

**Die Beteiligung von wildtypischer SOD1 an der
Pathogenese der SOD1-vermittelten amyotrophen
Lateralsklerose (ALS1)**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Heidrun Witan
geboren in Bamberg

Mainz, 2007

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2007

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	6
1.1.	Amyotrophe Lateralsklerose	6
1.2.	Sporadische und familiäre Formen der ALS	6
1.2.1.	Die Superoxid Dismutase 1	8
1.2.2.	Mutationen der Superoxid Dismutase 1	11
1.3.	Mögliche Mechanismen der Toxizität mutanter SOD1	12
1.3.1.	Aggregat-Hypothese	13
1.3.2.	Mitochondriale Fehlfunktion	15
1.3.3.	Exzitotoxizitätshypothese	17
1.3.4.	Veränderte SOD1-Aktivität	19
1.4.	<i>Caenorhabditis elegans</i> als genetischer Modellorganismus	21
1.5.	Zielsetzung	23
2.	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1.	Material	25
2.1.1.	Geräte	25
2.1.2.	Chemikalien	25
2.1.3.	Kits	28
2.1.4.	Zelllinien	28
2.1.5.	Bakterien	28
2.1.6.	Nematoden	28
2.2.	Zellbiologische Methoden	29
2.2.1.	Kultivierung von Zelllinien	29
2.2.2.	Konservierung von Zellen	30
2.2.3.	Differenzierung neuronaler Zelllinien	30
2.2.4.	Herstellung stabiler Zelllinien	30
2.2.5.	Transiente Transfektionen	31
2.2.6.	Kultivierung von Zellen auf Deckgläschen	31
2.2.7.	Zellüberlebensassays	32
2.2.8.	Photodokumentation	33
2.3.	Proteinbiochemische Methoden	33
2.3.1.	Proteinextraktion	33
2.3.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung	34
2.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.3.4.	<i>Westernblot</i> -Analyse	36
2.3.5.	Immundetektion membrangebundener Proteine	36
2.3.6.	Detektion carbonylierter Proteinreste	38
2.3.7.	Densitometrische Vermessung der detektierten Proteine	38
2.3.8.	SOD1-Aktivitätsassay	38

2.4. Molekularbiologische Methoden	39
2.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.4.2. Agarose-Gelelektrophorese	41
2.4.3. Präparative Agarose-Gelelektrophorese	41
2.4.4. Restriktion	42
2.4.5. Ligation	42
2.4.6. Transformation	43
2.4.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	43
2.4.8. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	44
2.4.9. cDNA-Synthese	44
2.4.10. DNA-Sequenzanalyse	44
2.5. <i>C. elegans</i> Methoden	45
2.5.1. Kultivierung von <i>C. elegans</i>	45
2.5.2. Bakterielle Starterkulturen	45
2.5.3. Konservierung von <i>C. elegans</i>	46
2.5.4. Mikroinjektion von DNA in <i>C. elegans</i>	47
2.5.5. Generierung von stabil integrierten Linien	47
2.5.6. Generierung männlicher <i>C. elegans</i>	48
2.5.7. Verpaarung von <i>C. elegans</i>	48
2.5.8. Proteinextraktion	48
2.5.9. SOD1-Aktivitätsassay	49
2.5.10. Bewegungsassay	49
2.5.11. Paraquat Überlebensassay	49
2.5.12. Bestimmung der Lebensspanne	49
3. ERGEBNISSE	51
3.1. Generierung und Charakterisierung von SOD1-Monomerkonstrukten	51
3.1.1. Generierung von SOD1-Monomerkonstrukten	51
3.1.2. Charakterisierung transient in HEK 293T-Zellen exprimierter hSOD1 ^{eGFP} -Fusionsproteine	52
3.1.3. Charakterisierung transient in HEK 293T-Zellen exprimierter hSOD1 ^{DsRed2} -Fusionsproteine	57
3.1.4. hSOD1 ^{WT-DsRed2} ist nicht in hSOD1 ^{mut-eGFP} -abhängigen Aggregaten enthalten	62
3.1.5. Murine und humane SOD1 ^{WT} bilden Dismutase-aktive Dimere	65
3.2. Generierung und Expression von SOD1-Dimerkonstrukten	66
3.2.1. Generierung von SOD1-Dimerkonstrukten	67
3.2.2. Charakterisierung transient in HEK 293T-Zellen exprimierter hSOD1 ^{Dimer-eGFP} -Fusionsproteine	68
3.2.3. Charakterisierung stabil in N2A-Zellen exprimierter hSOD1 ^{Dimer-eGFP} -Fusionsproteine	74
3.2.4. Metalldefiziente hSOD1 ^{G85R-G85R-eGFP} exprimierende N2A-Zellen sind weniger sensitiv gegenüber sekundärem Stress	79
3.2.5. Der oxidative Stress in mutant-wildtypischen hSOD1-Dimeren ist erhöht	82
3.3. Etablierung eines <i>C. elegans</i> Modells	84
3.3.1. Charakterisierung stabil in <i>C. elegans</i> exprimierter hSOD1 ^{Dimer-eGFP} -Fusionsproteine	84
3.3.2. Funktionelle Analysen	90

