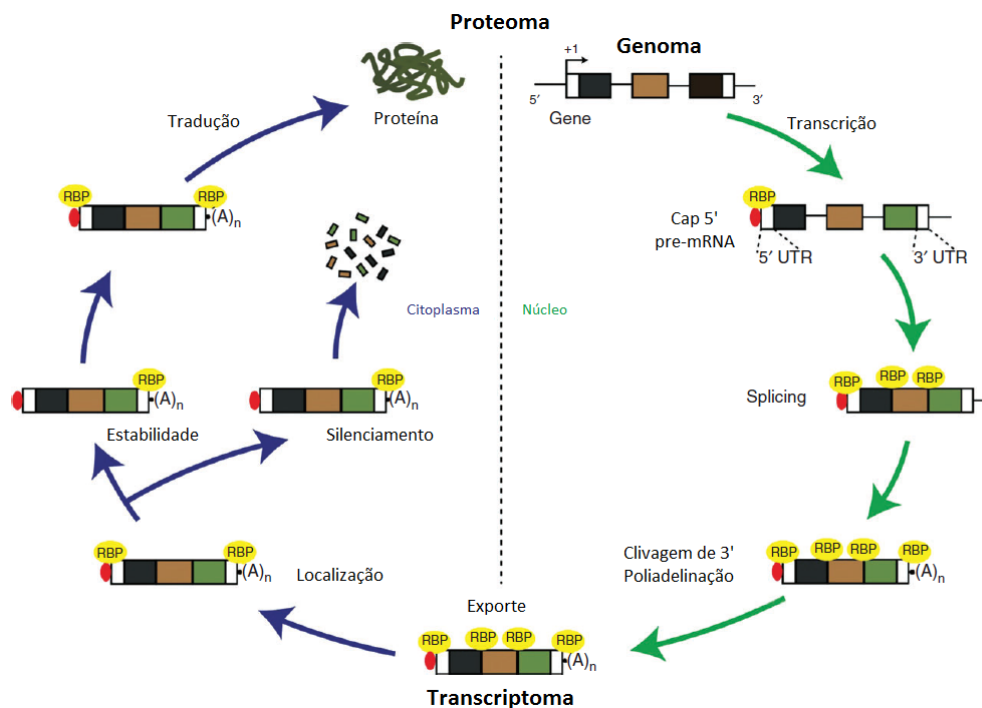


Figura 1.10 – Funções das RBPs. Controlo do ciclo de mRNA por RBPs em diversos eventos regulatórios, que se realizam entre o núcleo e o citoplasma de células eucarióticas. Adaptado de (Dash et al., 2016)

Como mencionado anteriormente, os SGs captam e silenciam transcritos não-essenciais e adotam padrões de tradução que regulam a viabilidade celular (Anderson & Kedersha, 2008; Liu-Yesucevitz et al., 2011). De facto, a regulação da tradução de mRNA e síntese proteica permite a alteração rápida do proteoma em resposta a vários sinais. A descoberta de RBPs e grânulos de RNA, assim como do seu papel na determinação do destino celular e atividade de mRNAs evidenciou a sua importância no controlo da tradução. A interação entre RBPs e grânulos de RNA controla a estabilidade e tradução de mRNAs, tendo um papel crucial na expressão proteica em condições normais ou de *stress* (Adeli, 2011).

Nem todas as RBPs são consideradas proteínas nucleadoras, porque algumas são recrutadas para os SGs em condições patológicas, como é o caso da FUS (Kato et al., 2012; Sama et al., 2013). Existem, também, RBPs como a Caprin1, que funcionam através de outras proteínas nucleadoras (N. Kedersha et al., 2016). Por outro lado, a ausência de certas RBPs, como a FMRP, parecem não alterar a formação de SGs (Gareau et al., 2013). As RBPs, TIA1 e TIAR são ambas proteínas nucleadoras, mas não possuem alguns domínios globulares importantes. Por estas razões, torna-se importante focar este tipo de estudos numa RBP em particular, denominada G3BP1.

1.4 - G3BPs

A proteína ligante do domínio SH3-domínio Ras-GAP humana (G3BP), também conhecida como proteína ligante da proteína ativadora da RasGTPase, foi identificada por imunoprecipitação (F Parker et al., 1996). A família de proteínas G3BP consiste em 3 proteínas homólogas, G3BP1, G3BP2a e G3BP2b (Kennedy et al., 2001). O primeiro membro da família das G3BPs a ser descoberto, a G3BP1, foi isolado numa análise de proteínas que se ligam ao domínio SH3 da proteína ativadora da Ras-GTPase (RasGAP) (F Parker et al., 1996).

A Ras é uma pequena GTPase responsável pela transdução de sinal, através da ativação de uma rede vasta de quinases recetoras de tirosina e outros recetores (Lowy & Willumsen, 1993). Esta atua como interruptor molecular, alternando entre o estado ativo, ligado a guanosina trifosfato (GTP) e o estado inativo ligada a guanosina difosfato (GDP) (Figura 1.11). A Ras é regulada pelas proteínas ativadoras da GTPase (GAPs), que atenuam a sinalização e os fatores de troca de nucleótidos de guanina (GEFs), que ativam a Ras por transferência do GTP. O domínio do N-terminal da RasGAP contém um domínio SH3 flanqueado por dois domínios SH2, que podem ligar fosfotirosina. Foram já identificados vários efetores associados à RasGAP por via do domínio SH2, mas são apenas conhecidas seis proteínas que se ligam à SH3, sendo três delas as G3BPs (Liu et al., 1997; Kennedy et al., 2001; Gigoux et al., 2002).

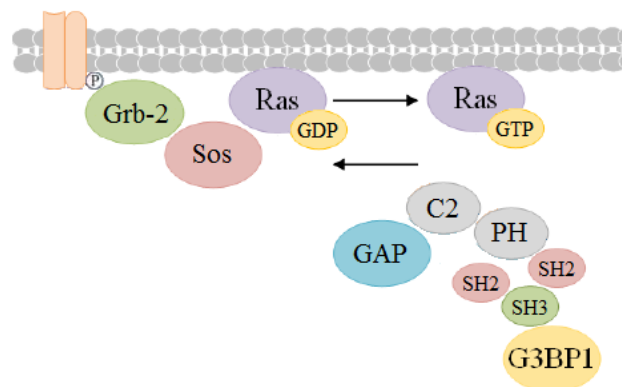


Figura 1.11 – Ciclo de ativação da proteína Ras. A Ras é ativada através da estimulação de proteínas quinases recetoras e recetores de fatores de crescimento. Esta estimulação leva à fosforilação destes recetores e recrutamento de proteínas como a Grb-2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*). Proteínas como a Sos podem atuar como GEF, controlando a ativação da Ras por transformação da Ras-GDP em Ras-GTP. A Ras ativa regula a resposta celular através de diversas proteínas efetoras e cascatas de transdução de sinal. As GAPs têm o efeito contrário, sendo a RasGAP constituída pelo domínio GAP, domínio de ligação a fosfolípidos dependente de cálcio (C2), domínio de homologia à plecstrina (PH), domínios SH2 e SH3. A proteína G3BP1 liga-se ao domínio SH3. Baseado em (Pamonsinlapatham et al., 2009).

As G3BPs foram implicadas em diversas patologias incluindo doenças neurológicas, a progressão, invasão e metástase cancerígena, assim como a sobrevivência viral. Por exemplo, as G3BPs formam SGs (Tourriere et al., 2003), apresentam atividades antivirais (Bidet et al., 2014) e desempenham funções na transição epitelial-mesenquimal (EMT), induzida pela metástase (Wei et al., 2015; H Zhang et al., 2015).

A maioria das publicações relacionadas com a G3BP1 apoiam a sua função na proliferação e/ou sobrevivência celular (Figura 1.12). Diversos estudos indicam que as G3BPs apresentam um papel na tumorigénese, uma vez que estão sobreexpressas em muitos cancros e células em proliferação (Guitard et al., 2001; Barnes et al., 2002; French et al., 2002). Por exemplo, a G3BP1 revelou estar altamente expressa em células epiteliais de pigmento retinal proliferante (Kociok et al., 1999). De facto, o *knockout* da G3BP1 em murganhos apoia a existência de uma função da G3BP1 na sobrevivência e proliferação celular (Zekri et al., 2005). Um estudo determinou que o G3BP1 é essencial para o correto crescimento e desenvolvimento embrionário através da coordenação da expressão de múltiplos transcritos reguladores do crescimento (Zekri et al., 2005). Para além disso, provou-se que a G3BP1 está envolvida na proliferação em várias linhas celulares de cancros da mama (Winslow et al., 2013). Os SGs são, também, importantes para a viabilidade das células cancerígenas e resistência ao *stress* quando as células são expostas a *stress* agudo *in vitro* (Somasekharan et al., 2015; Grabocka & Bar-Sagi, 2016).

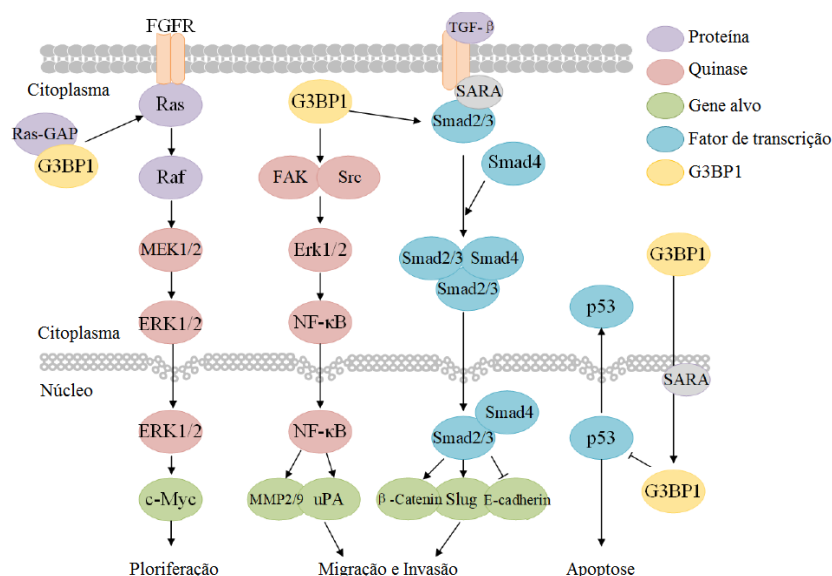


Figura 1.12 – Função da G3BP1 em vias de sinalização tumoral. A G3BP1 regula uma variedade de vias de sinalização envolvidas na oncogénese e progressão tumoral, incluindo a via da Ras, a via da quinase de adesão focal (FAK)/ coactivador do receptor de esteróides (Scr), formação de *c-Myc* e sinalização NF-κB/Her2. A G3BP1 também inibe a apoptose ao reprimir a translocação da p53. (CH Zhang et al., 2019)

Os SGs são produzidos como resposta a infecções virais e recrutam proteínas de imunidade inata (Onomoto et al., 2012). Muitos estudos revelaram que os SGs servem como plataforma para a ativação da proteína quinase R (PKR) e a helicase RIGI dsRNA (Onomoto et al., 2012; Yoo et al., 2014; Reineke et al., 2015). Alguns picornavirus incluindo o poliovírus, o vírus coxsackie e EMCV, clivam a proteína nucleadora G3BP1, para impedir a formação ou desfazer os SGs (White et al., 2007; Fung et al., 2013; Ng et al., 2013). Esta clivagem aumenta a replicação viral e conduz à morte celular de forma rápida. A expressão de mutantes de G3BP1 não-cliváveis neste contexto reduz a replicação viral e sobrevivência celular prolongada (White et al., 2007; Ng et al., 2013). De facto, as funções das G3BPs na formação de SGs, metástase de cancros e infecção viral, têm levado à investigação extensiva e exploração do papel das G3BPs em diferentes contextos celulares.

1.4.1 - Motivos estruturais dos G3BPs

A G3BP1 e a G3BP2 são codificadas pelos genes do cromossoma humano 5 e 4, respetivamente (Kennedy et al., 2001). A G3BP2b é uma isoforma de *splicing* da G3BP2a, sem 33 aminoácidos na região central (Kennedy et al., 2001)(Figura 1.13). A G3BP1 e a G3BP2 são bastante semelhantes, com 61% de identidade ao nível dos nucleótidos e 59% de identidade ao nível dos aminoácidos (French et al., 2002).

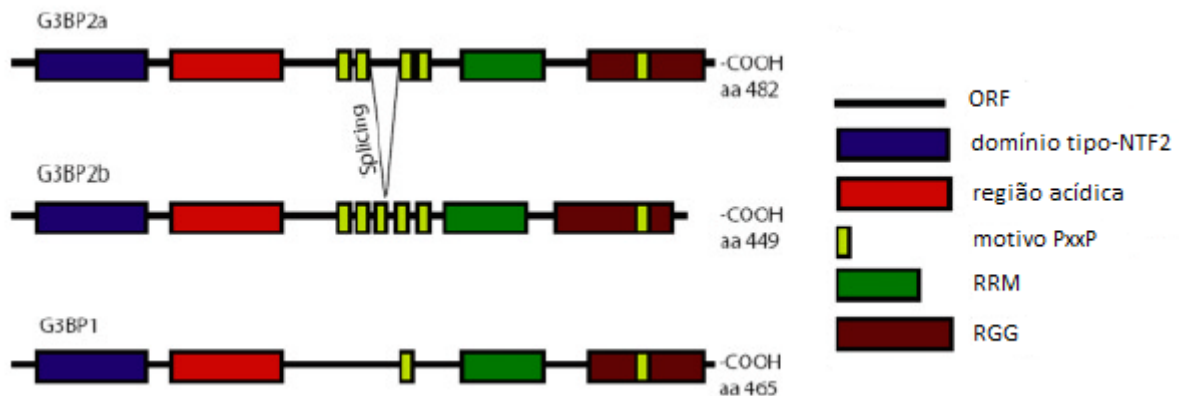


Figura 1.13 – Domínios estruturais das G3BPs. Comparação da estrutura prevista da G3BP2a, 2b e 1, pela representação linear dos domínios destas proteínas. O *splicing* alternado remove 33 aminoácidos da G3BP2a para gerar a G3BP2b com um motivo PxxP adicional. (Irvine et al., 2004).

Todas as G3BPs apresentam quatro domínios diferentes: o domínio do tipo fator de transporte nuclear 2 (NTF2) (Suyama et al., 2000), regiões acídicas, regiões ricas em prolina (PxxP), um motivo de reconhecimento de RNA (RRM) (K Nagai et al., 1995) e zonas ricas

em arginina e glicina (RGG) (Burd & Dreyfuss, 1994). Tanto a G3BP1 como G3BP2 contêm domínios globulares de interação proteína-proteína no terminal-N, como o NTF2, que é capaz de mediar a dimerização de G3BPs (Kennedy et al., 2001; Tourriere et al., 2003). O terminal-C das G3BPs é composto por dois motivos associados à ligação de RNA (N. Kedersha et al., 2013; Reineke & Lloyd, 2015), os RRM e os domínios motivos RGG (Birney et al., 1993). Estes terminais flanqueiam uma zona central composta por domínios intrinsecamente desordenados (IDDs) (N. Kedersha et al., 2013; Reineke & Lloyd, 2015).

O domínio do tipo fator de transporte nuclear 2 (NTF2) é o mais conservado, tanto entre espécies como nos membros da família G3BP em mamíferos (Suyama et al., 2000). Diversos ensaios *in vitro* de ligação de G3BP1 e G3BP2 sugerem que o domínio tipo NTF2 destas proteínas é responsável pela ligação à RasGAP (Kennedy et al., 2001). Este domínio partilha homologia quer estrutural, quer funcional com a proteína NTF2 (French et al., 2002; Vognsen et al., 2013). A NTF2 é uma pequena proteína envolvida na importação nuclear de proteínas dependente da RanGTP, através do complexo do poro nuclear (Ribbeck et al., 1998). Assim, a presença do domínio do tipo NTF2 levanta a possibilidade de que as G3BPs desempenhem um papel no transporte nuclear e, tal como a NTF2, as G3BPs também podem ligar à proteína Ran e outras GTPases pequenas (Macara, 2001).

A região central das G3BPs é composta por um número variável de motivos ricos em prolina (PxxP) (Saksela et al., 1995) e domínios acídicos (F Parker et al., 1996). Os domínios acídicos aparentam possuir uma natureza destruturada, associada a interações proteína-proteína (Kennedy et al., 2001). Do mesmo modo, os domínios ricos em prolina também estão associadas a interações proteicas (Lee et al., 1996). Os motivos PxxP representam a sequência consenso mínima para a ligação da proteína aos aminoácidos aromáticos conservados que compõem os domínios SH3 (Booker et al., 1993; Saksela et al., 1995). Apesar de ter sido primeiramente isolada a G3BP1 como proteína RasGAP ligante de domínio SH3, esta ligação foi subsequentemente demonstrada para todas as outras G3BPs (F Parker et al., 1996; Kennedy et al., 2001). A G3BP1 possui três motivos PxxP que podem limitar a sua capacidade de interagir com outras proteínas (Kay et al., 2000), comparando com a G3BP2a e a G3BP2b, que têm entre cinco e seis motivos PxxP, respetivamente (Kennedy et al., 2001).

1.4.2 - Função das G3BPs

Várias evidências sugerem que as G3BPs podem mediar alterações na expressão genética, como a resposta a diversos sinais celulares. A tendência para ligar-se a mRNAs e os domínios de interações proteicas presentes nas G3BPs levaram à especulação de que estas RBPs sejam essenciais no metabolismo dos mRNAs. Algumas descobertas importantes e os avanços feitos na área da biologia das G3BPs nas últimas décadas incluem o seu papel na estabilidade do RNA, no controlo da tradução e na formação de SGs (F Parker et al., 1996; Gallouzi et al., 1998; Tourriere et al., 2003).

Tanto a G3BP1 como a G3BP2 interagem com complexos de mRNP associados a polissomas (Atlas et al., 2004; Angenstein et al., 2005), o que pode derivar da sua função na regulação da iniciação da tradução de mRNAs e indução da formação de SGs. A G3BP1 está envolvida na regulação de vários RNAs celulares, incluindo mRNAs e microRNAs (miRNAs). A função desta RBP no metabolismo de RNA depende da natureza contextual, com estudos a indicar que transcritos específicos são controlados de forma diferente conforme o tipo celular e o estímulo (Alam & Kennedy, 2019).

A primeira interação reportada para a G3BP1 foi com o mRNA da *c-MYC* (Gallouzi et al., 1998; Tourriere et al., 2001). Neste estudo, a G3BP1 exibia atividade de endonuclease *in vitro*, de uma forma dependente da fosforilação, clivando a 3'-UTR do mRNA da *c-MYC*, apesar da ausência de qualquer domínio de ribonuclease identificáveis (Gallouzi et al., 1998; Tourriere et al., 2001). No entanto, a análise *in vivo* não suportou estas descobertas (Zekri et al., 2005). Também se descobriu que a G3BP1 desempenha um papel na estabilização de mRNAs, incluindo os transcritos de tau (Atlas et al., 2004) e CDK7 (Chen et al., 2019). A G3BP1 liga-se ao 3'-UTR da β -F1ATPase e impede a tradução, evidenciando um papel da G3BP1 durante a progressão do cancro (Ortega et al., 2010). Apesar da grande homologia partilhada com a G3BP1, a G3BP2 não aparenta ter um papel significativo no metabolismo do RNA, sendo que ainda só foi identificado um alvo para a G3BP2, chamado *SART3* (Gupta et al., 2017). No entanto, recentemente foi reportado que a G3BP1, a G3BP2 e a proteína Caprin1 partilham um papel na tradução de genes estimulados por interferões (ISGs) (Alam & Kennedy, 2019). A G3BP1 está, também, envolvida no processamento de diversos miRNAs, parecendo atuar como inibidor da maturação de pré-miRNAs-alvo ao ligar-se a estes (Kwok et al., 2017; Hong et al., 2018).

A regulação de transcritos ligados ao G3BP1 pode ser regulada e dependente de PTMs da G3BP1 e a respetiva associação com outras proteínas. A G3BP1 é altamente fosforilada no resíduo serina-149 (Ser149) em células quiescentes e desfosforilada em células estimuladas por fatores de crescimento (Gallouzi et al., 1998). Na sua forma fosforilada, a G3BP1 apresenta atividade de endoribonuclease, enquanto a G3BP1 não-fosforilada parece regular a proliferação celular, o que sugere que o estado de fosforilação da G3BP1 pode funcionar como sensor do crescimento celular (Gallouzi et al., 1998; Tourriere et al., 2001). Assim, a G3BP1 fosforilada conduz à degradação de mRNAs ligados ao crescimento e, assim, reduz a proliferação celular (Gallouzi et al., 1998). Por outro lado, pode permitir a acumulação de transcritos envolvidos na regulação do ciclo celular, como do *c-MYC* (Tourriere et al., 2001).

As G3BPs são também muito importantes no desenvolvimento embrionário, sendo o seu *knockout* letal (Tourriere et al., 2003). A inativação da G3BP1 em murganhos provou que tanto o desenvolvimento e sobrevivência são criticamente dependentes dos níveis de G3BP1, uma vez que as mutações homozigóticas nulas da G3BP1 em murganhos induzem letalidade embrionária (Zekri et al., 2005). No entanto, já foram gerados murganhos homozigóticos viáveis *knockout* para a G3BP1 (Martin et al., 2013). Estes murganhos demonstraram defeitos comportamentais ligados ao sistema nervoso central associados ao fenótipo de ataxia. Assim, a deficiência de G3BP1 conduz a alterações na plasticidade neuronal e homeostasia do cálcio, estabelecendo uma relação direta entre a formação de SGs e doenças neurodegenerativas (Martin et al., 2013). No entanto, ainda não se conhece o mecanismo pelo qual a G3BP1 medeia estas funções no cérebro.