4.	DISKUSSION	95
4.1.	Mutante hSOD1 bilden aktive Heterodimere mit hSOD1^{WT}	96
4.2.	hSOD1-Dimerfusionsproteine weisen alle Eigenschaften „natürlicherweise“ dimerisierter hSOD1 auf	98
4.3.	Das Aggregationspotential mutanter hSOD1 korreliert nicht mit der Toxizität	100
4.4.	Worin besteht die toxische Eigenschaft von hSOD1^{mut-WT}-Heterodimeren?	102
4.5.	Die Rolle von SOD1^{WT} in ALS1-Mausmodellen	106
4.6.	Die Beteiligung von hSOD1^{WT} an der Aggregation	108
4.7.	Relevanz der Ergebnisse	109
4.8.	Ausblick	112
5.	ZUSAMMENFASSUNG	114
6.	LITERATURVERZEICHNIS	115
7.	ANHANG	133
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	133
7.2.	Publikationen der Autorin	137
7.3.	Lebenslauf	138
7.4.	Eidesstattliche Erklärung	139
7.5.	Danksagung	140

1. Einleitung

1.1. Amyotrophe Lateralsklerose

Bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) handelt es sich um eine altersabhängige Erkrankung, in deren Verlauf eine zunehmende Lähmung der von Motoneuronen innervierten Muskeln auftritt. Das Fortschreiten der Krankheit geht überaus schnell vonstatten, weshalb die Krankheitsdauer im Mittel lediglich zwischen drei und fünf Jahre beträgt. Zumeist werden erste klinische Symptome im Lebensalter zwischen 45 und 60 Jahren diagnostiziert (BOILLEE *et al.* 2006). Diese Symptome können Lähmungen der Extremitäten oder des bulbären Systems sein, die sich im Verlauf der Krankheit auf die restlichen Körperregionen ausbreiten und letztlich, meist aufgrund einer Lähmung der Atemmuskulatur, zum Tod führen. Verursacht werden die Symptome durch eine fortschreitende Degeneration der die Muskeln innervierenden Motoneuronen. Sensorische Neuronen und die Innervierung unwillkürlich gesteuerter Muskeln (innere Organe), sowie kognitive Fähigkeiten und die Persönlichkeit der Patienten werden nicht beeinträchtigt. Mit einer Prävalenz in der Bevölkerung von vier bis sechs in 100 000 (BOILLEE *et al.* 2006) ist ALS eine der am häufigsten vorkommenden altersabhängigen motorischen Nervenerkrankungen. Bis heute konnte trotz großer Anstrengungen keine effiziente Therapie entwickelt werden, was vor allem daran liegt, dass die der Erkrankung zugrunde liegenden Mechanismen sehr komplex sind und bisher noch nicht ausreichend verstanden werden.

1.2. Sporadische und familiäre Formen der ALS

Bei ca. 90 % aller ALS-Fälle tritt die Krankheit sporadisch auf (sALS), das heißt ohne eine offensichtliche vererbte Komponente. Die restlichen 10 % der ALS-Fälle sind genetisch bedingt und werden deshalb als familiäre ALS (fALS) bezeichnet. Klinisch lassen sich die zwei Formen der ALS nicht voneinander unterscheiden und auch auf molekularer Ebene gibt es gemeinsame Merkmale, wie das Auftreten von Proteinaggregaten, eine Störung der Glutamat-Homöostase und erhöhte zelluläre oxidative Stressspiegel (BROOKS 1994). Biomarker zur

Früherkennung der ALS-Erkrankung konnten jedoch noch nicht gefunden werden.

Bisher wurden acht chromosomale Loci identifiziert, deren genetische Veränderungen ALS-ähnliche Motoneuronenerkrankungen auslösen (ALS1-8). Zusätzlich wurden zwei chromosomale Loci beschrieben, deren Mutation zu ALS mit frontotemporaler Demenz (ALS-FTD; HOSLER *et al.* 2000; OSTOJIC *et al.* 2003) und zu ALS mit frontotemporaler Demenz und Parkinson Krankheit führen (ALS-FTDP; CLARK *et al.* 1998; HUTTON *et al.* 1998). Der verbreitete, spät auftretende ALS-Phänotyp wird jedoch nur von ALS1 (ROSEN *et al.* 1993), ALS3 (HAND *et al.* 2002), ALS6 (ABALKHAIL *et al.* 2003; RUDDY *et al.* 2003; SAPP *et al.* 2003), ALS7 (SAPP *et al.* 2003) und einigen Fällen von ALS8 (NISHIMURA *et al.* 2004a; NISHIMURA *et al.* 2004b) repräsentiert (Tabelle 1).

Die Grundlagenforschung zur Identifizierung der ALS-auslösenden Pathomechanismen wurde größtenteils anhand von ALS1 betrieben. Bei ALS1 handelt es sich um die erste beschriebene vererbare Variante der ALS, auf die ca. 20 % aller fALS-Fälle zurückzuführen sind (ORRELL 2000). Die Ursache für ALS1 besteht

Tabelle 1: Genetik von altersabhängiger humaner ALS (modifiziert nach BOILLÉE *et al.* 2006)

Krankheit	Lokus	Gen (Protein/Funktion)	Vererbung	Besonderheiten
Typische ALS				
ALS1	21q22.1	SOD1 (Cu/Zn-Superoxid Dismutase) konvertiert Superoxid zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid	Dominant	
ALS3	18q21	Unbekannt	Dominant	
ALS6	16q12	Unbekannt	Dominant	
ALS7	20p13	Unbekannt	Dominant	
Untypische ALS				
ALS8	20q13.3	VAPB (VAMP-assoziiertes Protein B). Möglicherweise in vesikuläres trafficking involviert. Interagiert mit sich selbst, VAMP-A und den Synaptobrevinen	Dominant	Heterogene Erkrankung (die meisten Fälle sind ALS mit Tremor; einige Fälle sind typische ALS; 25 % der Fälle sind spät beginnende spinale muskuläre Atrophie).
ALS mit Demenz				
ALS-FTD	9q12-22	Unbekannt	Dominant	ALS mit frontotemporaler Demenz (FTD)
ALS-FTDP	17q21.1	MAPT (Tau) Mikrotubuli-assoziiertes Protein	Dominant	ALS mit FTD und Parkinson

in Punktmutationen in dem für die Kupfer/Zink (Cu/Zn)-Superoxid Dismutase 1 (SOD1) codierenden Gen (ROSEN *et al.* 1993). Da mutante SOD1 (SOD1^{mut}) die häufigste genetische Ursache von ALS ist, wird sie als Modell verwendet, um die Pathomechanismen der Krankheit zu erforschen. In Anbetracht des identischen klinischen Krankheitsbildes und einiger gemeinsamer pathologischer Merkmale (s. o.) wird angenommen, dass die Forschungsergebnisse für SOD1-vermittelte ALS auf die sporadischen Fälle übertragbar sind.