1.4.3 - G3BPs e a formação de grânulos de *stress*

Nem todos os SGs contêm G3BPs, o que parece depender do *stress* ambiental e do tipo celular, mas tanto a G3BP1 como a G3BP2 co-localizam em SGs quando as células são sujeitas a *stress* (Kobayashi et al., 2012). A depleção de G3BP1 e G3BP2 impede a condensação dos SGs sob condições de *stress* (Matsuki et al., 2013). Isto sugere que interações específicas proteína-proteína destas proteínas são importantes para a formação de SGs.

Durante o *stress* tanto a G3BP1, como a G3BP2 encontram-se nos SGs induzidos por eIF2 α (Tourriere et al., 2003), mas também apresentam potencial para induzir SGs de forma independente (Matsuki et al., 2013). A G3BP1 é a proteína nucleadora melhor estudada,

sendo capaz de induzir a formação de SGs se for sobreexpressa, assim como induzir a fosforilação de eIF2 α (Reineke et al., 2012; Reineke et al., 2015; N. Kedersha et al., 2016). Em alguns sistemas, a inativação da G3BP1 pode impedir a formação de SGs (Somasekharan et al., 2015; Tsai et al., 2016). De facto, uma das estratégias mais bem aceites para a inativação dos SGs é a diminuição das proteínas nucleadoras G3BP1 e G3BP2 (Matsuki et al., 2013; N. Kedersha et al., 2016; Reineke et al., 2017).

A formação de SGs induzida por G3BPs também é independente da fosforilação do eIF2 α , sendo os G3BPs recrutados para os SGs de uma forma dependente da desfosforilação (Tourriere et al., 2003). Existem estudos que comprovam que a estimulação com arsenito de sódio leva à desfosforilação de G3BPs na serina-149 (Ser149), com a consequente formação de SGs tanto em células de mamíferos (Tourriere et al., 2003; N. Kedersha et al., 2016) como em células de *Drosophila* (Aguilera-Gomez et al., 2017).

A disposição dos seus domínios proteicos sugere um modelo onde a G3BP1 e G3BP2 pode manter a união dos SGs ao interagir com proteínas dos SGs numa extremidade e com RNA na outra. Esta propriedade aumentou o interesse na identificação de proteínas adicionais, com as quais estas duas proteínas nucleadoras dos SGs pudessem interagir. Então, estudos subsequentes demonstraram que, para além da homo- e hétero-dimerização, a G3BP1 e a G3BP2 interagem com a protease ubiquitina-específica 10 (USP10) e Caprin1 (Soncini et al., 2001; Solomon et al., 2007; Reineke et al., 2015; N. Kedersha et al., 2016).

A G3BP1 interage ainda com muitos outros componentes dos SGs. Por exemplo, liga-se à histona deacetilase 6 (HDAC6) e sirtuina 6 (SIRT6), cuja atividade enzimática é necessária à produção de SGs (Kwon et al., 2007; Jedrusik-Bode et al., 2013). A interação da G3BP1 com a Caprin1 estimula a produção de SGs (N. Kedersha et al., 2016). Por sua vez, a ligação com a USP10 inibe a formação de SGs (N. Kedersha et al., 2016). Ao mesmo tempo, a metilação de G3BP1 pode inibir a formação de SGs (Tsai et al., 2016).

O processo de maturação secundária dos SGs é uma função citoplasmática essencial da TDP43 (McDonald et al., 2011). No entanto, para além de contribuir para a formação e manutenção de SGs em resposta a *stress* oxidativo, a TDP43 também regula de forma específica os níveis de mRNA das G3BPs e maturação de SGs contendo G3BPs (McDonald et al., 2011). A TDP43 regula os SGs através da regulação diferencial de G3BP1 e TIA1, através da mediação da agregação da TIA1, bem como dos níveis de mRNA da G3BP1 (McDonald et al., 2011). O *knockdown* da TDP43 atrasa a formação de SGs através do

aumento dos níveis de TIA1 e diminuição dos níveis de G3BP1 (McDonald et al., 2011). Interessantemente, um estudo examinou os efeitos da redução dos níveis de Atx2 em modelos animais de esclerose lateral amiotrófica com base na sobreexpressão de TDP43 (Becker et al., 2017). No entanto, a sobreexpressão de TDP43 é tóxica em muitos tipos de células, mesmo na ausência de agregação, tornando-se por tal difícil de estudar.

1.4.4 - G3BPs e a atividade mediada pela ubiquitina

A cinética é um aspeto crítico no envolvimento das proteases ubiquitina-específicas (USPs) na formação de SGs. As RBPs nucleadoras iniciam a formação de SGs, que continuam a crescer à medida que vão incorporando outras RBPs. No entanto, a persistência de SGs pode permitir que outras proteínas interajam com os SGs, mas num ritmo mais lento e de forma anormal. Isto pode desencadear a ubiquitinação de SGs, interações não específicas dos SGs com o sistema autofágico ou contribuir para a disfunção de proteínas pró-apoptóticas (Eisinger-Mathason et al., 2008).

A degradação proteica mediada pela ubiquitina é uma estratégia fundamental utilizada pelas células na regulação proteica. Este processo envolve enzimas ubiquitinantes, que adicionam cadeias de poliubiquitinas a resíduos de lisina, presentes em substratos que são alvo de degradação. Do mesmo modo, existem enzimas que catalisam a remoção de ubiquitina, contribuindo para outro nível de regulação. Estas proteínas, as USPs, compõem uma família de proteases com mais de 60 proteínas e são reguladores de uma variedade de processos biológicos (Ciechanover et al., 2000; Hicke, 2001).

O primeiro caso reportado da interação entre G3BP1 e USP10 foi descrito utilizando um sistema de duplo-híbrido de levedura e subsequentemente confirmado em células humanas (Soncini et al., 2001). Neste estudo, a G3BP1 inibia a atividade de desubiquitinase da USP10 *in vitro* (Soncini et al., 2001). Subsequentemente, descobriu-se que o USP10 necessitava da G3BP1 para formar um complexo desubiquitinante *in vivo* (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b). Mais tarde, apurou-se que a interação de USP10 com G3BP1 envolve o motivo FGDF do USP10 que se liga ao domínio tipo NTF2 no terminal-N do G3BP1 (Panas et al., 2015; N. Kedersha et al., 2016). Esta ligação inibe a condensação de SGs em resposta a formas de *stress* específicas (Panas et al., 2015; N. Kedersha et al., 2016). No entanto, a Caprin1 compete com a USP10 para a ligação à G3BP1, favorecendo a condensação de SGs (N. Kedersha et al., 2016).

Diversos estudos demonstraram que a G3BP1 apresenta funções de degradação do mRNA, quer na ubiquitinação, quer envolvendo diretamente o proteassoma. Como mencionado anteriormente, a G3BP1 foi descrita como uma endoribonuclease, apoiando a ideia de que está implicada na degradação de mRNA (Gallouzi et al., 1998; Tourriere et al., 2001). Ainda assim, é desconhecido se o envolvimento da G3BP1 no metabolismo da ubiquitina está ligado ao seu envolvimento no metabolismo do RNA ou outras atividades mediadas pela ubiquitina, como a transdução de sinal.

1.4.5 - Implicação da G3BP1 na SCA2 e SCA3/MJD

Considerando as funções da G3BP1 e a sua implicação no contexto da agregação proteica regulada, é importante explorar a sua ação nas doenças de poliglutaminas, que são caracterizadas por uma agregação patológica. Tendo como modelos destas doenças a SCA2 e SCA3/MJD, é fundamental entender o modo como a indução dos SGs pode influenciar as proteínas causadoras destas patologias: Atx2 e Atx3, respetivamente. Neste sentido, um estudo anterior do nosso laboratório realizou uma série de estudos com o objetivo de avaliar o efeito da sobreexpressão de G3BP1 nos níveis e agregação de Atx2 e Atx3 (Tomé, 2016).

Por exemplo, estudos *in vitro* em células de neuroblastoma de murganho (Neuro2A) revelaram que a sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma diminuição significativa dos níveis das proteínas Atx2 e Atx3, assim como o número de agregados de cada uma destas proteínas (Tomé, 2016).

As experiências *in vivo* da sobreexpressão de G3BP1 no modelo lentiviral de murganhos SCA3/MJD demonstraram uma redução significativa dos agregados de ubiquitina (Figura 1.14-A,B,C) e uma preservação do marcador neuronal DARPP-32 (Figura 1.14-D,E,F) (Tomé, 2016). Estes e outros resultados sugerem um efeito neuroprotetor do G3BP1. Como tal, torna-se fundamental continuar a investigar o impacto do G3BP1 em modelos *in vivo* para estas doenças, nomeadamente transgénicos.

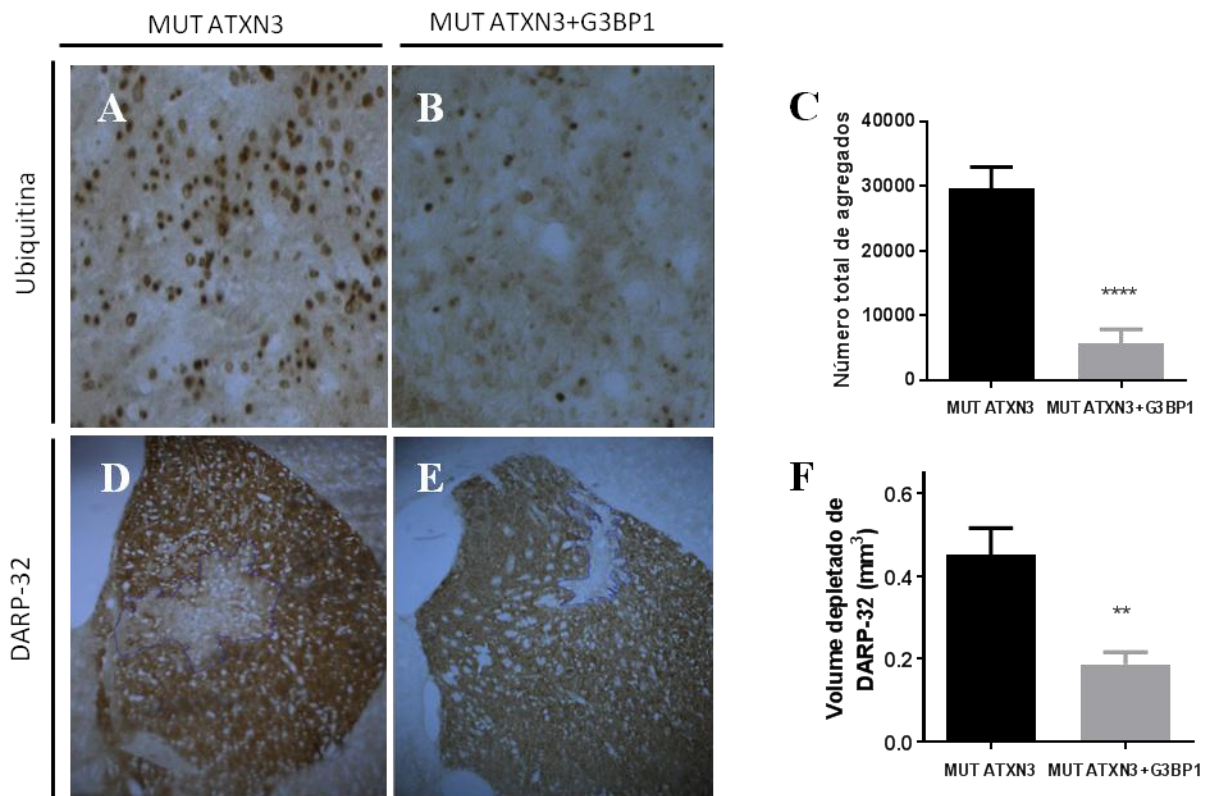


Figura 1.14 – Redução da neuropatologia no modelo lentiviral de murganhos SCA3/MJD pela sobreexpressão de G3BP1. Vetores lentivirais codificando para a Atx mutada com 72 glutaminas (A,D) e G3BP1 (B,E) foram co-injetados no estriado de murganhos C57/BI6 de 8 semanas de idade. Marcação imunohistoquímica para inclusões de Atx3 ubiquitinadas (A-B) e perda neuronal (DARP-32) (D-E). Quantificação absoluta do número de agregados de Atx3 mutada (C) e quantificação da perda neuronal (F) através da perda de volume neuronal (mm³), 4 semanas após injeção. Os valores para agregados de ubiquitina estão representados como médias \pm SEM, $n=6$ para controlos e $n=8$ para condições de G3BP1. **** $P<0.0001$ (*Unpaired Student's t-test*). Os valores para a perda de volume neuronal estão representados como médias \pm SEM. ** $P<0.01$ (*Paired Student's t-test*). Adaptado de Sandra Tomé, 2016 em “Insights into the role of stress granules in spinocerebellar ataxias”.

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste projeto é investigar o impacto da sobreexpressão de G3BP1, como estratégia terapêutica, num modelo de murganho transgênico SCA3/MDJ Q69 (Torashima et al., 2008). A partir deste objetivo genérico, diversos objetivos específicos foram delineados:

- Investigar se a sobreexpressão de G3BP1 é capaz de aliviar os défices motores neste modelo transgênico: testes de comportamento motor;
- Avaliar se a sobreexpressão de G3BP1 é capaz de resgatar a neuropatologia nos animais transgênicos: análise de agregados de ataxina-3 mutada e células de Purkinje.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais e manutenção

Neste estudo, foram utilizados 21 murganhos transgênicos SCA3/MDJ Q69 (Torashima et al., 2008), provenientes de uma colônia estabelecida no biotério do CBMR/UAlg, a partir de animais provenientes do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) da Universidade de Coimbra. Machos heterozigóticos (+/-) foram cruzados com fêmeas C57BL/6 *wild-type* para a obtenção dos animais transgênicos utilizados neste estudo e na manutenção da colônia (Ramirez et al., 2008; Oue et al., 2009). Os animais não transgênicos resultantes destes cruzamentos foram também utilizados como controlos adicionais nas nossas experiências.

Estes murganhos transgênicos SCA3/MDJ Q69 (C57BL/6 *background*) sobreexpressam a *ATXN3* humana truncada no terminal-N, contendo 69 repetições de CAG (Figura 3.1). No terminal-N, está também presente marcador da hemaglutinina (HA), especialmente direcionado para as células de Purkinje do cerebelo através do promotor L7 (Oue et al., 2009). O fragmento da *ATXN3* truncado não inclui o domínio Josephin e dois motivos que interagem com a ubiquitina (UIMs). Assim, a proteína consiste num segmento de 69 poliglutaminas com apenas 4 aminoácidos no terminal-N e 42 aminoácidos no seu terminal-C.

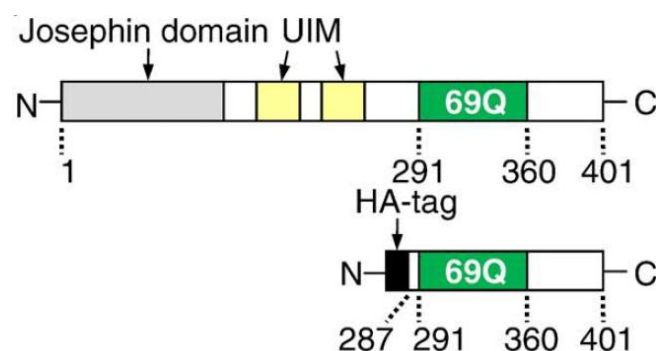


Figura 3.1 – Construção utilizada para gerar murganhos com SCA3/MDJ que apresentam acumulação de poliglutaminas nas células de Purkinje. O esquema representa a proteína Ataxina-3 *wild-type* e truncada com poliglutaminas anormalmente expandidas. (Torashima et al., 2008; Oue et al., 2009).

Os murganhos foram alojados numa sala com temperatura controlada e mantidos num ciclo de 12h de luz/escuro. A ração e água foram disponibilizadas *ad libitum*. As experiências

foram executadas de acordo com a diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. Os investigadores receberam treino adequado (curso certificado FELASA) e certificação para realizar experiências das autoridades portuguesas (Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, DGAV). O projeto e procedimentos efetuados foram devidamente aprovados pela DGAV, no projeto “Neuropath”, referência 421/2019 (Investigador Responsável: Professor Doutor Clévio Nóbrega).

O presente estudo utilizou 4 grupos de animais: murganhos SCA3+G3BP1 (murganhos transgênicos injetados com G3BP1, $n=7$), murganhos SCA3+GFP (murganhos transgênicos injetados com GFP, $n=7$), murganhos SCA3 (murganhos transgênicos não-injetados, $n=7$) e murganhos *wild-type* ($n=26$). Estes grupos incluem animais de ambos os géneros.

3.2 - Genotipagem

O genótipo foi confirmado através de uma reação em cadeia de polimerase (PCR), realizada por extração genómica de furos das orelhas dos murganhos. As amostras biológicas recolhidas foram digeridas por ação da Proteinase K e o DNA foi purificado utilizando o *Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit* de acordo com as instruções do fornecedor (#K0721, #K0722).

O transgene humano de SCA3/MDJ Q69 foi amplificado utilizando os seguintes *primers*: *Atx3*: *forward*=ATG TAC CCA TAC GAT GTT CC; *reverse*=CTA GCG AGG GAA TGA AGA AT. A amplificação foi realizada em 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto num termociclador (*C1000 Touch™, Bio-Rad*). Como controlo da reação foi, também, amplificada a região genómica da β -actina, uma proteína ubíqua, através dos seguintes *primers*: β -actina: *forward*=GGA GAC GGG GTC ACC CAC AC; *reverse*=AGC CTC AGG GCA TCG GAA CC. O DNA amplificado foi separado por eletroforese num gel de 1% de agarose durante 45-60 minutos e visualizado com *GreenSafe* utilizando *software* de imagem *BioRad*. A identificação de animais transgênicos foi possível pela visualização de uma banda de 450 bp correspondente à presença do transgene *ATX3/MJD* amplificado.

3.3 - Desenho de plasmídeo LV e produção de vetor

Os vetores lentivirais codificando para a proteína G3BP1 (LV-G3BP1) foram produzidos em células HEK 293T usando um sistema de 4 de plasmídeos, como descrito anteriormente (Hottinger et al., 2000). As partículas lentivirais foram produzidas e ressuspensas em (PBS contendo 1% de BSA). Os *stocks* foram conservados a -80 °C até à sua utilização. Esta produção foi efetuada pela ViraVector, Coimbra, Portugal.

3.4 - Injeções estereotáxicas no cerebelo dos murganhos

Para a injeção estereotáxica de vetores lentivirais, foram descongelados em gelo *stocks* virais concentrados e ressuspensos por *spinning*. Os murganhos transgênicos SCA3/MDJ Q69 com idades entre 4 a 5 semanas foram anestesiados com com cerca de 2 ml/kg de uma mistura de cetamina (100 mg/ml, Nimatek, Dechra) e medetomidina (1 mg/ml, Domtor®, Ecuphar) por injeção intraperitoneal. Para cada animal foram administrados estereotáxicamente, numa única injeção, 1000 ng/μl de vetores lentivirais codificando para a G3BP1 (LV-G3BP1) ou para GFP (LV-GFP), num volume total de 2 μl. Esta injeção foi realizada utilizando uma seringa Hamilton (Hamilton Reno, NV, EUA), a 0,2 μl/min por ação de um injetor automático (Stoelting Co., Wood Dale, EUA), no cerebelo dos murganhos nas seguintes coordenadas (em relação ao ponto Lambda): $x=-2$, $y=0$, $z=-2,8$. A agulha da seringa foi lavada entre injeções. A pele dos murganhos foi fechada com sutura 6-0 Prolene® (Ethicon, Johnson and Johnson, Bruxelas, Bélgica). De seguida, os murganhos foram injetados com cerca de 0,5 ml/kg de um agente reversor da anestesia, antipamezol (5 mg/ml, Antisedan®, Esteve).

3.5 - Testes comportamentais

De modo a avaliar o impacto da sobreexpressão de G3BP1 no fenótipo motor os murganhos foram treinados num conjunto de testes motores, começando às 5-6 semanas de idade, desde 1-2 dia antes da injeção estereotáxica dos murganhos transgênicos, repetindo os testes a cada 3 semanas (Figura 3.2). Estes testes comportamentais duram até 9 semanas após injeção, realizando um total de 4 testes. Os testes comportamentais realizados incluem teste de *rotarod*, teste de equilíbrio em varão, teste de natação e teste de pegadas.

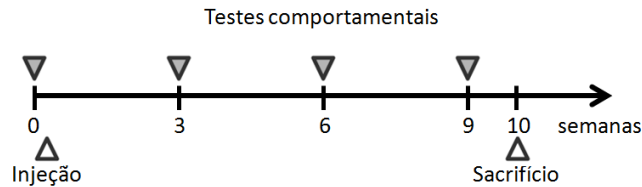


Figura 3.2 – Linha cronológica experimental. Os testes comportamentais iniciaram 1-2 dias antes da injeção de LV-G3BP1 em murganhos transgênicos com 5-6 semanas, sendo repetidos a cada 3 semanas. Os murganhos foram sacrificados às 10 semanas após injeção para processamento histológico.

3.5.1 - Teste *rotarod*

A coordenação motora e equilíbrio foram avaliados com um aparelho de *rotarod* (*Ugo Basile S.R.L.*). Os murganhos foram colocados numa roda do *rotarod* a uma velocidade constante de 5 rotações por minuto (5 rpm) por um máximo de 5 minutos, sendo registada a latência em cair (o intervalo de tempo em que se mantêm na roda). Os murganhos realizaram 5 ensaios em cada ponto da experiência, com um descanso de 15-20 minutos entre ensaios. Para a análise, foi utilizada a média da latência em cair dos 5 ensaios.

3.5.2 - Teste de equilíbrio (em barras)

A coordenação motora e equilíbrio foram avaliados de forma mais sensível, ao utilizar um teste de equilíbrio em barras. Após um treino inicial, os murganhos foram posicionados numa extremidade para atravessar (55 cm) de uma barra retangular de (1,8 cm de largura) e uma barra quadrangular de (1 cm de largura) de maneira a chegar a uma caixa de abrigo. Foram medidos os intervalos de tempo que os murganhos demoravam a atravessar os varões em 3 ensaios para cada tipo, intercalados com 15 minutos de descanso entre cada ensaio. Registraram-se, também, os casos em que os murganhos não conseguiam atravessar as barras.

3.5.3 - Teste de natação

A coordenação motora dos murganhos na locomoção voluntária foi avaliada através de um teste de natação. No teste de natação os murganhos foram largados numa extremidade de tanque de vidro (100x10,5x20 cm) preenchido com água à temperatura ambiente, até subirem para uma plataforma colocada no lado oposto. Foi registada a latência em navegar ao longo do tanque (intervalo de tempo desde que foram largados na água e atingiram a plataforma).

Após um período de aprendizagem, foram realizados 3 ensaios, com períodos de 15 min de descanso entre cada ensaio. Para análise estatística, foi calculada a latência média dos 3 ensaios.

3.5.4 - Teste de pegadas

O teste de pegadas foi usado para avaliar a marcha de murganhos. Para tal, pintaram-se as patas dianteiras e traseiras com tinta não-tóxica vermelha e azul, respetivamente. Os murganhos foram posicionados numa pista de caminhada (com paredes de 20 cm de altura) e caminharam ao longo de uma folha de papel branco com 100 cm de comprimento e 11 cm de largura.

Os padrões de pegadas foram analisados para a distância entre pegadas sequenciais de membros dianteiros e traseiros, medida ortogonalmente em relação á direção da marcha (*frontal* e *hind stride*). Foi, também, registada a largura da passada medida como a distância entre o centro da pegada traseira e o centro da pegada traseira seguinte (*hind base*) e o mesmo para as pegadas dianteiras (*frontal base*). Estes valores foram determinados pela medição da distância perpendicular de um determinado passo em relação a uma linha que conecta o passo precedente e procedente oposto. A distância entre pegada dianteira direita e a pegada traseira (*right overlap*) também foi obtida, assim como para os pares de pegadas esquerdas (*left overlap*). Estes dados foram avaliados ao longo de sequências de 6 passos consecutivos (de modo a realizar 5 medidas), excluindo pegadas realizadas no início e fim da marcha.

3.6 - Processamento histológico de amostras de cérebro de murganho

Os murganhos foram sacrificados às 15-16 semanas de idade. O sacrifício decorreu após uma *overdose* de uma mistura de cetamina (100 mg/ml, Nimatek, Dechra) e medetomidina (1 mg/ml, Domtor®, Ecuphar). Os murganhos foram perfundidos transcardialmente com paraformaldeído (PFA) 4% antes da remoção do cérebro. Após a remoção, os cérebros foram fixados em 4% de paraformaldeído (PFA) (Fluka, Sigma) em PBS 0,1 M e conservados a 4°C durante 48 horas. Após, os mesmos foram incubados numa solução de 20% de sacarose/0,1 M PBS por 2-3 dias a 4°C. Após o período de incubação, os cérebros permaneceram conservados a -80 °C até análise histológica. Foram recolhidas secções sagitais de 30 µm dos cérebros dos animais de forma a coletar o cerebelo por inteiro,

utilizando um micrótomo criostato (Cryostar NX50, Thermo Scientific). As secções foram conservadas a 4°C, submersas em PBS com azida de sódio a 1% até à próxima utilização.

3.7 - Imunohistoquímica

O processo de imunohistoquímica em fluorescência foi iniciado por uma lavagem inicial das secções com PBS 1x, seguida do bloqueio das secções em soro normal de cabra a 10% (NGS, Gibco), diluído em PBS com 0,1% de TritonX™ X-100 (Fischer Chemical) por 1h à temperatura ambiente. De seguida as secções foram incubadas com os anticorpos primários anti-calbindina D-28K (rato, Sigma) e anti-HA (coelho, Abcam) numa diluição de 1:1000 em solução de bloqueio, deixando *overnight* a 4°C. Após 3 lavagens as secções foram incubadas com os respetivos anticorpos de cabra conjugados a Alexa Fluor secundários fluorescentes (Invitrogen) 594 e 488, numa diluição de 1:250 em solução de bloqueio, por 2h à temperatura ambiente. Seguiram-se outras 3 lavagens com a subsequente montagem das secções com meio *Fluoromount-G Mounting Medium* (Invitrogen) incluindo 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) em lâminas de microscópio gelatinadas e conservação a 4°C.

3.8 - Análise quantitativa de agregados e células de Purkinje

A quantificação das inclusões de Ataxina-3 marcadas por HA e das células de Purkinje foi realizada pela análise de 8 secções sagitais dispostas ao longo da extensão lateral do cerebelo de cada animal, com uma distância de 240µm entre cada secção. Estas secções foram visualizadas utilizando o microscópio Axio Imager Z2 com o *software* Axio Vision 4.8.2. Foram obtidas várias fotografias com a objetiva de 20x para cada lóbulo cerebelar. A análise quantitativa dos agregados neuronais e células de Purkinje foi realizada através do *software* ImageJ® 1.52p (Wayne Rasband). Foram selecionadas secções correspondentes à mesma região cerebral para cada animal, como descrito anteriormente. Para cada animal foi quantificado o número total de agregados e células de Purkinje por lóbulo. Os resultados representam o valor médio do número de agregados ou células de Purkinje quantificados nas secções selecionadas de cada animal.

3.9 - Coloração cresilo violeta

As secções de cérebro foram montadas em lâminas de microscópio, marcadas com coloração de cresilo violeta (acetato de cresilo violeta, Alfa Aesar) e desidratadas pela passagem por concentrações crescentes de soluções de etanol (EtOH 75,96 e 100%) e por fim substituto do xileno (Sigma). As secções foram cobertas com meio de montagem Eukitt (O. Kindler GmbH & CO, Freiburg, Germany) e lamela para posterior visualização ao microscópio.

3.10 - Análise estatística

A análise estatística representada em 4.2 e 4.3 foi realizada utilizando o teste *one-way* ANOVA. Os valores são expressos como valores brutos ou médias \pm SEM. Toda a análise estatística foi realizada através do *software* GraphPad Prism versão 7.04 (GraphPad software, La Jolla, USA).

4. RESULTADOS

4.1 - O cruzamento de murganhos heterozigóticos SCA3/MDJ Q69 com murganhos *wild-type* gera animais transgênicos

O cruzamento de murganhos machos heterozigóticos (+/-) SCA3/MDJ Q69 com fêmeas C57BL/6 *wild-type* leva à obtenção de murganhos SCA3/MDJ Q69 ou murganhos *wild-type*, permitindo a manutenção da colônia (Torashima et al., 2008; Oue et al., 2009). Para ser possível a identificação dos descendentes transgênicos é necessário proceder à sua genotipagem. A genotipagem dos animais utilizados neste estudo foi realizada por extração de DNA proveniente de furos das orelhas dos murganhos nascidos.

Após extração do material genômico e respetiva purificação, procedeu-se à amplificação do transgene humano de SCA3/MDJ Q69, correspondendo à forma truncada da proteína Ataxina-3, através de uma reação de PCR. Os produtos desta reação foram carregados num gel de agarose, realizando-se corrida de eletroforese para separação das bandas de acordo com o peso molecular. A visualização de uma banda com cerca de 450 bp permite a identificação dos animais transgênicos (Figura 4.1-A).

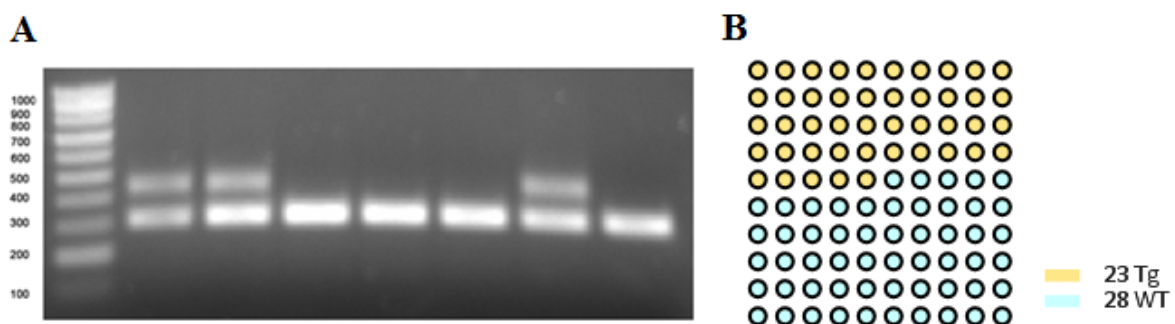


Figura 4.1 – Genotipagem de murganhos resultantes do cruzamento de animais SCA3/MDJ Q69 com murganhos *wild-type*. (A) Gel de eletroforese da genotipagem de murganhos gerados a partir do cruzamento de machos heterozigóticos (+/-) SCA3/MDJ Q69 com fêmeas C57BL/6 *wild-type*. A região genômica da *Atx3* foi amplificada por PCR do DNA genômico dos murganhos, utilizando os respetivos *primers*. Foi, também, amplificada a região da β -actina como controlo da amplificação. Os produtos do PCR foram separados de acordo com o respetivo tamanho por eletroforese num gel de agarose 1% durante 45-60 min a 100V. O tamanho esperado do produto do PCR amplificado da região da *Atx3* é de cerca de 450 bp, detetado por comparação com o marcador de peso molecular (*NZYDNA Ladder V*). Este gel representa a genotipagem da ninhada 4 (Anexo 1), apresentando a seguinte ordem: controlo positivo, F1R, F1L, FB, M1R, M1L, MB. Assim, os animais transgênicos são F1R e M1L, que foram identificados pela presença de bandas duplas. O tamanho das bandas, em pares de bases (bp), está representado à esquerda do gel. (B) Relação entre o número de murganhos transgênicos SCA3/MDJ Q69 (23) e o número de murganhos *wild-type* (28) genotipados ao longo de todo o estudo. Abreviaturas: Tg, transgênico; WT, *wild-type*.

Ao longo do estudo foram obtidas 10 ninhadas de animais resultantes de vários cruzamentos, que correspondem a diferentes coortes utilizados para análise (Anexo 1). Na totalidade do estudo foi possível genotipar 51 animais, 23 dos quais foram identificados como animais transgênicos (Figura 4.1-B), correspondendo a aproximadamente 45% dos animais genotipados.

4.2 - A sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma melhoria moderada do fenótipo motor em murganhos com SCA3/MJD

Os murganhos transgênicos SCA3/MJD Q69 utilizados neste estudo são caracterizados pelo surgimento de sintomas patológicos precoces e um fenótipo neuropatológico severo, sendo particularmente apropriados para testar terapias moleculares (Torashima et al., 2008). Desta forma, o desempenho motor foi avaliado em murganhos transgênicos SCA3/MDJ Q69 injetados com LV-G3BP1, com o objetivo de verificar o potencial terapêutico da sobreexpressão de G3BP1 na recuperação ou melhoria do fenótipo da SCA3/MJD. Como controle, foram avaliados murganhos transgênicos não-injetados e murganhos transgênicos injetados com GFP, com idade semelhante aos murganhos injetados com G3BP1. Foram ainda, analisados animais *wild-type* para comparação do desempenho comportamental em animais sem a patologia. Os testes de comportamento foram realizados a cada 3 semanas após a injeção, de forma a avaliar a recuperação motora dos murganhos transgênicos injetados com G3BP1 ao longo do tempo, terminando às 9 semanas após injeção.

A coordenação motora e equilíbrio foram avaliados por teste de *rotarod* de velocidade constante (Anexo 2). Passadas 9 semanas desde a injeção, foi possível verificar uma tendência de melhoria do desempenho particularmente relevante nos murganhos transgênicos injetados com G3BP1 em relação aos grupos controle (SCA3 + G3BP1 $1,769 \pm 0,7192$ vs SCA3 + GFP $1,291 \pm 0,1585$, SCA3 $0,915 \pm 0,1176$, WT $1,228 \pm 0,1199$; Figura 4.2-A), evidenciada pelo aumento do tempo que os murganhos apresentavam em cair do *rotarod* em movimento.

A coordenação motora também foi avaliada no teste de natação, no qual os murganhos foram colocados numa das extremidades de um tanque preenchido com água, sendo registrado o intervalo de tempo entre o qual são colocados na água até que sobem para a plataforma que se encontra na extremidade oposta (Anexo 3). Os murganhos transgênicos injetados com G3BP1 demonstraram uma redução para cerca de metade no tempo necessário para atingir a plataforma, às 9 semanas após injeção ($0,499 \pm 0,0848$; Figura 4.2-B), enquanto esta

diferença não foi verificada para os restantes grupos experimentais (SCA3 + GFP $0,595 \pm 0,1107$, SCA3 $0,666 \pm 0,1173$, WT $0,573 \pm 0,0719$; Figura 4.2-B).

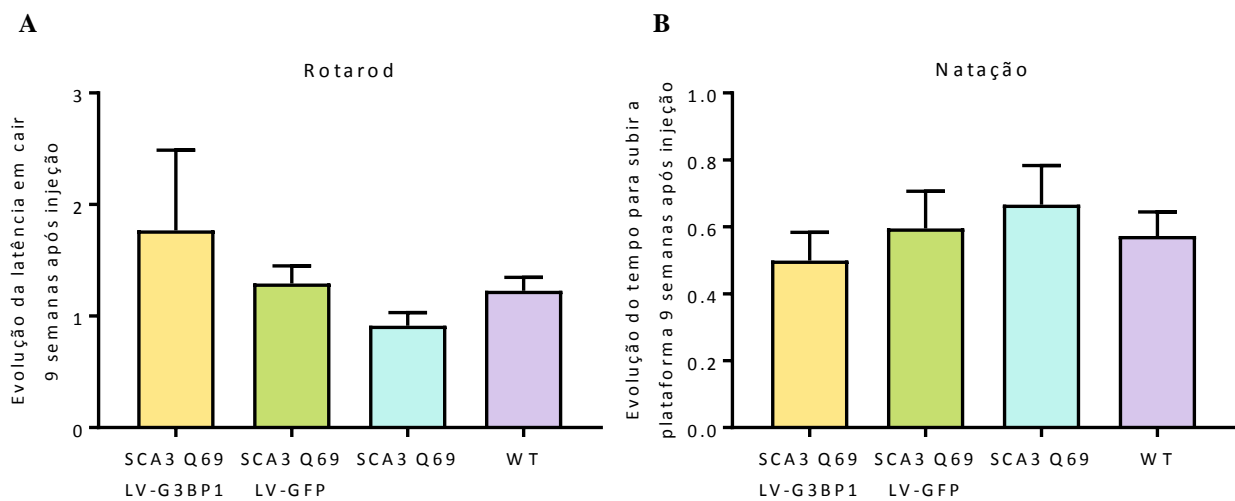


Figura 4.2 – A sobreexpressão de G3BP1 induz uma tendência para a melhoria da coordenação motora em murganhos com SCA3/MJD. (A) Os murganhos foram colocados num aparelho de *rotarod* a uma velocidade constante (5rpm, durante 5 minutos) e foi registada a sua latência em cair. Os murganhos injetados com G3BP1 demonstraram um maior aumento da latência em cair quando comparados com os grupos controlo, 9 semanas após injeção. (B) Desempenho no teste de natação 9 semanas após injeção, medido pelo tempo que os murganhos demoraram a chegar à plataforma. Comparativamente aos animais controlo e *wild-type*, os murganhos injetados com G3BP1 registaram uma maior diminuição do tempo necessário para atingir a plataforma às 9 semanas após injeção. Os valores são apresentados como médias \pm SEM. SCA3 + G3BP1 ($n=7$), SCA3 + GFP ($n=7$), SCA3 ($n=7$) e *wild-type* ($n=26$).

No teste de equilíbrio em barras (Anexo 4), foi registado o tempo médio que cada murganho demora a atravessar a barra de forma a chegar a uma plataforma de abrigo. Este teste avalia a capacidade que os murganhos demonstram em atravessar barras mais ou menos estreitas, sendo um indicador da manutenção do equilíbrio. Como seria de esperar, os murganhos *wild-type* demoram muito menos tempo a atravessar a barra que os animais transgênicos. No entanto, não foi possível registar uma melhoria do fenótipo a longo prazo dos animais injetados com G3BP1. Estes murganhos necessitaram sempre de mais tempo para atravessar ambas as barras em relação aos restantes grupos experimentais mesmo antes da injeção, o que se manteve ao longo de todos os pontos da experiência. Ainda assim, no caso da barra mais larga (Anexo 4-A) verificou-se uma melhoria relevante no período entre as 6 semanas e as 9 semanas após injeção, onde se notou uma diminuição do tempo necessário para atravessar a plataforma.

O teste de pegadas foi utilizado para avaliar a progressão da marcha e o fenótipo patológico de ataxia. Foram obtidas diversas medições, incluindo a largura da passada das

patas dianteiras (*frontal base*) e traseiras (*hind base*). Como consequência de deficiências no equilíbrio, no modelo transgênico utilizado é de se esperar um aumento na largura da passada em relação aos murganhos *wild-type*. Apesar de não ser significativa, os murganhos injetados com G3BP1 demonstraram uma tendência para a diminuição da largura da passada dianteira (*frontal base*) em relação aos animais controlo (SCA3 + G3BP1 $16,800 \pm 0,9962$ mm vs SCA3 + GFP $17,629 \pm 0,6308$ mm vs SCA3 $17,686 \pm 0,5124$ mm; Figura 4.3-A). O mesmo se verificou para a largura da passada traseira (*hind base*), onde se observa uma diferença maior em relação aos controlos (SCA3 + G3BP1 $25,986 \pm 2,4223$ mm vs SCA3 + GFP $28,871 \pm 0,9539$ mm vs SCA3 $28,043 \pm 1,0803$ mm; Figura 4.3-B), 9 semanas após injeção.

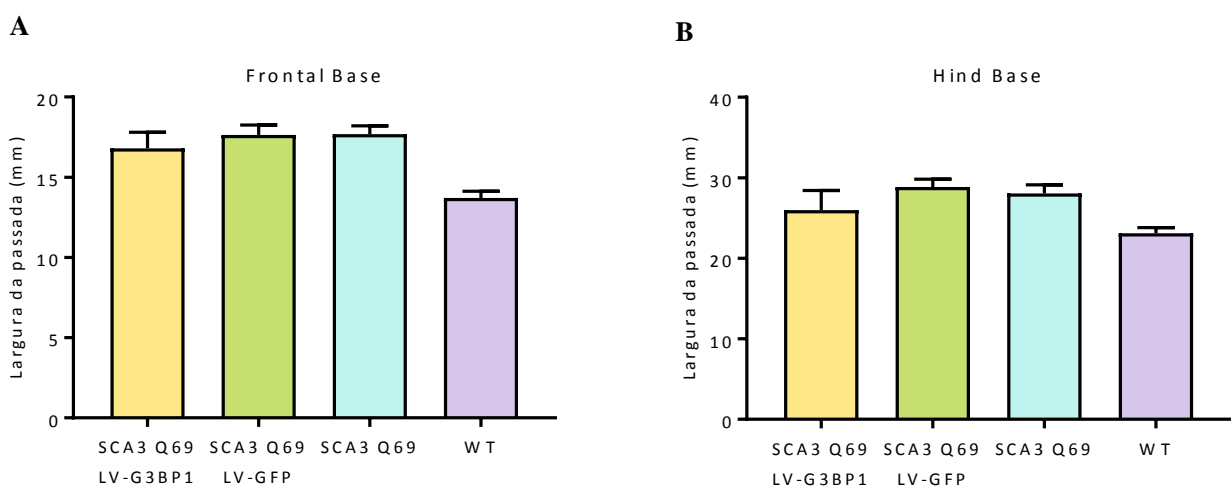


Figura 4.3 – A sobreexpressão de G3BP1 induz uma tendência para uma melhoria na marcha e ataxia em murganhos com SCA3/MJD. Análise quantitativa da largura da passada dianteira (*frontal base*) (A) e da passada traseira (*hind base*) (B) efetuada 9 semanas após a injeção. Os murganhos injetados com G3BP1 demonstraram uma tendência para diminuir a largura da passada em comparação com os grupos controlo. Os valores são apresentados como médias \pm SEM, em milímetros (mm). SCA3 + G3BP1 ($n=7$), SCA3 + GFP ($n=7$), SCA3 ($n=7$) e *wild-type* ($n=26$).