1.2.1. Die Superoxid Dismutase 1

Die SOD1 ist eines der wichtigsten Enzyme der oxidativen Stressabwehr der Zelle (FRIDOVICH 1986; HALLIWELL 1992), was sich in einer starken Homologie (BORDO *et al.* 1994) und einer 2 Milliarden Jahre alten Phylogenie des Proteins widerspiegelt (ZELKO *et al.* 2002). Es handelt sich um ein ubiquitär exprimiertes Enzym, das zum größten Teil cytosolisch vorliegt, aber auch im Nukleosol (CHANG *et al.* 1988; CRAPO *et al.* 1992), in den Peroxysomen (CHANG *et al.* 1988; CRAPO *et al.* 1992; DHAUNSI *et al.* 1992; WANDERS AND DENIS 1992) und im Intermembranraum der Mitochondrien (HIGGINS *et al.* 2002; MATTIAZZI *et al.* 2002) lokalisiert werden konnte.

Das funktionelle SOD1-Enzym setzt sich aus zwei nicht-kovalent verbundenen, 153 Aminosäuren langen SOD1-Monomeren zusammen (BRIGGS AND FEE 1978), wobei jede Untereinheit ein Kupfer- und ein Zinkion im aktiven Zentrum enthält (Abbildung 1). Das aktive Zentrum des Enzyms liegt innerhalb eines engen Kanals aus positiv geladenen Aminosäureresten (Elektrostatische Schleife; Abbildung 1), der die Passage des Substrats Superoxid erlaubt, jedoch größeren Molekülen den Zugang zum aktiven Zentrum versperrt (CUDD and FRIDOVICH 1982). Ein weiteres Strukturmotiv des Enzyms, die Zinkschleife (Abbildung 1), enthält die meisten Metallliganden und interagiert stark mit der elektrostatischen Schleife (DOUCETTE *et al.* 2004). Die übergeordnete strukturelle Komponente der SOD1 ist ein achtsträngiger *Greek key β -barrel* (Abbildung 1). Für die Beladung des Apoenzyms mit Kupfer und die korrekte Faltung des Enzyms ist in Vertebraten in erster Linie das Kupfer-Chaperon für SOD1 (CCS; CASARENO *et al.* 1998;

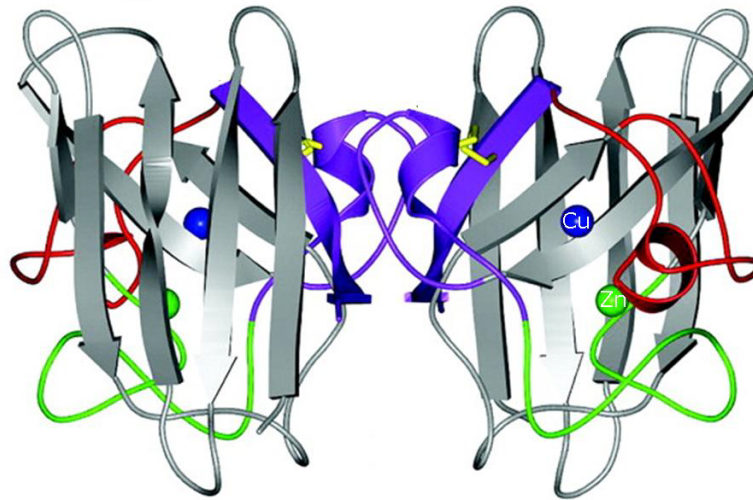


Abbildung 1: Struktur des Enzyms SOD1

Die SOD1 setzt sich aus zwei identischen Untereinheiten zusammen. Jede Untereinheit enthält ein Kupferion (blau) und ein Zinkion (grün), sowie ein achtsträngiges *Greek key β -barrel*-Motiv (grau). Die positiv geladene elektrostatische Schleife (rot) dient als Kanal zum aktiven Zentrum, während die Zinkschleife (grün) die Metallliganden enthält. Bei der blau-violett dargestellten Disulfidschleife handelt es sich um eine Substruktur der Zinkschleife, die pro Untereinheit eine intramolekulare Disulfidbrücke (gelb) ausbildet. Verändert nach DOUCETTE *et al.* (2004).

CULOTTA *et al.* 1997) zuständig. Anhand von CCS-defizienten Mäusen, deren hSOD1 eine ca. 80 % reduzierte SOD1-Aktivität aufwies, konnte jedoch gezeigt werden, dass auch eine CCS-unabhängige Beladung der SOD1 mit Kupfer möglich ist (BECKMAN *et al.* 2002; SUBRAMANIAM *et al.* 2002). In einigen Invertebraten, wie z. B. *C. elegans*, existiert kein CCS-Ortholog. Hier findet die komplette Kupferbeladung der SOD1 durch einen Glutathion-abhängigen Mechanismus statt (JENSEN and CULOTTA 2005).