Para além disso, foram obtidas as distâncias médias entre pegada dianteira e a pegada traseira (*overlap*; Anexo 5). Os animais saudáveis devem sobrepor perfeitamente as pegadas dianteiras e traseiras ao longo da marcha, apresentando distâncias perto de zero, aumentando esta distância nos casos de deficiências no comportamento motor. De uma forma geral, não se verificou uma melhoria na sobreposição das pegadas a longo prazo em murganhos injetados com G3BP1. No entanto, nos animais injetados com G3BP1 verificou-se, em todos os pontos da experiência, uma tendência para uma diminuição da distância entre pegadas no lado esquerdo (*left overlap*; Anexo 5), em relação aos murganhos injetados com GFP.

Adicionalmente, foi analisada a distância entre pegadas sequenciais de membros dianteiros (*frontal stride*) e traseiros (*hind stride*). Estas medições indicam o comprimento da

passada, sendo que distâncias maiores estão associadas a um melhor fenótipo motor. Os resultados obtidos para estas medições não indicam uma melhoria significativa da marcha a longo prazo para os animais injetados com G3BP1 (Anexo 5). Contudo, ao longo de todo o período experimental verificou-se uma tendência constante para o aumento do comprimento da passada dos murganhos injetados em comparação com os não-injetados, tanto para a passada dos membros dianteiros como para os traseiros em ambos os lados.

4.3 - A sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma diminuição da neuropatologia em murganhos com SCA3/MJD

O modelo transgênico utilizado é caracterizado pela formação de agregados de Atx3, bem como pela perda de células de Purkinje (Torashima et al., 2008). Considerando isto e de forma a avaliar o efeito da sobreexpressão de G3BP1 nestes achados patológicos, foram contados o número de agregados de Ataxina-3 e o número de células de Purkinje. Todas as secções foram obtidas a partir de animais sacrificados às 10 semanas após injeção.

Para avaliar se existem melhorias nos animais injetados, foi quantificado o número de agregados através de marcação imunohistoquímica para HA (Figura 4.4-A), uma vez que nos murganhos transgênicos estas inclusões expressam a Ataxina-3 mutada marcada pelo epítopo HA no terminal-N. Os animais injetados exibiram uma tendência para diminuir o número de agregados em vários lóbulos (lóbulo II: SCA3 $47,667 \pm 17,6761$ vs SCA3 + GFP $42,333 \pm 27,2784$ SCA3 + G3BP1 $28,667 \pm 5,3645$; lóbulo III: SCA3 $68,667 \pm 15,836$ vs SCA3 + GFP $79,667 \pm 28,2862$ vs SCA3 + G3BP1 $60,333 \pm 16,9738$; lóbulo IX: SCA3 $253 \pm 100,1316$ vs SCA3 + GFP $460,333 \pm 63,067$ vs SCA3 + G3BP1 $298 \pm 113,697$; Figura 4.4-B). Nos murganhos transgênicos injetados com G3BP1 o número total de agregados presentes na totalidade do cerebelo revelou uma tendência para diminuir quando comparado com os animais injetados com GFP (SCA3 $859 \pm 188,3428$ vs SCA3 + GFP $1187 \pm 175,1152$ vs SCA3 + G3BP1 $1148 \pm 142,7737$; Figura 4.4-B).

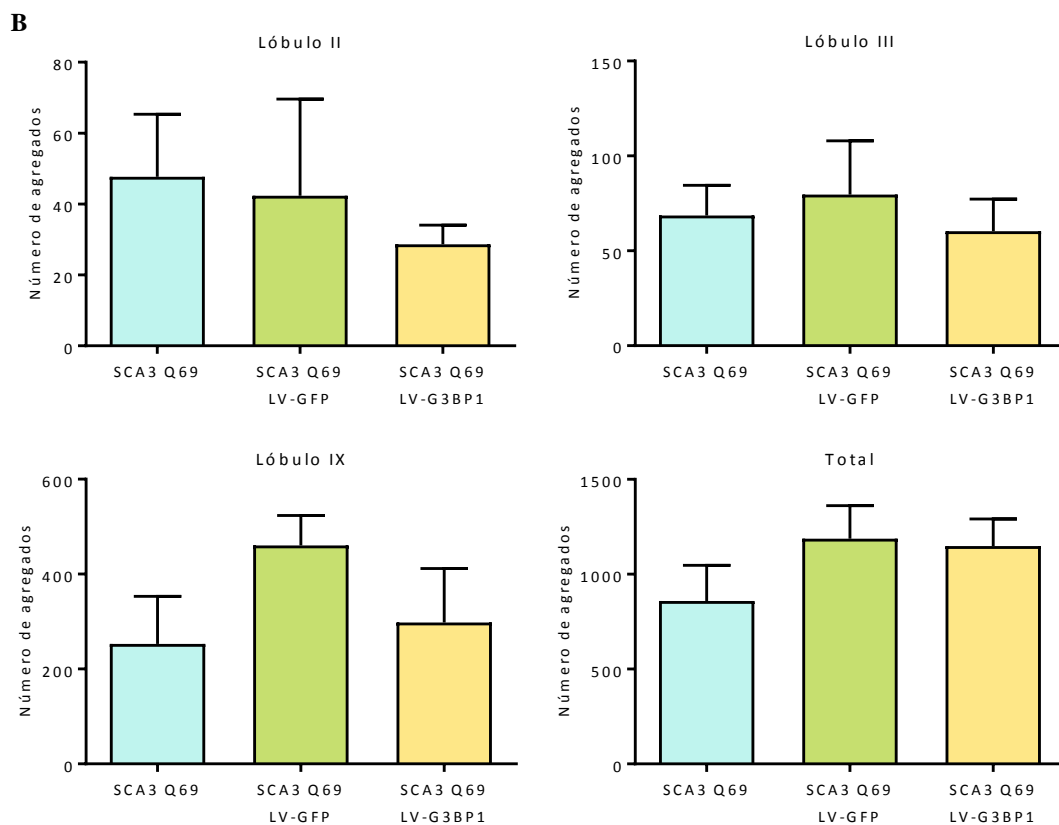
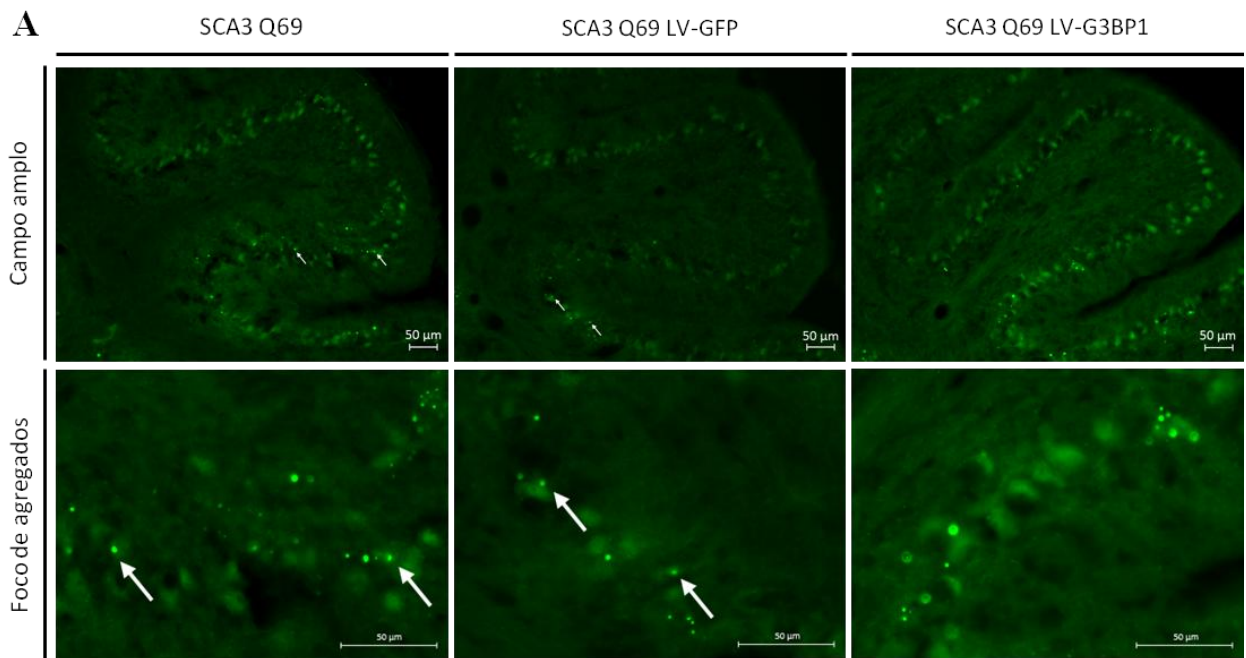


Figura 4.4 – A sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma diminuição de agregados de Ataxina-3 em murganços com SCA3/MJD. (A) Imagens representativas de secções sagitais do cerebelo dos animais transgênicos estudados marcadas com marcação histoquímica contra HA. Está representado o lóbulo VIII, onde se verifica a presença de agregados de Ataxina-3 nas células de Purkinje (setas) dos murganços controlo, mas não na secção do animal injetado com G3BP1. Ampliação de 20x. **(B)** Quantificação do número de agregados de animais sacrificados às 10 semanas após injeção. Foi verificada uma tendência para a diminuição de agregados nos animais injetados com G3BP1 em relação aos grupos de controlo nos lóbulos II, III e IX, assim como no total do cerebelo. Os valores são apresentados como médias \pm SEM. SCA3 + G3BP1 ($n=3$), SCA3 + GFP ($n=3$), SCA3 ($n=3$)

Os murganhos transgênicos apresentam uma redução no número de células de Purkinje. Assim, para avaliar se existem melhorias nos animais injetados, foi registrado o número de células de Purkinje através de marcação imunohistoquímica para a calbindina (Figura 4.5-A). Nos lóbulos IV-V e VIII, os animais injetados com G3BP1 exibiram uma tendência para a presença de um maior número de células de Purkinje (lóbulo IV-V: SCA3 $1203 \pm 85,9787$ vs SCA3 + GFP $1159 \pm 98,0765$ vs SCA3 + G3BP1 $1481,667 \pm 145,2645$; lóbulo VIII: SCA3 $709,333 \pm 32,7431$ vs SCA3 + GFP $725 \pm 88,0984$ vs SCA3 + G3BP1 $925,333 \pm 92,2972$; Figura 4.5-B). A quantificação de células de Purkinje presentes no total do cerebelo dos animais injetados com G3BP1 revelou uma pequena tendência para o aumento do número de células de Purkinje quantificadas (SCA3 $5801 \pm 230,1528$ vs SCA3 + GFP $5745,667 \pm 483,1705$ vs SCA3 + G3BP1 $5813 \pm 592,2423$; Figura 4.5-B).

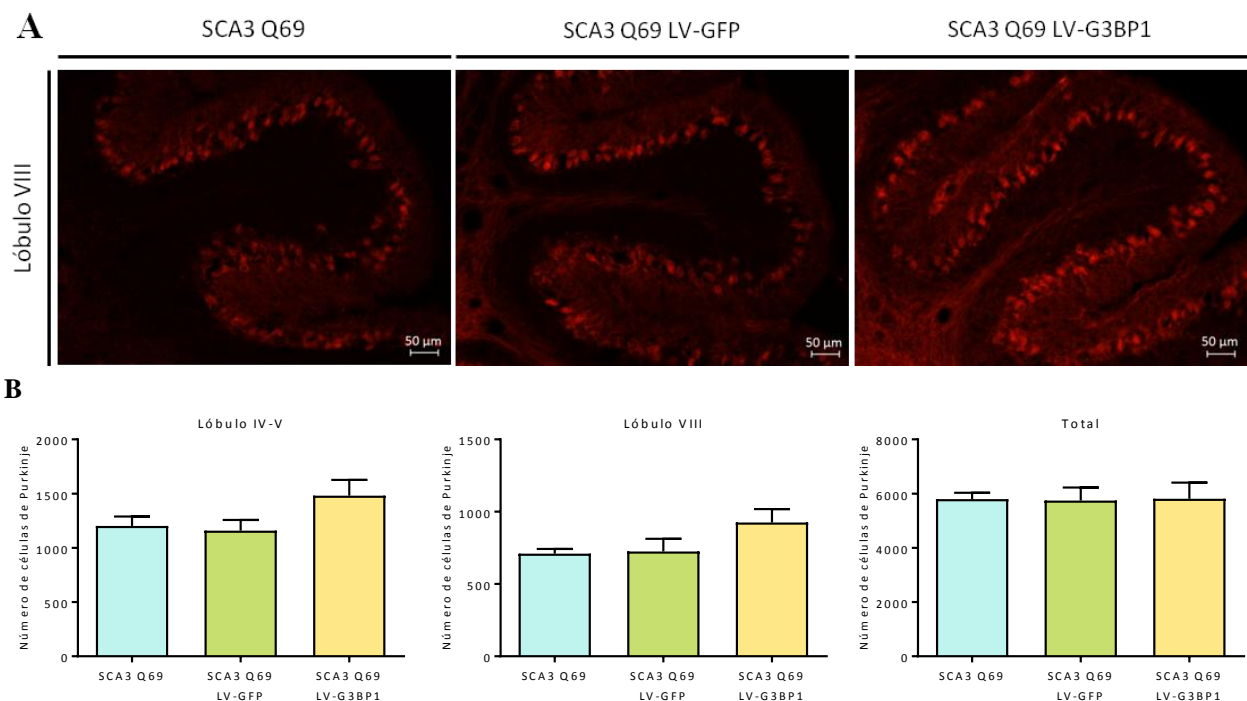


Figura 4.5 – A sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma preservação das células de Purkinje em murganhos com SCA3/MJD. (A) Imagens representativas de secções sagitais do cerebelo dos animais transgênicos estudados marcados com marcação histoquímica contra calbindina. Está representado o lóbulo VIII, onde se nota uma melhor preservação das células de Purkinje nos animais onde ocorreu a sobreexpressão de G3BP1 em comparação com os grupos de controlo. Ampliação de 20x. **(B)** Quantificação do número de células de Purkinje de animais sacrificados às 10 semanas após injeção. Foi verificada uma tendência para a presença de maior número de células de Purkinje nos animais injetados com G3BP1 em relação aos grupos de controlo nos lóbulos IV-V e VIII, assim como na totalidade do cerebelo. Os valores são apresentados como médias \pm SEM.

A análise das secções com coloração de cresil violeta permitiu observar uma possível diferença na espessura da camada granular e molecular dos neurónios presentes no cerebelo. Os resultados observados indicam uma tendência para a preservação da integridade dos neurónios em animais onde há sobreexpressão de G3BP1 (Figura 4.6).

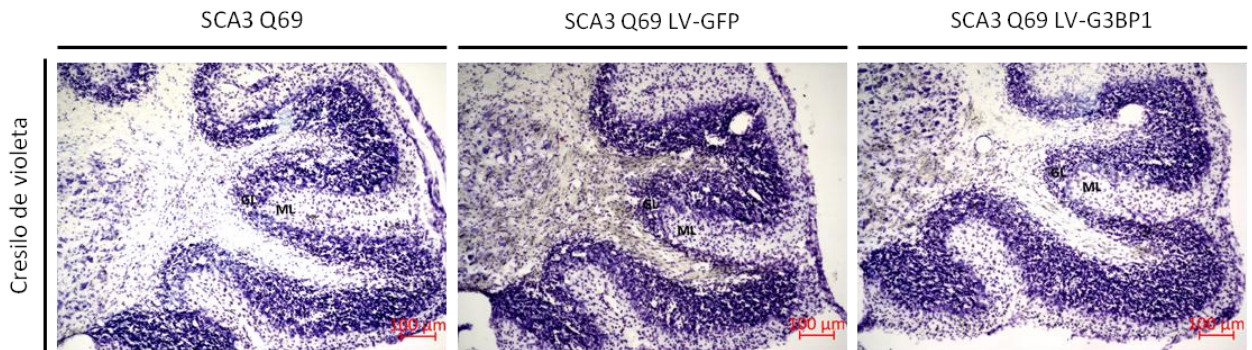


Figura 4.6 – A sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma conservação das camadas neuronais de neurónios do cerebelo em murganhos com SCA3/MJD. Imagens representativas das secções sagitais do cerebelo dos murganhos SCA3/MJD estudados, marcados com coloração cresilo de violeta. Estão representados os lóbulos VIII, IX e X, onde parecem existir diferenças na espessura da camada granular (GL) e molecular (ML) entre os animais injetados com G3BP1 e os grupos controlo. Ampliação de 10x.

5. DISCUSSÃO

O principal objetivo deste projeto foi investigar se a sobreexpressão de G3BP1 pode aliviar o fenótipo motor e neuropatológico de murganhos transgênicos SCA3/MJD Q69. De uma forma geral, se bem que com resultados moderados, verificou-se que esta possível estratégia terapêutica conduziu a uma melhoria da coordenação motora e da neuropatologia observada no cerebelo deste modelo animal da SCA3/MJD. No entanto, serão necessários mais estudos para aumentar o número de animais e de quantificações efetuadas.

A expressão de proteínas que contrariam eventos tóxicos envolvidos na patogênese das doenças de poliglutaminas pode exercer efeitos terapêuticos. Deste modo, a reversibilidade da via dos grânulos de *stress* oferece novas oportunidades para estimular vias bioquímicas endógenas, com um potencial de permitir a reversão e remoção de agregados patológicos e talvez atrasar a progressão da doença (Vanderweyde et al., 2012; Wolozin, 2012). A relação entre a via dos grânulos de *stress* e proteínas ligadas a doenças neurodegenerativas sugere a existência de um papel relevante das vias comuns nestes processos, como aquelas envolvidas no controlo da tradução. Como principais componentes dos SGs, as proteínas ligantes de RNA destacam-se como potenciais novos alvos para intervenções terapêuticas em doenças neurodegenerativas.

Como mencionado anteriormente, a G3BP1 é uma proteína ligante de RNA com diversas funções, entre as quais se distingue a capacidade de induzir a formação de SGs quando sobreexpressa (Reineke et al., 2012; Reineke et al., 2015; N. Kedersha et al., 2016). Para além disso, foi demonstrada a interação da G3BP1 com diversas proteínas, que modulam a formação de SGs (N. Kedersha et al., 2016). Como parte da resposta ao *stress*, a indução de SGs contribui para o controlo e inibição da tradução de mRNA (Anderson & Kedersha, 2008; Protter & Parker, 2016), de modo a responder ao dano induzido por *stress* (N. Kedersha & Anderson, 2002). Tendo em conta estas evidências e os resultados referidos, a nossa hipótese é que a sobreexpressão de G3BP1 possa ter um papel neuroprotector, particularmente na SCA3/MJD.

Existem alguns tipos de abordagens terapêuticas em desenvolvimento para tratamento de doenças de poliglutaminas. Foram já obtidos resultados promissores em estudos de abordagens terapêuticas que atuam em processos patológicos precoces, como aquelas abordagens que têm como objetivo a degradação ou bloqueio da transcrição de proteínas patogénicas, mas também estratégias que atuam na agregação proteica e na clivagem

proteolítica. Por outro lado, as estratégias que contrabalançam deficiências nos mecanismos de manutenção da homeostasia proteica, na desregulação na tradução, nas disfunções a nível mitocondrial ou na sinalização do cálcio também têm gerado resultados positivos, com melhorias nos fenótipos e neuropatologia associados a estas doenças (Matos et al., 2019). Existem também algumas abordagens que têm como objetivo promover a neuroproteção. Por exemplo, as deficiências motoras e neuropatológicas de dois modelos da SCA3/MJD demonstraram melhorias após a sobreexpressão de um neuropéptido Y mediada por lentivírus (Duarte-Neves et al., 2015). Esta terapia pode ter sido causada pelo aumento dos níveis de fatores neurotóxicos acompanhado pela diminuição de vários marcadores neuroinflamatórios (Duarte-Neves et al., 2015).

Recentemente, estudos genéticos utilizando modelos animais demonstraram o potencial benefício da manipulação das vias de RBPs. O *knockdown* de Atx2 aumentou em 80% o tempo médio de vida de um modelo animal de esclerose lateral amiotrófica, tendo por base a sobreexpressão de TDP43 *wild-type* (Becker et al., 2017). Por outro lado, a sobreexpressão de Atx2 num modelo transgénico de SCA3/MJD demonstrou melhorias na neuropatologia e fenótipo motor. No mesmo estudo, as mutações nos motivos de ligação da Atx2 ao PABP ou a sobreexpressão de PABP conduziram ao aumento da agregação de Atx3 mutada. A sobreexpressão de Atx2 em modelos da SCA3/MJD provou melhorar a neuropatologia devido à sua interação com PABP (Nóbrega et al., 2015).

Os animais utilizados neste estudo foram obtidos a partir do cruzamento de murganhos heterozigóticos SCA3/MDJ Q69 com animais *wild-type*. A obtenção de animais suficientes para o estudo demonstrou ser um processo demorado, com obtenção de apenas cerca de 45% de animais transgénicos por cada ninhada. Isto condicionou a obtenção de um número suficiente de animais para permitir obter resultados estatisticamente significativos. Este tornou-se um obstáculo particularmente relevante para a avaliação neuropatológica, onde apenas analisaram-se 3 animais, uma vez que foi realizada numa fase mais tardia do processo experimental.

O modelo transgénico utilizado neste estudo é caracterizado pela expressão de uma forma truncada da Ataxina-3 com 69 repetições de CAG, sendo direcionada por um promotor específico para as células de Purkinje (promotor L7) (Torashima et al., 2008). As células de Purkinje estão localizadas no cerebelo, que desempenha um papel importante na coordenação de movimentos voluntários, bem como na manutenção da postura e equilíbrio. Estes animais transgénicos apresentam deficiências na marcha e equilíbrio características do fenótipo de

ataxia cerebelar, associados a defeitos funcionais nas células de Purkinje (Torashima et al., 2008). Neste estudo, os animais transgênicos foram injetados com 4-5 semanas de idade, sendo que por volta das 3 semanas de idade já exibiam um fenótipo de ataxia pronunciado. De uma forma geral foi possível observar uma melhoria do fenótipo motor às 9 semanas após injeção com G3BP1. Os murganhos transgênicos injetados com G3BP1 apresentaram uma melhoria do desempenho motor mais relevante do que a apresentada pelos grupos controle, apresentando alívio do fenótipo especialmente nos testes de *rotarod* e natação. Por sua vez, a análise das pegadas revelou diminuições na largura da passada dos animais injetados com G3BP1, indicando melhorias ao nível da marcha e coordenação motora.

Na mesma linha, a sobreexpressão de G3BP1 é capaz de melhorar a neuropatologia no modelo transgênico de SCA3/MJD, comprovado por uma tendência de diminuição do número de agregados de Atx3 e do volume de perda neuronal num modelo lentiviral no estriado de SCA3/MJD (Tomé, 2016). De acordo com esta e outras evidências, neste estudo foi possível observar melhorias em relação à patologia associada à SCA3/MJD. O modelo transgênico utilizado apresenta inclusões de Atx3 e atrofia severa do cerebelo com deficiências nas células de Purkinje (Torashima et al., 2008). Com o objetivo de avaliar o efeito da sobreexpressão de G3BP1 no resgate da neuropatologia nos animais transgênicos, foi analisado o número de células de Purkinje, o número de agregados e a camada de neurónios do cerebelo, às 10 semanas após injeção. Os animais injetados com G3BP1 apresentaram uma diminuição do número de agregados de Ataxina-3, acompanhado de uma preservação do número de células de Purkinje em alguns lóbulos. Apesar da ausência de quantificação, a espessura da camada granular e molecular de neurónios do cerebelo parece, também, estar melhor conservada nos animais onde ocorre sobreexpressão de G3BP1. Estas tendências não foram contudo, observadas para todos os lóbulos, o que pode ser explicado pela possível existência de diferenças nos níveis de transdução da terapia, mas também pelo reduzido número de animais incluídos nesta análise.

Num estudo do nosso grupo acima referido, foi avaliada a restauração dos níveis de Atx2 pela sua expressão lentiviral no mesmo modelo transgênico, após o estabelecimento da doença (Nóbrega et al., 2015). Esta sobreexpressão foi capaz de restabelecer os níveis de Atx2 que se encontravam diminuídos, conduzindo a uma melhoria do desempenho motor comparado com os animais injetados com GFP. Por sua vez, a análise neuropatológica revelou uma diminuição significativa do número de agregados e preservação das células de Purkinje nos lóbulos cerebelares onde ocorreu transdução da Atx2 (Nóbrega et al., 2015).

Noutro estudo, o silenciamento específico do alelo de Ataxina-3 mutante melhorou o fenótipo do mesmo modelo transgénico, comprovado por testes de pegadas e atividade (Nobrega et al., 2013b). Mas também melhorou o desempenho destes animais no teste de *rotarod* desde as 4 semanas após injeção com um *short-hairpin* contra a *Atx3* mutada (*shAtx3*). Ainda assim, este desempenho demonstrou estar longe daquele demonstrado por animais *wild-type*, correspondendo a uma preservação do desempenho que é relevante, quando comparada com o declínio dos grupos controlo (Nobrega et al., 2013b).

Este modelo transgénico foi também utilizado para testar o efeito da beclina-1, um ativador da autofagia, no comportamento motor (Nascimento-Ferreira et al., 2013). Neste estudo, os efeitos neuroprotetores da beclina 1 revelaram ser dependentes do período de intervenção e do estágio da doença. Num mesmo período de 10 semanas, o modelo transgénico demonstrou resultados modestos comparativamente aqueles obtidos com o modelo da SCA3/MJD baseado em lentivírus (Nobrega et al., 2013a), que apresentou resultados equiparáveis a animais *wild-type* na maioria dos parâmetros avaliados. Tal como no nosso estudo, a sobreexpressão de beclina-1 foi aplicada no modelo transgénico que mimica o estágio tardio da doença no momento da injeção. Ainda assim, esta terapia foi capaz de conduzir a uma recuperação parcial do fenótipo, com melhorias na marcha, no equilíbrio e na coordenação motora (Nascimento-Ferreira et al., 2013). No nosso estudo, a sobreexpressão de G3BP1 não foi capaz de reverter completamente o fenótipo da SCA3/MJD. Isto pode ser explicado pelo facto da injeção com G3BP1 ter sido realizada num estágio tardio (4-5 semanas de idade). Por outro lado, a duração do estudo pode não ter condicionado os efeitos terapêuticos neste modelo transgénico. Tal como para a beclina-1, os efeitos da sobreexpressão de G3BP1 não chegaram a ser avaliados para longos períodos de tempo num estágio de doença avançado.

Em termos neuropatológicos, foi testada a sobreexpressão de beclina-1 em estádios distintos (Nascimento-Ferreira et al., 2013). A administração precoce de beclina-1 foi capaz de prevenir o desenvolvimento de neuropatologia a proteger as células neuronais, enquanto a injeção tardia não foi capaz de prevenir danos celulares. Esta intervenção causou apenas melhorias neuropatológicas, especialmente no modelo transgénico, em que já se verificava atrofia cerebelar. A expressão de beclina-1 no modelo transgénico demonstrou a capacidade de preservar as arborizações dendríticas de células de Purkinje, assim como de atrasar a progressão da atrofia cerebelar, observada pelo aumento da respetiva camada molecular

(Nascimento-Ferreira et al., 2013). Apesar de esta estratégia não ser especificamente neuroprotectora foi capaz de produzir resultados positivos neste modelo da SCA3/MJD.

Em suma, os nossos resultados demonstraram que a sobreexpressão de G3BP1 pode exercer efeitos positivos no cerebelo de murganhos transgênicos SCA3/MJD Q69. A sobreexpressão desta RBP é capaz de conduzir a uma melhoria do fenótipo e neuropatologia neste modelo da SCA3/MJD. Assim, a injeção com G3BP1 por vir a constituir uma terapia promissora para esta e outras doenças de poliglutaminas. No entanto, estudos adicionais são necessários para comprovar esta hipótese.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo foi possível verificar que a sobreexpressão de G3BP1 é capaz de melhorar as deficiências motoras e neuropatológicas associadas à SCA3/MJD, embora os resultados sejam bastante moderados, sobretudo em comparação com dados no modelo lentiviral de SCA3/MJD. Assim, o tratamento com G3BP1 pode constituir um bom candidato para terapias que atrasem a progressão da SCA3/MJD e, possivelmente, outras doenças de poliglutaminas. Este paradigma experimental permite, também, uma avaliação detalhada da evolução comportamental motora deste modelo transgênico após a terapia.

As nossas observações a nível de comportamento de murganhos com SCA3/MJD permitiram concluir que a sobreexpressão de G3BP1 conduz a uma melhoria do fenótipo motor, quer a nível de coordenação motora, quer a nível do equilíbrio e marcha.

Sandra Tomé, 2016 em *“Insights into the role of stress granules in spinocerebellar ataxias”* reportou que a sobreexpressão de G3BP1 num modelo lentiviral de murganhos SCA3/MJD conduz a uma redução significativa dos agregados de ubiquitina e preservação do marcador neuronal DARPP-32. Estes resultados estão de acordo com o nosso estudo no sentido em que foi possível observar um efeito neuroprotetor da G3BP1, avaliada pela tendência para a diminuição dos agregados de Ataxina-3 e pela preservação das células de Purkinje. No entanto, a sobreexpressão de G3BP1 não foi capaz de resgatar completamente os defeitos neuropatológicos nos animais transgênicos.

Em estudos futuros, seria importante avaliar a área de cerebelo transduzida com esta terapia, avaliando os lóbulos onde se verifica a presença de G3BP1 e/ou GFP, de modo a associar esta terapia aos achados neuropatológicos observados nos lóbulos afetados pela mesma. Também seria interessante avaliar o efeito da injeção de G3BP1 em estágios mais precoces, onde a doença e os sintomas desta não estejam tão avançados. Esta abordagem pode ter mais hipóteses de reverter o fenótipo da SCA3/MJD, pois pode dar origem a efeitos mais eficazes e persistentes. Por outro lado, seria importante verificar a evolução desta terapia durante um período mais alargado, para que o tratamento possa atingir o máximo do seu potencial, durante um estágio patológico severo. Outra variável a considerar pode ser a administração de múltiplas injeções, com o objetivo de aumentar a área transduzida.

De forma a obter mais dados, estamos correntemente a recolher e processar as amostras histológicas dos animais que não foram incluídos neste estudo, por motivos de limitação de tempo. Outra abordagem a concretizar no futuro será a quantificação das

camadas granular e molecular do cerebelo, de forma a avaliar alterações na atrofia cerebelar dos animais tratados. A diminuição de Ataxina-3 pode ser futuramente quantificada através da técnica de *Western Blot* e de PCR quantitativo (qPCR), através da homogeneização do cerebelo. O potencial terapêutico da G3BP1 pode ser também avaliado pela medição por qPCR dos níveis de indicadores de neuroprotecção e imunomodelação, como neurotrofinas e interleucinas (ILs), respetivamente.

BIBLIOGRAFIA

- Adeli, K. (2011). Translational control mechanisms in metabolic regulation: critical role of RNA binding proteins, microRNAs, and cytoplasmic RNA granules. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301(6), E1051-1064. doi:10.1152/ajpendo.00399.2011
- Aguilera-Gomez, A., Zacharogianni, M., van Oorschot, M. M., Genau, H., Grond, R., Veenendaal, T., . . . Rabouille, C. (2017). Phospho-Rasputin Stabilization by Sec16 Is Required for Stress Granule Formation upon Amino Acid Starvation. *Cell Rep*, 20(4), 935-948. doi:10.1016/j.celrep.2017.06.042
- Alam, U., & Kennedy, D. (2019). G3BP1 and G3BP2 regulate translation of interferon-stimulated genes: IFITM1, IFITM2 and IFITM3 in the cancer cell line MCF7. *Mol Cell Biochem*, 459(1-2), 189-204. doi:10.1007/s11010-019-03562-3
- Ambadipudi, S., Biernat, J., Riedel, D., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2017). Liquid-liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau. *Nat Commun*, 8(1), 275. doi:10.1038/s41467-017-00480-0
- Anderson, P., & Kedersha, N. (2002). Stressful initiations. *J Cell Sci*, 115(Pt 16), 3227-3234.
- Anderson, P., & Kedersha, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci*, 33(3), 141-150. doi:10.1016/j.tibs.2007.12.003
- Anderson, P., Kedersha, N., & Ivanov, P. (2015). Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1849(7), 861-870. doi:10.1016/j.bbagr.2014.11.009
- Angenstein, F., Evans, A. M., Ling, S. C., Settlage, R. E., Ficarro, S., Carrero-Martinez, F. A., . . . Greenough, W. T. (2005). Proteomic characterization of messenger ribonucleoprotein complexes bound to nontranslated or translated poly(A) mRNAs in the rat cerebral cortex. *J Biol Chem*, 280(8), 6496-6503. doi:10.1074/jbc.M412742200
- Apicco, D. J., Ash, P. E. A., Maziuk, B., LeBlang, C., Medalla, M., Al Abdullatif, A., . . . Wolozin, B. (2018). Reducing the RNA binding protein TIA1 protects against tau-mediated neurodegeneration in vivo. *Nat Neurosci*, 21(1), 72-80. doi:10.1038/s41593-017-0022-z
- Arimoto-Matsuzaki, K., Saito, H., & Takekawa, M. (2016). TIA1 oxidation inhibits stress granule assembly and sensitizes cells to stress-induced apoptosis. *Nat Commun*, 7, 10252. doi:10.1038/ncomms10252
- Arimoto, K., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Saito, H., & Takekawa, M. (2008). Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol*, 10(11), 1324-1332. doi:10.1038/ncb1791
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R., & Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431(7010), 805-810. doi:10.1038/nature02998
- Ash, P. E., Vanderweyde, T. E., Youmans, K. L., Apicco, D. J., & Wolozin, B. (2014). Pathological stress granules in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 1584, 52-58. doi:10.1016/j.brainres.2014.05.052
- Atlas, R., Behar, L., Elliott, E., & Ginzburg, I. (2004). The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells. *J Neurochem*, 89(3), 613-626. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02371.x
- Aulas, A., Fay, M. M., Lyons, S. M., Achorn, C. A., Kedersha, N., Anderson, P., & Ivanov, P. (2017). Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci. *J Cell Sci*, 130(5), 927-937. doi:10.1242/jcs.199240

- Aulas, A., & Vande Velde, C. (2015). Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Front Cell Neurosci*, 9, 423. doi:10.3389/fncel.2015.00423
- Bandyopadhyay, U., & Cuervo, A. M. (2007). Chaperone-mediated autophagy in aging and neurodegeneration: lessons from alpha-synuclein. *Exp Gerontol*, 42(1-2), 120-128. doi:10.1016/j.exger.2006.05.019
- Banfi, S., Servadio, A., Chung, M. Y., Kwiatkowski, T. J., Jr., McCall, A. E., Duvick, L. A., . . . Zoghbi, H. Y. (1994). Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia. *Nat Genet*, 7(4), 513-520. doi:10.1038/ng0894-513
- Barnes, C. J., Li, F., Mandal, M., Yang, Z., Sahin, A. A., & Kumar, R. (2002). Heregulin induces expression, ATPase activity, and nuclear localization of G3BP, a Ras signaling component, in human breast tumors. *Cancer Res*, 62(5), 1251-1255.
- Becker, L. A., Huang, B., Bieri, G., Ma, R., Knowles, D. A., Jafar-Nejad, P., . . . Gitler, A. D. (2017). Therapeutic reduction of ataxin-2 extends lifespan and reduces pathology in TDP-43 mice. *Nature*, 544(7650), 367-371. doi:10.1038/nature22038
- Bernardi, R., & Pandolfi, P. P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(12), 1006-1016. doi:10.1038/nrm2277
- Bichelmeier, U., Schmidt, T., Hubener, J., Boy, J., Ruttiger, L., Habig, K., . . . Riess, O. (2007). Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence. *J Neurosci*, 27(28), 7418-7428. doi:10.1523/JNEUROSCI.4540-06.2007
- Bidet, K., Dadlani, D., & Garcia-Blanco, M. A. (2014). G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA. *PLoS Pathog*, 10(7), e1004242. doi:10.1371/journal.ppat.1004242
- Birney, E., Kumar, S., & Krainer, A. R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res*, 21(25), 5803-5816. doi:10.1093/nar/21.25.5803
- Bishop, N. A., Lu, T., & Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464(7288), 529-535. doi:10.1038/nature08983
- Bond, C. S., & Fox, A. H. (2009). Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA. *J Cell Biol*, 186(5), 637-644. doi:10.1083/jcb.200906113
- Booker, G. W., Gout, I., Kristina, Downing, A., Driscoll, P. C., Boyd, J., . . . Campbell, I. D. (1993). Solution structure and ligand-binding site of the SH3 domain of the p85 α subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, 73(4), 813-822. doi:10.1016/0092-8674(93)90259-s
- Bosco, D. A., Lemay, N., Ko, H. K., Zhou, H., Burke, C., Kwiatkowski, T. J., Jr., . . . Hayward, L. J. (2010). Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum Mol Genet*, 19(21), 4160-4175. doi:10.1093/hmg/ddq335
- Boundedjah, O., Desforges, B., Wu, T. D., Pioche-Durieu, C., Marco, S., Hamon, L., . . . Pastre, D. (2014). Free mRNA in excess upon polysome dissociation is a scaffold for protein multimerization to form stress granules. *Nucleic Acids Res*, 42(13), 8678-8691. doi:10.1093/nar/gku582
- Boy, J., Schmidt, T., Schumann, U., Grasshoff, U., Unser, S., Holzmann, C., . . . Riess, O. (2010). A transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 resembling late disease onset and gender-specific instability of CAG repeats. *Neurobiol Dis*, 37(2), 284-293. doi:10.1016/j.nbd.2009.08.002

- Brown, J. A., Roberts, T. L., Richards, R., Woods, R., Birrell, G., Lim, Y. C., . . . Lavin, M. F. (2011). A novel role for hSMG-1 in stress granule formation. *Mol Cell Biol*, *31*(22), 4417-4429. doi:10.1128/MCB.05987-11
- Bryant, C. D., & Yazdani, N. (2016). RNA-binding proteins, neural development and the addictions. *Genes Brain Behav*, *15*(1), 169-186. doi:10.1111/gbb.12273
- Buchan, J. R. (2014). mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol*, *11*(8), 1019-1030. doi:10.4161/15476286.2014.972208
- Buchan, J. R., Yoon, J. H., & Parker, R. (2011). Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, *124*(Pt 2), 228-239. doi:10.1242/jcs.078444
- Burd, C. G., & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, *265*(5172), 615-621. doi:10.1126/science.8036511
- Butterfield, D. A., & Dalle-Donne, I. (2012). Redox proteomics. *Antioxid Redox Signal*, *17*(11), 1487-1489. doi:10.1089/ars.2012.4742
- Chen, J., Wu, J., Han, C., Li, Y., Guo, Y., & Tong, X. (2019). A mutation in the filamin c gene causes myofibrillar myopathy with lower motor neuron syndrome: a case report. *BMC Neurol*, *19*(1), 198. doi:10.1186/s12883-019-1410-7
- Ciechanover, A., Orian, A., & Schwartz, A. L. (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays*, *22*(5), 442-451. doi:10.1002/(sici)1521-1878(200005)22:5<442::Aid-bies6>3.0.Co;2-q
- Cohen, M., Stutz, F., Belgareh, N., Haguenaer-Tsapis, R., & Dargemont, C. (2003a). Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nat Cell Biol*, *5*(7), 661-667. doi:10.1038/ncb1003
- Cohen, M., Stutz, F., & Dargemont, C. (2003b). Deubiquitination, a new player in Golgi to endoplasmic reticulum retrograde transport. *J Biol Chem*, *278*(52), 51989-51992. doi:10.1074/jbc.C300451200
- Colombrita, C., Zennaro, E., Fallini, C., Weber, M., Sommacal, A., Buratti, E., . . . Ratti, A. (2009). TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J Neurochem*, *111*(4), 1051-1061. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06383.x
- Corcia, P., Camu, W., Praline, J., Gordon, P. H., Vourch, P., & Andres, C. (2009). The importance of the SMN genes in the genetics of sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler*, *10*(5-6), 436-440. doi:10.3109/17482960902759162
- Craft, S. (2009). The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Arch Neurol*, *66*(3), 300-305. doi:10.1001/archneurol.2009.27
- Cummings, C. J., & Zoghbi, H. Y. (2000). Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, *1*, 281-328. doi:10.1146/annurev.genom.1.1.281
- Dash, S., Siddam, A. D., Barnum, C. E., Janga, S. C., & Lachke, S. A. (2016). RNA-binding proteins in eye development and disease: implication of conserved RNA granule components. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *7*(4), 527-557. doi:10.1002/wrna.1355
- Dobra, I., Pankivskiy, S., Samsonova, A., Pastre, D., & Hamon, L. (2018). Relation Between Stress Granules and Cytoplasmic Protein Aggregates Linked to Neurodegenerative Diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep*, *18*(12), 107. doi:10.1007/s11910-018-0914-7
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, *426*(6968), 884-890. doi:10.1038/nature02261
- Doi, H., Okamura, K., Bauer, P. O., Furukawa, Y., Shimizu, H., Kurosawa, M., . . . Nukina, N. (2008). RNA-binding protein TLS is a major nuclear aggregate-interacting protein in huntingtin exon 1 with expanded polyglutamine-expressing cells. *J Biol Chem*, *283*(10), 6489-6500. doi:10.1074/jbc.M705306200