Die bekannteste von SOD1 katalysierte Reaktion ist die Dismutation des Superoxidations ($O_2^{\cdot-}$), das als toxisches Nebenprodukt der Atmungskette entsteht (BANNISTER *et al.* 1991; FRIDOVICH 1986; Abbildung 2A). Es handelt sich um eine aus zwei Schritten bestehende Reaktion: Zuerst wird das zweiwertige Kupferion der SOD1 zu einwertigem Kupfer reduziert, wobei ein $O_2^{\cdot-}$ zu molekularem Sauerstoff (O_2) oxidiert wird. Anschließend reduziert das einwertige Kupferion der SOD1 ein $O_2^{\cdot-}$ zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Das führt dazu, dass das Kupferion der SOD1 reoxidiert wird. Die SOD1 liegt nun wieder in ihrer ursprünglichen

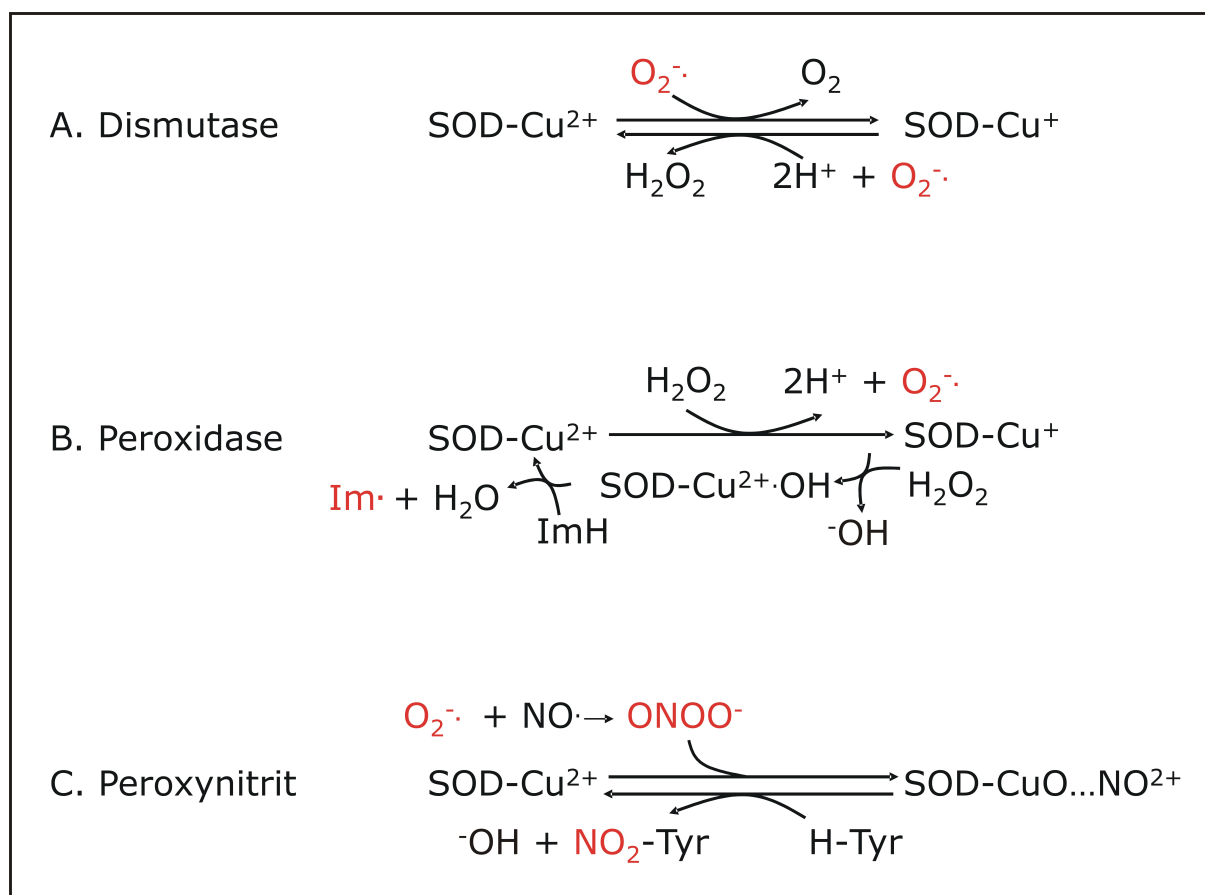


Abbildung 2: Enzymaktivitäten der SOD1

Die SOD1 setzt in einer Zwei-Schritt-Reaktion Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Wasser (H_2O) um (A). Bei der in geringem Maße auftretenden Rückreaktion setzt die SOD1 H_2O_2 zu $\text{O}_2^{\cdot-}$ und dem Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) um (B). In Gegenwart des Stickstoffmonoxidradikals ($\text{NO}\cdot$) und $\text{O}_2^{\cdot-}$ entsteht Peroxynitrit (ONOO^-), was von der SOD1 als Substrat aufgenommen werden kann. Dies resultiert in einer Nitrierung von Proteinresten (C). Verändert nach BARBER *et al.* (2006).

Form vor und kann weitere $\text{O}_2^{\cdot-}$ entgiften (FRIDOVICH 1989; VALENTINE *et al.* 1999). Das bei dem zweiten Reaktionsschritt entstandene H_2O_2 wird von der Katalase oder der Glutathion Peroxidase in Wasser (H_2O) und O_2 umgesetzt und somit endgültig unschädlich gemacht (BARBER *et al.* 2006). Abgesehen von der Dismutation des $\text{O}_2^{\cdot-}$ kann SOD1 allerdings noch weitere Reaktionen katalysieren. Anhand von Aktivitätsassays (HODGSON and FRIDOVICH 1975) und *spin-trap*-Experimenten (YIM *et al.