- Dormann, D., & Haass, C. (2011). TDP-43 and FUS: a nuclear affair. *Trends Neurosci*, *34*(7), 339-348. doi:10.1016/j.tins.2011.05.002
- Dormann, D., Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., . . . Haass, C. (2010). ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J*, *29*(16), 2841-2857. doi:10.1038/emboj.2010.143
- Doss-Pepe, E. W., Stenroos, E. S., Johnson, W. G., & Madura, K. (2003). Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol Cell Biol*, *23*(18), 6469-6483. doi:10.1128/mcb.23.18.6469-6483.2003
- Duarte-Neves, J., Goncalves, N., Cunha-Santos, J., Simoes, A. T., den Dunnen, W. F., Hirai, H., . . . Pereira de Almeida, L. (2015). Neuropeptide Y mitigates neuropathology and motor deficits in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, *24*(19), 5451-5463. doi:10.1093/hmg/ddv271
- Durr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Duyckaerts, C., Abbas, N., Didierjean, O., . . . Brice, A. (1996). Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol*, *39*(4), 490-499. doi:10.1002/ana.410390411
- Eisinger-Mathason, T. S., Andrade, J., Groehler, A. L., Clark, D. E., Muratore-Schroeder, T. L., Pasic, L., . . . Lannigan, D. A. (2008). Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival. *Mol Cell*, *31*(5), 722-736. doi:10.1016/j.molcel.2008.06.025
- Emara, M. M., Fujimura, K., Sciaranghella, D., Ivanova, V., Ivanov, P., & Anderson, P. (2012). Hydrogen peroxide induces stress granule formation independent of eIF2alpha phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, *423*(4), 763-769. doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.033
- Evers, M. M., Toonen, L. J., & van Roon-Mom, W. M. (2014). Ataxin-3 protein and RNA toxicity in spinocerebellar ataxia type 3: current insights and emerging therapeutic strategies. *Mol Neurobiol*, *49*(3), 1513-1531. doi:10.1007/s12035-013-8596-2
- Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2004). Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med*, *10*(10), 1055-1063. doi:10.1038/nm1113
- Fowler, H. L. (1984). Machado-Joseph-Azorean disease. A ten-year study. *Arch Neurol*, *41*(9), 921-925. doi:10.1001/archneur.1984.04050200027013
- French, J., Stirling, R., Walsh, M., & Kennedy, H. D. (2002). The expression of Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding proteins, G3BPs, in human breast cancers. *Histochem J*, *34*(5), 223-231. doi:10.1023/a:1021737413055
- Fujimura, K., Katahira, J., Kano, F., Yoneda, Y., & Murata, M. (2009). Microscopic dissection of the process of stress granule assembly. *Biochim Biophys Acta*, *1793*(11), 1728-1737. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.08.010
- Fujimura, K., Sasaki, A. T., & Anderson, P. (2012). Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules. *Nucleic Acids Res*, *40*(16), 8099-8110. doi:10.1093/nar/gks566
- Fung, G., Ng, C. S., Zhang, J., Shi, J., Wong, J., Piesik, P., . . . Luo, H. (2013). Production of a dominant-negative fragment due to G3BP1 cleavage contributes to the disruption of mitochondria-associated protective stress granules during CVB3 infection. *PLoS One*, *8*(11), e79546. doi:10.1371/journal.pone.0079546
- Gallouzi, I. E., Parker, F., Chebli, K., Maurier, F., Labourier, E., Barlat, I., . . . Tazi, J. (1998). A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol Cell Biol*, *18*(7), 3956-3965. doi:10.1128/mcb.18.7.3956

- Gareau, C., Houssin, E., Martel, D., Coudert, L., Mellaoui, S., Huot, M. E., . . . Mazroui, R. (2013). Characterization of fragile X mental retardation protein recruitment and dynamics in *Drosophila* stress granules. *PLoS One*, 8(2), e55342. doi:10.1371/journal.pone.0055342
- Gerstberger, S., Hafner, M., & Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet*, 15(12), 829-845. doi:10.1038/nrg3813
- Ghisolfi, L., Dutt, S., McConkey, M. E., Ebert, B. L., & Anderson, P. (2012). Stress granules contribute to alpha-globin homeostasis in differentiating erythroid cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 420(4), 768-774. doi:10.1016/j.bbrc.2012.03.070
- Ghisolfi, L., Joseph, G., Amalric, F., & Erard, M. (1992). The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *J Biol Chem*, 267(5), 2955-2959.
- Ghosh, S., & Geahlen, R. L. (2015). Stress Granules Modulate SYK to Cause Microglial Cell Dysfunction in Alzheimer's Disease. *EBioMedicine*, 2(11), 1785-1798. doi:10.1016/j.ebiom.2015.09.053
- Gibbins, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., & Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*, 11(9), 1143-1149. doi:10.1038/ncb1929
- Gigoux, V., L'Hoste, S., Raynaud, F., Camonis, J., & Garbay, C. (2002). Identification of Aurora kinases as RasGAP Src homology 3 domain-binding proteins. *J Biol Chem*, 277(26), 23742-23746. doi:10.1074/jbc.C200121200
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L. M., & Anderson, P. (2004). Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell*, 15(12), 5383-5398. doi:10.1091/mbc.e04-08-0715
- Goldstein, L. E., Fisher, A. M., Tagge, C. A., Zhang, X. L., Velisek, L., Sullivan, J. A., . . . McKee, A. C. (2012). Chronic traumatic encephalopathy in blast-exposed military veterans and a blast neurotrauma mouse model. *Sci Transl Med*, 4(134), 134ra160. doi:10.1126/scitranslmed.3003716
- Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2016). Mutant KRAS Enhances Tumor Cell Fitness by Upregulating Stress Granules. *Cell*, 167(7), 1803-1813 e1812. doi:10.1016/j.cell.2016.11.035
- Guitard, E., Parker, F., Millon, R., Abecassis, J., & Tocqué, B. (2001). G3BP is overexpressed in human tumors and promotes S phase entry. *Cancer Letters*, 162(2), 213-221. doi:10.1016/s0304-3835(00)00638-8
- Guo, L., Kim, H. J., Wang, H., Monaghan, J., Freyermuth, F., Sung, J. C., . . . Shorter, J. (2018). Nuclear-Import Receptors Reverse Aberrant Phase Transitions of RNA-Binding Proteins with Prion-like Domains. *Cell*, 173(3), 677-692 e620. doi:10.1016/j.cell.2018.03.002
- Gupta, N., Badeaux, M., Liu, Y., Naxerova, K., Sgroi, D., Munn, L. L., . . . Garkavtsev, I. (2017). Stress granule-associated protein G3BP2 regulates breast tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(5), 1033-1038. doi:10.1073/pnas.1525387114
- Gutierrez-Beltran, E., Moschou, P. N., Smertenko, A. P., & Bozhkov, P. V. (2015). Tudor staphylococcal nuclease links formation of stress granules and processing bodies with mRNA catabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 27(3), 926-943. doi:10.1105/tpc.114.134494
- Gwinn-Hardy, K., Singleton, A., O'Suilleabhain, P., Boss, M., Nicholl, D., Adam, A., . . . Farrer, M. (2001). Spinocerebellar ataxia type 3 phenotypically resembling parkinson disease in a black family. *Arch Neurol*, 58(2), 296-299. doi:10.1001/archneur.58.2.296

- Hart, M. P., & Gitler, A. D. (2012). ALS-associated ataxin 2 polyQ expansions enhance stress-induced caspase 3 activation and increase TDP-43 pathological modifications. *J Neurosci*, *32*(27), 9133-9142. doi:10.1523/JNEUROSCI.0996-12.2012
- Heyd, F., & Lynch, K. W. (2011). Degrade, move, regroup: signaling control of splicing proteins. *Trends Biochem Sci*, *36*(8), 397-404. doi:10.1016/j.tibs.2011.04.003
- Hicke, L. (2001). A New Ticket for Entry into Budding Vesicles—Ubiquitin. *Cell*, *106*(5), 527-530. doi:10.1016/s0092-8674(01)00485-8
- Hoeffler, C. A., & Klann, E. (2010). mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci*, *33*(2), 67-75. doi:10.1016/j.tins.2009.11.003
- Hofweber, M., Hutten, S., Bourgeois, B., Spreitzer, E., Niedner-Boblenz, A., Schifferer, M., . . . Dormann, D. (2018). Phase Separation of FUS Is Suppressed by Its Nuclear Import Receptor and Arginine Methylation. *Cell*, *173*(3), 706-719 e713. doi:10.1016/j.cell.2018.03.004
- Hogan, D. J., Riordan, D. P., Gerber, A. P., Herschlag, D., & Brown, P. O. (2008). Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol*, *6*(10), e255. doi:10.1371/journal.pbio.0060255
- Hong, H. Q., Lu, J., Fang, X. L., Zhang, Y. H., Cai, Y., Yuan, J., . . . Ye, J. T. (2018). G3BP2 is involved in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through activating the NF-kappaB signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin*, *39*(2), 184-194. doi:10.1038/aps.2017.58
- Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., . . . Liao, D. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*, *68*(6), 1067-1081. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.030
- Hottinger, A. F., Azzouz, M., Déglon, N., Aebischer, P., & Zurn, A. D. (2000). Complete and Long-Term Rescue of Lesioned Adult Motoneurons by Lentiviral-Mediated Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in the Facial Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, *20*(15), 5587-5593. doi:10.1523/jneurosci.20-15-05587.2000
- Irvine, K., Stirling, R., Hume, D., & Kennedy, D. (2004). Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. *Int J Dev Biol*, *48*(10), 1065-1077. doi:10.1387/ijdb.041893ki
- Jain, S., Wheeler, J. R., Walters, R. W., Agrawal, A., Barsic, A., & Parker, R. (2016). ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell*, *164*(3), 487-498. doi:10.1016/j.cell.2015.12.038
- Jardim, L. B., Silveira, I., Pereira, M. L., Ferro, A., Alonso, I., do Ceu Moreira, M., . . . Giugliani, R. (2001). A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol*, *248*(10), 870-876. doi:10.1007/s004150170072
- Jarrett, J. T., & Lansbury, P. T. (1993). Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, *73*(6), 1055-1058. doi:10.1016/0092-8674(93)90635-4
- Jedrusik-Bode, M., Studencka, M., Smolka, C., Baumann, T., Schmidt, H., Kampf, J., . . . Bober, E. (2013). The sirtuin SIRT6 regulates stress granule formation in *C. elegans* and mammals. *J Cell Sci*, *126*(Pt 22), 5166-5177. doi:10.1242/jcs.130708
- Johnson, J. O., Pioro, E. P., Boehringer, A., Chia, R., Feit, H., Renton, A. E., . . . Traynor, B. J. (2014). Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*, *17*(5), 664-666. doi:10.1038/nn.3688
- Johnson, M. E., Grassetti, A. V., Taroni, J. N., Lyons, S. M., Schweppe, D., Gordon, J. K., . . . Whitfield, M. L. (2016). Stress granules and RNA processing bodies are novel

- autoantibody targets in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, 18, 27. doi:10.1186/s13075-016-0914-4
- Johnston, J. A., Ward, C. L., & Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, 143(7), 1883-1898. doi:10.1083/jcb.143.7.1883
- Kato, M., Han, T. W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L. C., . . . McKnight, S. L. (2012). Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell*, 149(4), 753-767. doi:10.1016/j.cell.2012.04.017
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., . . . et al. (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet*, 8(3), 221-228. doi:10.1038/ng1194-221
- Kay, B. K., Williamson, M. P., & Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline - rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *The FASEB Journal*, 14(2), 231-241. doi:10.1096/fasebj.14.2.231
- Kedersha, N., & Anderson, P. (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans*, 30(Pt 6), 963-969. doi:10.1042/bst0300963
- Kedersha, N., & Anderson, P. (2009). Chapter 4 Regulation of Translation by Stress Granules and Processing Bodies. In *Translational Control in Health and Disease* (pp. 155-185).
- Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I. J., Stahl, J., & Anderson, P. (2002). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell*, 13(1), 195-210. doi:10.1091/mbc.01-05-0221
- Kedersha, N., Cho, M. R., Li, W., Yacono, P. W., Chen, S., Gilks, N., . . . Anderson, P. (2000). Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol*, 151(6), 1257-1268. doi:10.1083/jcb.151.6.1257
- Kedersha, N., Ivanov, P., & Anderson, P. (2013). Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem Sci*, 38(10), 494-506. doi:10.1016/j.tibs.2013.07.004
- Kedersha, N., Panas, M. D., Achorn, C. A., Lyons, S., Tisdale, S., Hickman, T., . . . Anderson, P. (2016). G3BP-Caprin1-USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. *J Cell Biol*, 212(7), 845-860. doi:10.1083/jcb.201508028
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., . . . Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*, 169(6), 871-884. doi:10.1083/jcb.200502088
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., & Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol*, 147(7), 1431-1442. doi:10.1083/jcb.147.7.1431
- Kenan, D. J., Query, C. C., & Keene, J. D. (1991). RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends in Biochemical Sciences*, 16, 214-220. doi:10.1016/0968-0004(91)90088-d
- Kennedy, D., French, J., Guitard, E., Ru, K., Tocque, B., & Mattick, J. (2001). Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies. *J Cell Biochem*, 84(1), 173-187. doi:10.1002/jcb.1277
- Kim, H. J., Kim, N. C., Wang, Y. D., Scarborough, E. A., Moore, J., Diaz, Z., . . . Taylor, J. P. (2013). Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*, 495(7442), 467-473. doi:10.1038/nature11922

- Kim, H. J., Raphael, A. R., LaDow, E. S., McGurk, L., Weber, R. A., Trojanowski, J. Q., . . . Bonini, N. M. (2014). Therapeutic modulation of eIF2alpha phosphorylation rescues TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models. *Nat Genet*, *46*(2), 152-160. doi:10.1038/ng.2853
- Kim, H. S., Kuwano, Y., Zhan, M., Pullmann, R., Jr., Mazan-Mamczarz, K., Li, H., . . . Wilce, J. A. (2007). Elucidation of a C-rich signature motif in target mRNAs of RNA-binding protein TIAR. *Mol Cell Biol*, *27*(19), 6806-6817. doi:10.1128/MCB.01036-07
- Kim, W. J., Back, S. H., Kim, V., Ryu, I., & Jang, S. K. (2005). Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions. *Mol Cell Biol*, *25*(6), 2450-2462. doi:10.1128/MCB.25.6.2450-2462.2005
- Kobayashi, T., Winslow, S., Sunesson, L., Hellman, U., & Larsson, C. (2012). PKCalpha binds G3BP2 and regulates stress granule formation following cellular stress. *PLoS One*, *7*(4), e35820. doi:10.1371/journal.pone.0035820
- Kociok, N., Esser, P., Unfried, K., Parker, F., Schraermeyer, U., Grisanti, S., . . . Heimann, K. (1999). Upregulation of the RAS-GTPase activating protein (GAP)-binding protein (G3BP) in proliferating RPE cells. *J Cell Biochem*, *74*(2), 194-201.
- Kolobova, E., Efimov, A., Kaverina, I., Rishi, A. K., Schrader, J. W., Ham, A. J., . . . Goldenring, J. R. (2009). Microtubule-dependent association of AKAP350A and CCAR1 with RNA stress granules. *Exp Cell Res*, *315*(3), 542-555. doi:10.1016/j.yexcr.2008.11.011
- Koyano, S., Yagishita, S., Kuroiwa, Y., Tanaka, F., & Uchihara, T. (2014). Neuropathological staging of spinocerebellar ataxia type 2 by semiquantitative 1C2-positive neuron typing. Nuclear translocation of cytoplasmic 1C2 underlies disease progression of spinocerebellar ataxia type 2. *Brain Pathol*, *24*(6), 599-606. doi:10.1111/bpa.12146
- Kraft, S., Furtado, S., Ranawaya, R., Parboosingh, J., Bleoo, S., McElligott, K., . . . Suchowersky, O. (2005). Adult onset spinocerebellar ataxia in a Canadian movement disorders clinic. *Can J Neurol Sci*, *32*(4), 450-458. doi:10.1017/s0317167100004431
- Krichevsky, A. M., & Kosik, K. S. (2001). Neuronal RNA Granules. *Neuron*, *32*(4), 683-696. doi:10.1016/s0896-6273(01)00508-6
- Kwiatkowski, T. J., Jr., Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., . . . Brown, R. H., Jr. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, *323*(5918), 1205-1208. doi:10.1126/science.1166066
- Kwok, H. H., Poon, P. Y., Mak, K. H., Zhang, L. Y., Liu, P., Zhang, H., . . . Wong, R. N. (2017). Role of G3BP1 in glucocorticoid receptor-mediated microRNA-15b and microRNA-23a biogenesis in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*, *74*(19), 3613-3630. doi:10.1007/s00018-017-2540-y
- Kwon, S., Zhang, Y., & Matthias, P. (2007). The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev*, *21*(24), 3381-3394. doi:10.1101/gad.461107
- Lachke, S. A., Alkuraya, F. S., Kneeland, S. C., Ohn, T., Aboukhalil, A., Howell, G. R., . . . Maas, R. L. (2011). Mutations in the RNA granule component TDRD7 cause cataract and glaucoma. *Science*, *331*(6024), 1571-1576. doi:10.1126/science.1195970
- Lastres-Becker, I., Nonis, D., Eich, F., Klinkenberg, M., Gorospe, M., Kotter, P., . . . Auburger, G. (2016). Mammalian ataxin-2 modulates translation control at the pre-initiation complex via PI3K/mTOR and is induced by starvation. *Biochim Biophys Acta*, *1862*(9), 1558-1569. doi:10.1016/j.bbadis.2016.05.017
- Lee, C.-H., Saksela, K., Mirza, U. A., Chait, B. T., & Kuriyan, J. (1996). Crystal Structure of the Conserved Core of HIV-1 Nef Complexed with a Src Family SH3 Domain. *Cell*, *85*(6), 931-942. doi:10.1016/s0092-8674(00)81276-3

- Leung, A. K., Vyas, S., Rood, J. E., Bhutkar, A., Sharp, P. A., & Chang, P. (2011). Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. *Mol Cell*, *42*(4), 489-499. doi:10.1016/j.molcel.2011.04.015
- Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R. N., & Chakravarti, D. (2002). Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem*, *277*(47), 45004-45012. doi:10.1074/jbc.M205259200
- Li, W., Simarro, M., Kedersha, N., & Anderson, P. (2004). FAST is a survival protein that senses mitochondrial stress and modulates TIA-1-regulated changes in protein expression. *Mol Cell Biol*, *24*(24), 10718-10732. doi:10.1128/MCB.24.24.10718-10732.2004
- Li, Y. R., King, O. D., Shorter, J., & Gitler, A. D. (2013). Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J Cell Biol*, *201*(3), 361-372. doi:10.1083/jcb.201302044
- Lin, Y., Protter, D. S., Rosen, M. K., & Parker, R. (2015). Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. *Mol Cell*, *60*(2), 208-219. doi:10.1016/j.molcel.2015.08.018
- Liu-Yesucevitz, L., Bassell, G. J., Gitler, A. D., Hart, A. C., Klann, E., Richter, J. D., . . . Wolozin, B. (2011). Local RNA translation at the synapse and in disease. *J Neurosci*, *31*(45), 16086-16093. doi:10.1523/JNEUROSCI.4105-11.2011
- Liu-Yesucevitz, L., Bilgutay, A., Zhang, Y. J., Vanderweyde, T., Citro, A., Mehta, T., . . . Wolozin, B. (2010). Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One*, *5*(10), e13250. doi:10.1371/journal.pone.0013250
- Liu, Y. F., Deth, R. C., & Devys, D. (1997). SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signaling complexes. *J Biol Chem*, *272*(13), 8121-8124. doi:10.1074/jbc.272.13.8121
- Lopez de Silanes, I., Galban, S., Martindale, J. L., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., Indig, F. E., . . . Gorospe, M. (2005). Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol*, *25*(21), 9520-9531. doi:10.1128/MCB.25.21.9520-9531.2005
- Lopez de Silanes, I., Zhan, M., Lal, A., Yang, X., & Gorospe, M. (2004). Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 2987-2992. doi:10.1073/pnas.0306453101
- Lorenzetti, D., Bohlega, S., & Zoghbi, H. Y. (1997). The expansion of the CAG repeat in ataxin-2 is a frequent cause of autosomal dominant spinocerebellar ataxia. *Neurology*, *49*(4), 1009-1013. doi:10.1212/wnl.49.4.1009
- Lowy, D. R., & Willumsen, B. M. (1993). Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem*, *62*, 851-891. doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.004223
- Lu, C. S., Chang, H. C., Kuo, P. C., Liu, Y. L., Wu, W. S., Weng, Y. H., . . . Chou, Y. H. (2004). The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 3 in a Taiwanese family. *Parkinsonism Relat Disord*, *10*(6), 369-373. doi:10.1016/j.parkreldis.2004.03.009
- Lukong, K. E., Chang, K. W., Khandjian, E. W., & Richard, S. (2008). RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet*, *24*(8), 416-425. doi:10.1016/j.tig.2008.05.004
- Macara, I. G. (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev*, *65*(4), 570-594, table of contents. doi:10.1128/MMBR.65.4.570-594.2001
- Maciel, P., Costa, M. C., Ferro, A., Rousseau, M., Santos, C. S., Gaspar, C., . . . Sequeiros, J. (2001). Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, *58*(11), 1821-1827. doi:10.1001/archneur.58.11.1821

- Mackenzie, I. R., Nicholson, A. M., Sarkar, M., Messing, J., Purice, M. D., Pottier, C., . . . Rademakers, R. (2017). TIA1 Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Promote Phase Separation and Alter Stress Granule Dynamics. *Neuron*, *95*(4), 808-816 e809. doi:10.1016/j.neuron.2017.07.025
- Mahboubi, H., & Stochaj, U. (2017). Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, *1863*(4), 884-895. doi:10.1016/j.bbadis.2016.12.022
- Markmiller, S., Soltanieh, S., Server, K. L., Mak, R., Jin, W., Fang, M. Y., . . . Yeo, G. W. (2018). Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules. *Cell*, *172*(3), 590-604 e513. doi:10.1016/j.cell.2017.12.032
- Marrone, L., Poser, I., Casci, I., Japtok, J., Reinhardt, P., Janosch, A., . . . Sternecker, J. L. (2018). Isogenic FUS-eGFP iPSC Reporter Lines Enable Quantification of FUS Stress Granule Pathology that Is Rescued by Drugs Inducing Autophagy. *Stem Cell Reports*, *10*(2), 375-389. doi:10.1016/j.stemcr.2017.12.018
- Martin, S., Zekri, L., Metz, A., Maurice, T., Chebli, K., Vignes, M., & Tazi, J. (2013). Deficiency of G3BP1, the stress granules assembly factor, results in abnormal synaptic plasticity and calcium homeostasis in neurons. *J Neurochem*, *125*(2), 175-184. doi:10.1111/jnc.12189
- Maruyama, H., Izumi, Y., Morino, H., Oda, M., Toji, H., Nakamura, S., & Kawakami, H. (2002). Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: a study of 1,286 Japanese patients. *Am J Med Genet*, *114*(5), 578-583. doi:10.1002/ajmg.10514
- Masino, L., Musi, V., Menon, R. P., Fusi, P., Kelly, G., Frenkiel, T. A., . . . Pastore, A. (2003). Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Letters*, *549*(1-3), 21-25. doi:10.1016/s0014-5793(03)00748-8
- Matos, C. A., de Almeida, L. P., & Nobrega, C. (2019). Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy. *J Neurochem*, *148*(1), 8-28. doi:10.1111/jnc.14541
- Matos, C. A., Nobrega, C., Louros, S. R., Almeida, B., Ferreira, E., Valero, J., . . . Carvalho, A. L. (2016). Ataxin-3 phosphorylation decreases neuronal defects in spinocerebellar ataxia type 3 models. *J Cell Biol*, *212*(4), 465-480. doi:10.1083/jcb.201506025
- Matsuki, H., Takahashi, M., Higuchi, M., Makokha, G. N., Oie, M., & Fujii, M. (2013). Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes Cells*, *18*(2), 135-146. doi:10.1111/gtc.12023
- Mayeda, A., Munroe, S. H., Caceres, J. F., & Krainer, A. R. (1994). Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins. *EMBO J*, *13*(22), 5483-5495.
- Mazroui, R., Huot, M. E., Tremblay, S., Fillion, C., Labelle, Y., & Khandjian, E. W. (2002). Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet*, *11*(24), 3007-3017. doi:10.1093/hmg/11.24.3007
- Mazzucchelli, S., De Palma, A., Riva, M., D'Urzo, A., Pozzi, C., Pastori, V., . . . Regonesi, M. E. (2009). Proteomic and biochemical analyses unveil tight interaction of ataxin-3 with tubulin. *Int J Biochem Cell Biol*, *41*(12), 2485-2492. doi:10.1016/j.biocel.2009.08.003
- McCampbell, A., Taylor, J. P., Taye, A. A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., . . . Fischbeck, K. H. (2000). CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet*, *9*(14), 2197-2202. doi:10.1093/hmg/9.14.2197
- McDonald, K. K., Aulas, A., Destroismaisons, L., Pickles, S., Beleac, E., Camu, W., . . . Vande Velde, C. (2011). TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress

- granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum Mol Genet*, 20(7), 1400-1410. doi:10.1093/hmg/ddr021
- Merchant, M. L., Perkins, B. A., Boratyn, G. M., Ficociello, L. H., Wilkey, D. W., Barati, M. T., . . . Klein, J. B. (2009). Urinary peptidome may predict renal function decline in type 1 diabetes and microalbuminuria. *J Am Soc Nephrol*, 20(9), 2065-2074. doi:10.1681/ASN.2008121233
- Mittag, T., & Parker, R. (2018). Multiple Modes of Protein-Protein Interactions Promote RNP Granule Assembly. *J Mol Biol*, 430(23), 4636-4649. doi:10.1016/j.jmb.2018.08.005
- Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A. P., Kim, H. J., . . . Taylor, J. P. (2015). Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell*, 163(1), 123-133. doi:10.1016/j.cell.2015.09.015
- Monahan, Z., Ryan, V. H., Janke, A. M., Burke, K. A., Rhoads, S. N., Zerbe, G. H., . . . Fawzi, N. L. (2017). Phosphorylation of the FUS low-complexity domain disrupts phase separation, aggregation, and toxicity. *EMBO J*, 36(20), 2951-2967. doi:10.15252/embj.201696394
- Moseley, M. L., Benzow, K. A., Schut, L. J., Bird, T. D., Gomez, C. M., Barkhaus, P. E., . . . Ranum, L. P. (1998). Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. *Neurology*, 51(6), 1666-1671. doi:10.1212/wnl.51.6.1666
- Moutaoufik, M. T., El Fatimy, R., Nassour, H., Gareau, C., Lang, J., Tanguay, R. M., . . . Khandjian, E. W. (2014). UVC-induced stress granules in mammalian cells. *PLoS One*, 9(11), e112742. doi:10.1371/journal.pone.0112742
- Munchel, S. E., Shultzaberger, R. K., Takizawa, N., & Weis, K. (2011). Dynamic profiling of mRNA turnover reveals gene-specific and system-wide regulation of mRNA decay. *Mol Biol Cell*, 22(15), 2787-2795. doi:10.1091/mbc.E11-01-0028
- Murakami, T., Qamar, S., Lin, J. Q., Schierle, G. S., Rees, E., Miyashita, A., . . . St George-Hyslop, P. (2015). ALS/FTD Mutation-Induced Phase Transition of FUS Liquid Droplets and Reversible Hydrogels into Irreversible Hydrogels Impairs RNP Granule Function. *Neuron*, 88(4), 678-690. doi:10.1016/j.neuron.2015.10.030
- Nagai, K., Oubridge, C., Ito, N., Avis, J., & Evans, P. (1995). The RNP domain: a sequence-specific RNA-binding domain involved in processing and transport of RNA. *Trends Biochem Sci*, 20(6), 235-240. doi:10.1016/s0968-0004(00)89024-6
- Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H. A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., . . . Toda, T. (2007). A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol*, 14(4), 332-340. doi:10.1038/nsmb1215
- Nascimento-Ferreira, I., Nobrega, C., Vasconcelos-Ferreira, A., Onofre, I., Albuquerque, D., Aveleira, C., . . . Pereira de Almeida, L. (2013). Beclin 1 mitigates motor and neuropathological deficits in genetic mouse models of Machado-Joseph disease. *Brain*, 136(Pt 7), 2173-2188. doi:10.1093/brain/awt144
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., . . . Lee, V. M. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796), 130-133. doi:10.1126/science.1134108
- Ng, C. S., Jogi, M., Yoo, J. S., Onomoto, K., Koike, S., Iwasaki, T., . . . Fujita, T. (2013). Encephalomyocarditis virus disrupts stress granules, the critical platform for triggering antiviral innate immune responses. *J Virol*, 87(17), 9511-9522. doi:10.1128/JVI.03248-12

- Nichols, R. C., Wang, X. W., Tang, J., Hamilton, B. J., High, F. A., Herschman, H. R., & Rigby, W. F. (2000). The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization. *Exp Cell Res*, 256(2), 522-532. doi:10.1006/excr.2000.4827
- Nizami, Z., Deryusheva, S., & Gall, J. G. (2010). The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(7), a000653. doi:10.1101/cshperspect.a000653
- Nóbrega, C., Carmo-Silva, S., Albuquerque, D., Vasconcelos-Ferreira, A., Vijayakumar, U. G., Mendonca, L., . . . de Almeida, L. P. (2015). Re-establishing ataxin-2 downregulates translation of mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain*, 138(Pt 12), 3537-3554. doi:10.1093/brain/awv298
- Nobrega, C., Nascimento-Ferreira, I., Onofre, I., Albuquerque, D., Conceicao, M., Deglon, N., & de Almeida, L. P. (2013a). Overexpression of mutant ataxin-3 in mouse cerebellum induces ataxia and cerebellar neuropathology. *Cerebellum*, 12(4), 441-455. doi:10.1007/s12311-012-0432-0
- Nobrega, C., Nascimento-Ferreira, I., Onofre, I., Albuquerque, D., Hirai, H., Deglon, N., & de Almeida, L. P. (2013b). Silencing mutant ataxin-3 rescues motor deficits and neuropathology in Machado-Joseph disease transgenic mice. *PLoS One*, 8(1), e52396. doi:10.1371/journal.pone.0052396
- Nover, L., Scharf, K. D., & Neumann, D. (1983). Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol Cell Biol*, 3(9), 1648-1655. doi:10.1128/mcb.3.9.1648
- Nunes, C., Mestre, I., Marcelo, A., Koppenol, R., Matos, C. A., & Nobrega, C. (2019). MSGP: the first database of the protein components of the mammalian stress granules. *Database (Oxford)*, 2019. doi:10.1093/database/baz031
- Ohn, T., Kedersha, N., Hickman, T., Tisdale, S., & Anderson, P. (2008). A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat Cell Biol*, 10(10), 1224-1231. doi:10.1038/ncb1783
- Onomoto, K., Jogi, M., Yoo, J. S., Narita, R., Morimoto, S., Takemura, A., . . . Fujita, T. (2012). Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS One*, 7(8), e43031. doi:10.1371/journal.pone.0043031
- Orr, H. T., & Zoghbi, H. Y. (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci*, 30, 575-621. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.113042
- Ortega, A. D., Willers, I. M., Sala, S., & Cuezva, J. M. (2010). Human G3BP1 interacts with beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *J Cell Sci*, 123(Pt 16), 2685-2696. doi:10.1242/jcs.065920
- Oue, M., Mitsumura, K., Torashima, T., Koyama, C., Yamaguchi, H., Furuya, N., & Hirai, H. (2009). Characterization of mutant mice that express polyglutamine in cerebellar Purkinje cells. *Brain Res*, 1255, 9-17. doi:10.1016/j.brainres.2008.12.014
- Pamonsinlapatham, P., Hadj-Slimane, R., Lepelletier, Y., Allain, B., Toccafondi, M., Garbay, C., & Raynaud, F. (2009). p120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): a multi-interacting protein in downstream signaling. *Biochimie*, 91(3), 320-328. doi:10.1016/j.biochi.2008.10.010
- Panas, M. D., Ivanov, P., & Anderson, P. (2016). Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics. *J Cell Biol*, 215(3), 313-323. doi:10.1083/jcb.201609081
- Panas, M. D., Schulte, T., Thaa, B., Sandalova, T., Kedersha, N., Achour, A., & McInerney, G. M. (2015). Viral and cellular proteins containing FGDF motifs bind G3BP to block stress granule formation. *PLoS Pathog*, 11(2), e1004659. doi:10.1371/journal.ppat.1004659

- Parker, F., Maurier, F., Delumeau, I., Duchesne, M., Faucher, D., Debussche, L., . . . Tocque, B. (1996). A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein. *Mol Cell Biol*, *16*(6), 2561-2569. doi:10.1128/mcb.16.6.2561
- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*, *25*(5), 635-646. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.011
- Patel, A., Lee, H. O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M. Y., . . . Alberti, S. (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell*, *162*(5), 1066-1077. doi:10.1016/j.cell.2015.07.047
- Paulson, H. L., Perez, M. K., Trotter, Y., Trojanowski, J. Q., Subramony, S. H., Das, S. S., . . . Pittman, R. N. (1997). Intracellular Inclusions of Expanded Polyglutamine Protein in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuron*, *19*(2), 333-344. doi:10.1016/s0896-6273(00)80943-5
- Piotrowska, J., Hansen, S. J., Park, N., Jamka, K., Sarnow, P., & Gustin, K. E. (2010). Stable formation of compositionally unique stress granules in virus-infected cells. *J Virol*, *84*(7), 3654-3665. doi:10.1128/JVI.01320-09
- Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2011). The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in ALS. *Cell*, *147*(3), 498-508. doi:10.1016/j.cell.2011.10.011
- Pothof, J., Verkaik, N. S., Hoeijmakers, J. H., & van Gent, D. C. (2009). MicroRNA responses and stress granule formation modulate the DNA damage response. *Cell Cycle*, *8*(21), 3462-3468. doi:10.4161/cc.8.21.9835
- Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*, *78*, 959-991. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.114844
- Prilusky, J., Felder, C. E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E. H., Man, O., Beckmann, J. S., . . . Sussman, J. L. (2005). FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics*, *21*(16), 3435-3438. doi:10.1093/bioinformatics/bti537
- Protter, D. S. W., & Parker, R. (2016). Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol*, *26*(9), 668-679. doi:10.1016/j.tcb.2016.05.004
- Protter, D. S. W., Rao, B. S., Van Treck, B., Lin, Y., Mizoue, L., Rosen, M. K., & Parker, R. (2018). Intrinsically Disordered Regions Can Contribute Promiscuous Interactions to RNP Granule Assembly. *Cell Rep*, *22*(6), 1401-1412. doi:10.1016/j.celrep.2018.01.036
- Qamar, S., Wang, G., Randle, S. J., Ruggeri, F. S., Varela, J. A., Lin, J. Q., . . . St George-Hyslop, P. (2018). FUS Phase Separation Is Modulated by a Molecular Chaperone and Methylation of Arginine Cation-pi Interactions. *Cell*, *173*(3), 720-734 e715. doi:10.1016/j.cell.2018.03.056
- Radford, H., Moreno, J. A., Verity, N., Halliday, M., & Mallucci, G. R. (2015). PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol*, *130*(5), 633-642. doi:10.1007/s00401-015-1487-z
- Rajgor, D., & Shanahan, C. M. (2014). RNA granules and cytoskeletal links. *Biochem Soc Trans*, *42*(4), 1206-1210. doi:10.1042/BST20140067
- Ramirez, D. M., Andersson, S., & Russell, D. W. (2008). Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J Comp Neurol*, *507*(5), 1676-1693. doi:10.1002/cne.21605
- Reineke, L. C., Dougherty, J. D., Pierre, P., & Lloyd, R. E. (2012). Large G3BP-induced granules trigger eIF2alpha phosphorylation. *Mol Biol Cell*, *23*(18), 3499-3510. doi:10.1091/mbc.E12-05-0385

- Reineke, L. C., Kedersha, N., Langereis, M. A., van Kuppeveld, F. J., & Lloyd, R. E. (2015). Stress granules regulate double-stranded RNA-dependent protein kinase activation through a complex containing G3BP1 and Caprin1. *mBio*, 6(2), e02486. doi:10.1128/mBio.02486-14
- Reineke, L. C., & Lloyd, R. E. (2015). The stress granule protein G3BP1 recruits protein kinase R to promote multiple innate immune antiviral responses. *J Virol*, 89(5), 2575-2589. doi:10.1128/JVI.02791-14
- Reineke, L. C., Tsai, W. C., Jain, A., Kaelber, J. T., Jung, S. Y., & Lloyd, R. E. (2017). Casein Kinase 2 Is Linked to Stress Granule Dynamics through Phosphorylation of the Stress Granule Nucleating Protein G3BP1. *Mol Cell Biol*, 37(4). doi:10.1128/MCB.00596-16
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M., & Gorlich, D. (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J*, 17(22), 6587-6598. doi:10.1093/emboj/17.22.6587
- Riess, O., Rub, U., Pastore, A., Bauer, P., & Schols, L. (2008). SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum*, 7(2), 125-137. doi:10.1007/s12311-008-0013-4
- Rodrigues, A. J., do Carmo Costa, M., Silva, T. L., Ferreira, D., Bajanca, F., Logarinho, E., & Maciel, P. (2010). Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1803(10), 1154-1163. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.07.004
- Saksela, K., Cheng, G., & Baltimore, D. (1995). Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J*, 14(3), 484-491.
- Sama, R. R., Ward, C. L., Kaushansky, L. J., Lemay, N., Ishigaki, S., Urano, F., & Bosco, D. A. (2013). FUS/TLS assembles into stress granules and is a prosurvival factor during hyperosmolar stress. *J Cell Physiol*, 228(11), 2222-2231. doi:10.1002/jcp.24395
- Savino, T. M., Gebrane-Younes, J., De Mey, J., Sibarita, J. B., & Hernandez-Verdun, D. (2001). Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol*, 153(5), 1097-1110. doi:10.1083/jcb.153.5.1097
- Schmidt, T., Landwehrmeyer, G. B., Schmitt, I., Trottier, Y., Auburger, G., Laccone, F., . . . Riess, O. (1998). An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol*, 8(4), 669-679. doi:10.1111/j.1750-3639.1998.tb00193.x
- Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., & Riess, O. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *The Lancet Neurology*, 3(5), 291-304. doi:10.1016/s1474-4422(04)00737-9
- Schratt, G. (2009). microRNAs at the synapse. *Nat Rev Neurosci*, 10(12), 842-849. doi:10.1038/nrn2763
- Schwab, C., Arai, T., Hasegawa, M., Yu, S., & McGeer, P. L. (2008). Colocalization of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 and huntingtin in inclusions of Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67(12), 1159-1165. doi:10.1097/NEN.0b013e31818e8951
- Schwartz, J. C., Wang, X., Podell, E. R., & Cech, T. R. (2013). RNA seeds higher-order assembly of FUS protein. *Cell Rep*, 5(4), 918-925. doi:10.1016/j.celrep.2013.11.017
- Shao, J., & Diamond, M. I. (2007). Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet*, 16 Spec No. 2, R115-123. doi:10.1093/hmg/ddm213
- Shibata-Hamaguchi, A., Ishida, C., Iwasa, K., & Yamada, M. (2009). Prevalence of spinocerebellar degenerations in the Hokuriku district in Japan. *Neuroepidemiology*, 32(3), 176-183. doi:10.1159/000195686

- Shukla, S., & Parker, R. (2016). Hypo- and Hyper-Assembly Diseases of RNA-Protein Complexes. *Trends Mol Med*, 22(7), 615-628. doi:10.1016/j.molmed.2016.05.005
- Silva-Fernandes, A., Costa Mdo, C., Duarte-Silva, S., Oliveira, P., Botelho, C. M., Martins, L., . . . Maciel, P. (2010). Motor uncoordination and neuropathology in a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease lacking intranuclear inclusions and ataxin-3 cleavage products. *Neurobiol Dis*, 40(1), 163-176. doi:10.1016/j.nbd.2010.05.021
- Silveira, I., Coutinho, P., Maciel, P., Gaspar, C., Hayes, S., Dias, A., . . . Rouleau, G. A. (1998). Analysis of SCA1, DRPLA, MJD, SCA2, and SCA6 CAG repeats in 48 portuguese ataxia families. *American Journal of Medical Genetics*, 81(2), 134-138. doi:10.1002/(sici)1096-8628(19980328)81:2<134::Aid-ajmg3>3.0.Co;2-w
- Solomon, S., Xu, Y., Wang, B., David, M. D., Schubert, P., Kennedy, D., & Schrader, J. W. (2007). Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha, entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. *Mol Cell Biol*, 27(6), 2324-2342. doi:10.1128/MCB.02300-06
- Somasekharan, S. P., El-Naggar, A., Leprievier, G., Cheng, H., Hajee, S., Grunewald, T. G., . . . Sorensen, P. H. (2015). YB-1 regulates stress granule formation and tumor progression by translationally activating G3BP1. *J Cell Biol*, 208(7), 913-929. doi:10.1083/jcb.201411047
- Soncini, C., Berdo, I., & Draetta, G. (2001). Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease. *Oncogene*, 20(29), 3869-3879. doi:10.1038/sj.onc.1204553
- Souquere, S., Mollet, S., Kress, M., Dautry, F., Pierron, G., & Weil, D. (2009). Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *J Cell Sci*, 122(Pt 20), 3619-3626. doi:10.1242/jcs.054437
- Spector, D. L., & Lamond, A. I. (2011). Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(2). doi:10.1101/cshperspect.a000646
- Sreedharan, J., Blair, I. P., Tripathi, V. B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., . . . Shaw, C. E. (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 319(5870), 1668-1672. doi:10.1126/science.1154584
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol*, 156(6), 1051-1063. doi:10.1083/jcb.200108057
- Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W. F., Blackwell, T. K., & Anderson, P. (2004). MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J*, 23(6), 1313-1324. doi:10.1038/sj.emboj.7600163
- Storey, E., du Sart, D., Shaw, J. H., Lorentzos, P., Kelly, L., McKinley Gardner, R. J., . . . Nicholson, G. A. (2000). Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia. *American Journal of Medical Genetics*, 95(4), 351-358. doi:10.1002/1096-8628(20001211)95:4<351::Aid-ajmg10>3.0.Co;2-r
- Subramony, S. H., Hernandez, D., Adam, A., Smith-Jefferson, S., Hussey, J., Gwinn-Hardy, K., . . . Singleton, A. (2002). Ethnic differences in the expression of neurodegenerative disease: Machado-Joseph disease in Africans and Caucasians. *Mov Disord*, 17(5), 1068-1071. doi:10.1002/mds.10241
- Sudarsky, L., & Coutinho, P. (1995). Machado-Joseph disease. *Clin Neurosci*, 3(1), 17-22.
- Sun, J., Xu, H., Negi, S., Subramony, S. H., & Hebert, M. D. (2007). Differential effects of polyglutamine proteins on nuclear organization and artificial reporter splicing. *J Neurosci Res*, 85(11), 2306-2317. doi:10.1002/jnr.21369