* 1990) konnte eine Peroxidaseaktivität (Abbildung 2B) und eine Thioloxidaseaktivität (SEARCY *et al.* 1995) der SOD1 nachgewiesen werden. Des Weiteren wird der SOD1 die Katalyse einer Reaktion zugeschrieben, bei der sie unter Peroxynitritumsetzung Tyrosinreste nitriert (BECKMAN *et al.* 1993; Abbildung 2C).

1.2.2. Mutationen der Superoxid Dismutase 1

Als bekannt wurde, dass Mutationen innerhalb des SOD1-Gens zu fALS führen (ROSEN *et al.* 1993), nahm man zunächst an, dass die Mutationen in einem Verlust der SOD1-Aktivität und einer dadurch bedingten erhöhten oxidativen Vulnerabilität von Motoneuronen resultieren. Diese These wurde jedoch dadurch widerlegt, dass SOD1-defiziente Mäuse keinen ALS-Phänotyp entwickeln (REAUME *et al.* 1996) und dass einige mutante SOD1-Formen eine vollständige Dismutaseaktivität aufweisen (BORCHELT *et al.* 1994; BOWLING *et al.* 1995). Mittlerweile sind weit über 100 Punktmutationen des SOD1-Gens und zwei C-terminale Deletionen bekannt, die zu ALS führen (ANDERSEN 2000; GAUDETTE *et al.* 2000). Innerhalb des Gens gibt es keine bevorzugte Region für die Mutationen, vielmehr wurden sie, über das ganze Gen verteilt, beschrieben (ORRELL 2000; Abbildung 3). Die hSOD1^{mut} können grob in wildtypähnliche und nicht-wildtypähnliche hSOD1^{mut} unterteilt werden. Zu den wildtypähnlichen hSOD1^{mut} gehören die vollständig aktiven hSOD1^{G37R} (humane SOD1, deren 37. Aminosäure Glycin durch Arginin ersetzt wurde) und hSOD1^{G93A}, bei denen die Mutationen im β -Faltblatt lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu werden inaktive hSOD1^{mut}, bei denen die ausgetauschte Aminosäure in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert ist (z. B. hSOD1^{G85R})

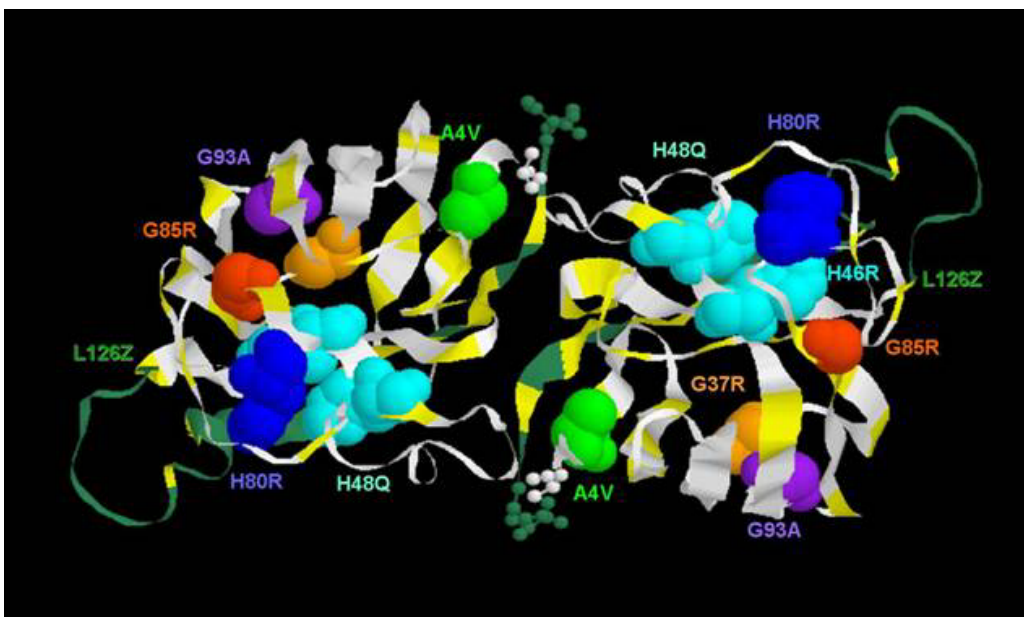


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Mutationen innerhalb des SOD1-Enzyms

Verändert nach CLEVELAND and ROTHSTEIN (2001).

oder deren ausgetauschte Aminosäure die Kupferbindung im aktiven Zentrum koordiniert (z. B. hSOD1^{H48Q}), den nicht-wildtypähnlichen hSOD1^{mut} zugeordnet (Abbildung 3). Weitere inaktive hSOD1^{mut} werden durch Deletionsmutanten repräsentiert, die durch eine Verschiebung des Leserahmens bedingt sind (z. B. hSOD1^{G127X} JONSSON *et al.* 2004; hSOD1^{L126Z} ZU *et al.* 1997; Abbildung 3). Obwohl alle Mutationen zum ALS-Phänotyp führen, können Krankheitsbeginn und Krankheitsdauer stark variieren. Die in der Dimerisierungsdomäne gelegene hSOD1^{A4V}-Mutation (Abbildung 3) führt beispielsweise zu einer sehr aggressiven Form der ALS1, an der die Patienten meist schon ein Jahr nach der Diagnose sterben. Im Gegensatz dazu dauert der Krankheitsverlauf bei Patienten mit der hSOD1^{G41D}-Mutation durchschnittlich 17 Jahre (LINDBERG *et al.* 2005). Zur Untersuchung der Mechanismen, die zu ALS führen, wurden SOD1^{mut}-überexprimierende Maus- und Rattenlinien entwickelt, von denen die meisten einen ALS-ähnlichen Phänotyp entwickeln (BRUIJN *et al.* 1997b; GURNEY *et al.* 1994; HOWLAND *et al.* 2002; NAGAI *et al.* 2001; RIPPS *et al.* 1995; WANG *et al.* 2003; WANG *et al.* 2005; WONG *et al.* 1995). Überraschenderweise zeigt die im Menschen sehr aggressive hSOD1^{A4V}-Mutation in der Maus jedoch keinen Phänotyp (GURNEY *et al.* 1994). Erst nach Verpaarung mit hSOD1^{WT}-überexprimierenden Mäusen, die ebenfalls keinen ALS-Phänotyp zeigen (GURNEY *et al.* 1994; WONG *et al.* 1995), entwickelten die hSOD1^{A4V} transgenen Mäuse einen ALS-ähnlichen Phänotyp (DENG *et al.* 2006). Auch in zwei weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass hSOD1^{mut}-Mauslinien, die mit hSOD1^{WT} verpaart wurden, schneller und schwerer erkranken als unverpaarte hSOD1^{mut}-Mauslinien (FUKADA *et al.* 2001; JAARMA *et al.* 2000). Anscheinend spielt hSOD1^{WT} also eine wesentliche Rolle für die Toxizität der hSOD1^{mut}. Dies ist ein Aspekt, der für die Mechanismen der ALS1 im Menschen durchaus relevant ist, da ALS1 in der Regel dominant vererbt wird und folglich jeder Patient ein wildtypisches und ein mutantes Allel für SOD1 besitzt.