- Suyama, M., Doerks, T., Braun, I. C., Sattler, M., Izaurralde, E., & Bork, P. (2000). Prediction of structural domains of TAP reveals details of its interaction with p15 and nucleoporins. *EMBO Rep*, *1*(1), 53-58. doi:10.1093/embo-reports/kvd009
- Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Kawashima, S., Sakamoto, H., Karube, Y., . . . et al. (1993). The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet*, *4*(3), 300-304. doi:10.1038/ng0793-300
- Taylor, J. P., Tanaka, F., Robitschek, J., Sandoval, C. M., Taye, A., Markovic-Plese, S., & Fischbeck, K. H. (2003). Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet*, *12*(7), 749-757. doi:10.1093/hmg/ddg074
- Thiyagarajan, N., Ferguson, R., Subramanian, V., & Acharya, K. R. (2012). Structural and molecular insights into the mechanism of action of human angiogenin-ALS variants in neurons. *Nat Commun*, *3*, 1121. doi:10.1038/ncomms2126
- Thomas, M. G., Loschi, M., Desbats, M. A., & Boccaccio, G. L. (2011). RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell Signal*, *23*(2), 324-334. doi:10.1016/j.cellsig.2010.08.011
- Thomas, M. G., Martinez Tosar, L. J., Desbats, M. A., Leishman, C. C., & Boccaccio, G. L. (2009). Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J Cell Sci*, *122*(Pt 4), 563-573. doi:10.1242/jcs.038208
- Tomé, S. M. O. (2016). *Insights into the role of Stress Granules in Spinocerebellar ataxias*. (Master degree), Universidade de Coimbra,
- Toombs, J. A., Petri, M., Paul, K. R., Kan, G. Y., Ben-Hur, A., & Ross, E. D. (2012). De novo design of synthetic prion domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(17), 6519-6524. doi:10.1073/pnas.1119366109
- Torashima, T., Koyama, C., Iizuka, A., Mitsumura, K., Takayama, K., Yanagi, S., . . . Hirai, H. (2008). Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. *EMBO Rep*, *9*(4), 393-399. doi:10.1038/embor.2008.31
- Tourriere, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J. M., Bertrand, E., & Tazi, J. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol*, *160*(6), 823-831. doi:10.1083/jcb.200212128
- Tourriere, H., Gallouzi, I. E., Chebli, K., Capony, J. P., Mouaikel, J., van der Geer, P., & Tazi, J. (2001). RasGAP-associated endoribonuclease G3BP: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol*, *21*(22), 7747-7760. doi:10.1128/MCB.21.22.7747-7760.2001
- Trottier, Y., Cancel, G., An-Gourfinkel, I., Lutz, Y., Weber, C., Brice, A., . . . Mandel, J. L. (1998). Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3. *Neurobiol Dis*, *5*(5), 335-347. doi:10.1006/nbdi.1998.0208
- Tsai, W. C., Gayatri, S., Reineke, L. C., Sbardella, G., Bedford, M. T., & Lloyd, R. E. (2016). Arginine Demethylation of G3BP1 Promotes Stress Granule Assembly. *J Biol Chem*, *291*(43), 22671-22685. doi:10.1074/jbc.M116.739573
- Uniacke, J., & Zerges, W. (2008). Stress induces the assembly of RNA granules in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol*, *182*(4), 641-646. doi:10.1083/jcb.200805125
- Vale, J., Bugalho, P., Silveira, I., Sequeiros, J., Guimaraes, J., & Coutinho, P. (2010). Autosomal dominant cerebellar ataxia: frequency analysis and clinical characterization of 45 families from Portugal. *Eur J Neurol*, *17*(1), 124-128. doi:10.1111/j.1468-1331.2009.02757.x
- Van Treeck, B., & Parker, R. (2018). Emerging Roles for Intermolecular RNA-RNA Interactions in RNP Assemblies. *Cell*, *174*(4), 791-802. doi:10.1016/j.cell.2018.07.023

- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., . . . Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, 323(5918), 1208-1211. doi:10.1126/science.1165942
- Vanderweyde, T., Apicco, D. J., Youmans-Kidder, K., Ash, P. E. A., Cook, C., Lummertz da Rocha, E., . . . Wolozin, B. (2016). Interaction of tau with the RNA-Binding Protein TIA1 Regulates tau Pathophysiology and Toxicity. *Cell Rep*, 15(7), 1455-1466. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.045
- Vanderweyde, T., Youmans, K., Liu-Yesucevitz, L., & Wolozin, B. (2013). Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: a mini-review. *Gerontology*, 59(6), 524-533. doi:10.1159/000354170
- Vanderweyde, T., Yu, H., Varnum, M., Liu-Yesucevitz, L., Citro, A., Ikezu, T., . . . Wolozin, B. (2012). Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies. *J Neurosci*, 32(24), 8270-8283. doi:10.1523/JNEUROSCI.1592-12.2012
- Vognsen, T., Moller, I. R., & Kristensen, O. (2013). Crystal structures of the human G3BP1 NTF2-like domain visualize FxFG Nup repeat specificity. *PLoS One*, 8(12), e80947. doi:10.1371/journal.pone.0080947
- Warrick, J. M., Paulson, H. L., Gray-Board, G. L., Bui, Q. T., Fischbeck, K. H., Pittman, R. N., & Bonini, N. M. (1998). Expanded Polyglutamine Protein Forms Nuclear Inclusions and Causes Neural Degeneration in Drosophila. *Cell*, 93(6), 939-949. doi:10.1016/s0092-8674(00)81200-3
- Wei, S. C., Fattet, L., Tsai, J. H., Guo, Y., Pai, V. H., Majeski, H. E., . . . Yang, J. (2015). Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat Cell Biol*, 17(5), 678-688. doi:10.1038/ncb3157
- Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(3), 169-178. doi:10.1038/35056563
- Wek, R. C., Jiang, H. Y., & Anthony, T. G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochemical Society Transactions*, 34(1), 7-11. doi:10.1042/bst0340007
- Wheeler, J. R., Jain, S., Khong, A., & Parker, R. (2017). Isolation of yeast and mammalian stress granule cores. *Methods*, 126, 12-17. doi:10.1016/j.ymeth.2017.04.020
- Wheeler, J. R., Matheny, T., Jain, S., Abrisch, R., & Parker, R. (2016). Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *Elife*, 5. doi:10.7554/eLife.18413
- White, J. P., Cardenas, A. M., Marissen, W. E., & Lloyd, R. E. (2007). Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase. *Cell Host Microbe*, 2(5), 295-305. doi:10.1016/j.chom.2007.08.006
- Winslow, S., Leandersson, K., & Larsson, C. (2013). Regulation of PMP22 mRNA by G3BP1 affects cell proliferation in breast cancer cells. *Mol Cancer*, 12(1), 156. doi:10.1186/1476-4598-12-156
- Wolozin, B. (2012). Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Mol Neurodegener*, 7, 56. doi:10.1186/1750-1326-7-56
- Wolozin, B. (2014). Physiological protein aggregation run amuck: stress granules and the genesis of neurodegenerative disease. *Discov Med*, 17(91), 47-52.
- Wolozin, B., & Ivanov, P. (2019). Stress granules and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 20(11), 649-666. doi:10.1038/s41583-019-0222-5
- Yamazaki, T., Chen, S., Yu, Y., Yan, B., Haertlein, T. C., Carrasco, M. A., . . . Reed, R. (2012). FUS-SMN protein interactions link the motor neuron diseases ALS and SMA. *Cell Rep*, 2(4), 799-806. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.025

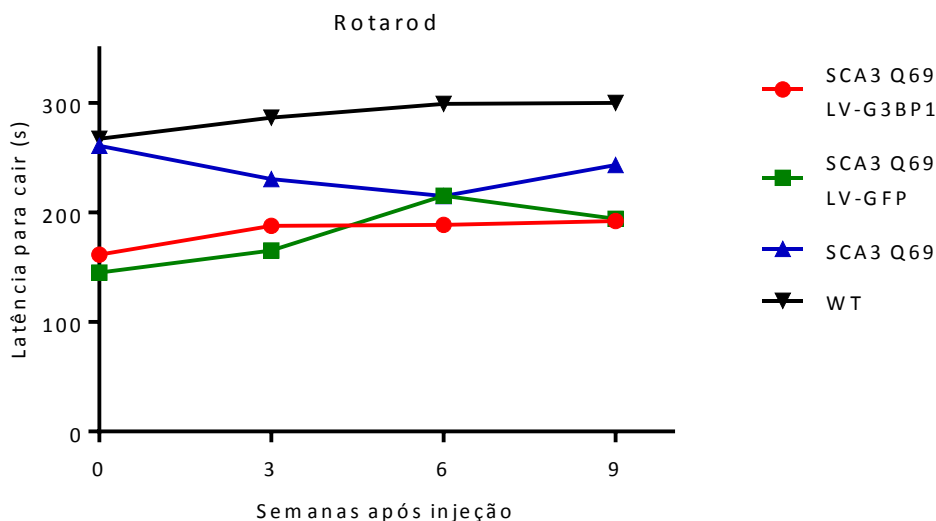
- Yoo, J. S., Takahasi, K., Ng, C. S., Ouda, R., Onomoto, K., Yoneyama, M., . . . Fujita, T. (2014). DHX36 enhances RIG-I signaling by facilitating PKR-mediated antiviral stress granule formation. *PLoS Pathog*, *10*(3), e1004012. doi:10.1371/journal.ppat.1004012
- Youmans, K. L., & Wolozin, B. (2012). TDP-43: a new player on the AD field? *Exp Neurol*, *237*(1), 90-95. doi:10.1016/j.expneurol.2012.05.018
- Zekri, L., Chebli, K., Tourriere, H., Nielsen, F. C., Hansen, T. V., Rami, A., & Tazi, J. (2005). Control of fetal growth and neonatal survival by the RasGAP-associated endoribonuclease G3BP. *Mol Cell Biol*, *25*(19), 8703-8716. doi:10.1128/MCB.25.19.8703-8716.2005
- Zhang, C. H., Wang, J. X., Cai, M. L., Shao, R., Liu, H., & Zhao, W. L. (2019). The roles and mechanisms of G3BP1 in tumour promotion. *J Drug Target*, *27*(3), 300-305. doi:10.1080/1061186X.2018.1523415
- Zhang, H., Ma, Y., Zhang, S., Liu, H., He, H., Li, N., . . . Shao, R. G. (2015). Involvement of Ras GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1 in the epithelial-to-mesenchymal transition-induced metastasis of breast cancer cells via the Smad signaling pathway. *Oncotarget*, *6*(19), 17039-17053. doi:10.18632/oncotarget.3636
- Zoghbi, H. Y., & Orr, H. T. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*, *23*, 217-247. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.217

ANEXOS

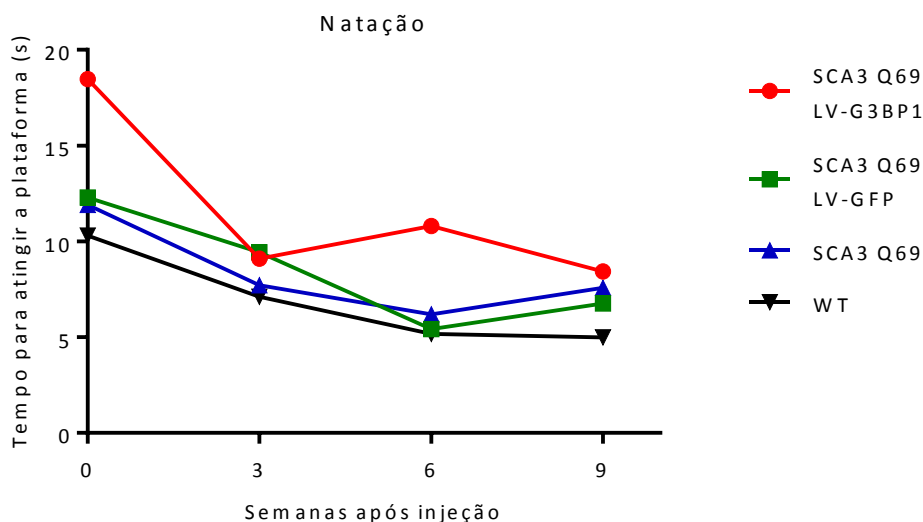
Coorte	Gaiola	Género	Marca	Genótipo
1	137	F	1R	WT
	137	F	1L	Tg
2	139	F	1R	WT
	139	F	1R1L	Tg
3	151	F	1R	Tg
	151	F	1L	Tg
	151	F	2R	Tg
	151	F	2L	WT
	151	F	1R1L	WT
4	153	F	1L	WT
	153	F	1R	Tg
	153	F	1R1L	WT
	154	M	1R	WT
	154	M	1L	Tg
	154	M	1R1L	WT
5	164	F	1L	Tg
	164	F	2R	WT
	165	M	1R	WT
	165	M	1R1L	WT
	165	M	2L	Tg
6	166	F	1R	WT
	166	F	1L	WT
	166	F	1R1L	WT
	167	M	1L	WT
	167	M	2R	WT
	167	M	2R1L	WT
	167	M	1R	Tg
	167	M	2L	Tg
	167	M	1R1L	Tg

Coorte	Gaiola	Género	Marca	Genótipo
7	168	M	1L	Tg
	168	M	1R	WT
	168	M	1R1L	WT
	168	M	2R	WT
8	173	F	1R	Tg
	174	F	1R	WT
	174	F	1L	Tg
	174	F	1R1L	WT
	175	M	1R	Tg
	175	M	1L	Tg
	175	M	1R1L	WT
9	176	F	1R	Tg
	177	M	1R	WT
10	178	F	1R	Tg
	178	F	1L	Tg
	178	F	1R1L	WT
	178	F	2R	Tg
	179	M	1R	Tg
	179	M	1L	WT
	179	M	1R1L	WT
	179	M	2R	Tg
179	M	2L	WT	

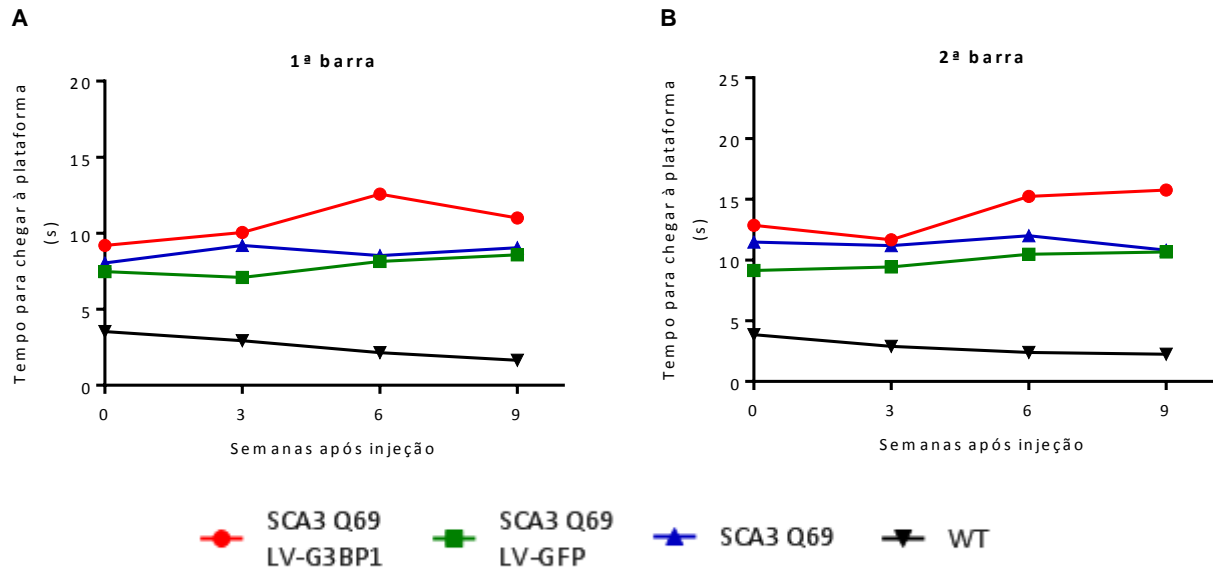
Anexo 1 – Resultados da genotipagem de animais resultantes do cruzamento de murganhos transgênicos machos heterozigóticos (+/-) com fêmeas C57BL/6 *wild-type*. De forma a diferenciar os murganhos de cada coorte/gaiola e permitir a extração de material genético foi realizada a marcação dos animais pela recolha de furos das orelhas. * - morreu; ** - sacrifício após cirurgia estereotáxica; *** - utilizado para cruzamento. Abreviaturas: F, fêmea; M, macho; R, direita; L, esquerda; Tg, transgênico; WT, *wild-type*.



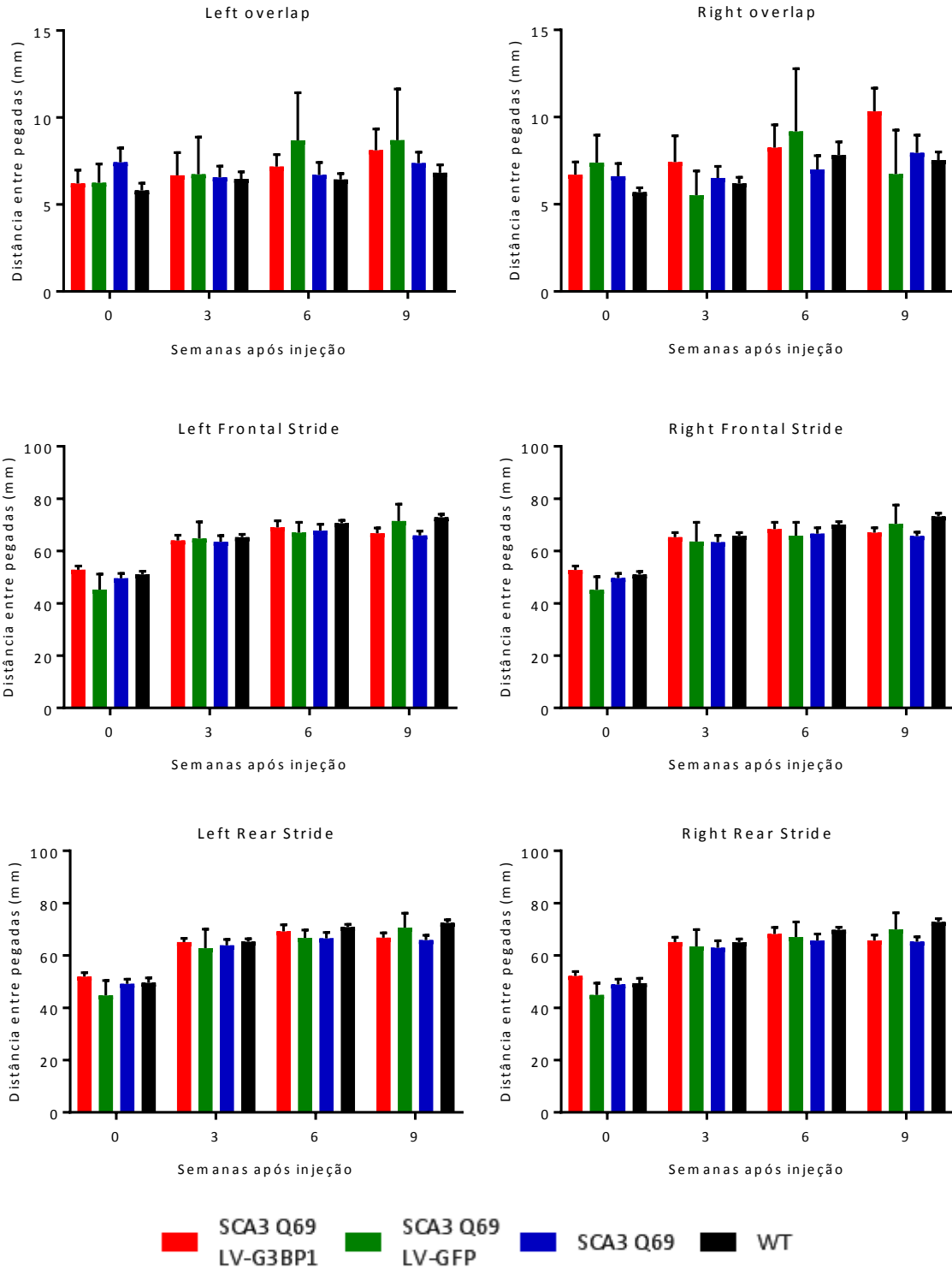
Anexo 2 – Teste rotarod. Os murganhos foram colocados num aparelho de *rotarod* a uma velocidade constante (5rpm, durante 5 minutos) e foi registada a sua latência em cair. Os pontos representam a média dos valores registados em segundos (s). SCA3 + G3BP1 ($n=7$), SCA3 + GFP ($n=7$), SCA3 ($n=7$) e *wild-type* ($n=26$).



Anexo 3 – Teste de natação. Os murganhos foram largados numa extremidade de tanque de vidro até subirem para uma plataforma colocada no lado oposto, registando o tempo que demoravam a subir à plataforma colocada na outra extremidade. Os valores são apresentados como médias dos valores obtidos em segundos (s). SCA3 + G3BP1 ($n=7$), SCA3 + GFP ($n=7$), SCA3 ($n=7$) e *wild-type* ($n=26$).



Anexo 4 – Teste de equilíbrio em barras. Os murganhos foram posicionados numa barra de 1,8 cm de largura (A) e numa barra de 1 cm de largura (B) e foi registado o tempo médio que cada murganho demora a atravessar cada barra de maneira a chegar a uma casa de abrigo, colocada na outra extremidade. Os valores são apresentados como médias dos valores obtidos em segundos (s). SCA3 + G3BP1 ($n=7$), SCA3 + GFP ($n=7$), SCA3 ($n=7$) e *wild-type* ($n=26$).



Anexo 5 – Teste de pegadas. Os membros dianteiros e traseiros dos murganhos foram pintados com tintas de diferentes cores e foram colocados numa pista estreita de modo caminharem em linha reta, registrando as pegadas em papel. Os valores são apresentados como médias \pm SEM, em milímetros (mm). SCA3 + G3BP1 ($n=7$), SCA3 + GFP ($n=7$), SCA3 ($n=7$) e *wild-type* ($n=26$).