1.3. Mögliche Mechanismen der Toxizität mutanter SOD1

Alle bisherigen Untersuchungen weisen darauf hin, dass die SOD1^{mut}-vermittelte Toxizität auf die Akquirierung einer oder mehrerer schädlicher Eigenschaften der SOD1 zurückzuführen ist. Obwohl bislang nicht eindeutig geklärt werden konnte, worin diese toxischen Eigenschaften begründet sind, wurden aufgrund von pa-

thologischen Befunden zahlreiche Hypothesen aufgestellt. Neben einer Aggregat-Toxizität wurden mitochondriale Fehlfunktionen, Exzitotoxizität und eine veränderte SOD1-Aktivität als mögliche toxische Ursachen der ALS1 postuliert.

1.3.1. Aggregat-Hypothese

Ein gemeinsames pathologisches Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen, wie z. B. Alzheimer Krankheit (SELKOE 2001), Parkinson Krankheit (SELKOE 2001), Huntington Krankheit (STEFFAN *et al.* 2001) und ALS, ist die Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten. Bei ALS konnten cytoplasmatische Proteinaggregate sowohl bei sporadischen als auch bei familiären Patienten detektiert werden (LEIGH *et al.* 1991; MIGHELI *et al.* 1990; WATANABE *et al.* 2001). Auch in den als ALS-Modellsystem verwendeten hSOD1^{mut}-überexprimierenden transgenen Mäusen kommt es zur Bildung von Aggregaten (BRUIJN *et al.* 1997b; GURNEY *et al.* 1994; STIEBER *et al.* 2000a; WATANABE *et al.* 2001). Die Aggregate sind sowohl in Motoneuronen, als auch in den sie umgebenden Astrozyten und Oligodendrozyten lokalisiert (STIEBER *et al.* 2000a; STIEBER *et al.* 2000b), wohingegen in hippokampalen Neuronen und im dorsalen Wurzelganglion keine Aggregate gebildet werden (DURHAM *et al.* 1997). Es handelt sich bei der ALS-assoziierten Aggregatbildung also nicht um ein pan-neuronales Phänomen; vielmehr sind selektiv der Hirnstamm und der Motorkortex, sowie das Rückenmark betroffen. Bis heute konnte allerdings nicht geklärt werden, ob diese Aggregate eine toxische oder eventuell *die* toxische Komponente der neurodegenerativen Krankheiten darstellen, ob sie eine neutrale Begleiterscheinung sind, oder ob es sich bei der Aggregatbildung sogar um einen Schutzmechanismus der Zellen handelt, um falsch gefaltete Proteine aus dem Metabolismus zu entfernen (CAUGHEY and LANSBURY 2003; ROSS and POIRIER 2005). Hinsichtlich einer möglichen Toxizität von ALS-assoziierten Proteinaggregaten wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen (Abbildung 4). Diskutiert wird unter anderem eine Co-Aggregation von fehlgefalteten mit normal gefalteten Proteinen. Die normal gefalteten Proteine würden dem Zellmetabolismus entzogen, so dass sie ihre – möglicherweise essentielle – Funktion nicht mehr ausüben könnten (Abbildung 4A). Eine weitere Möglichkeit der Aggregat-vermittelten Toxizität ist eine Verstopfung bzw.

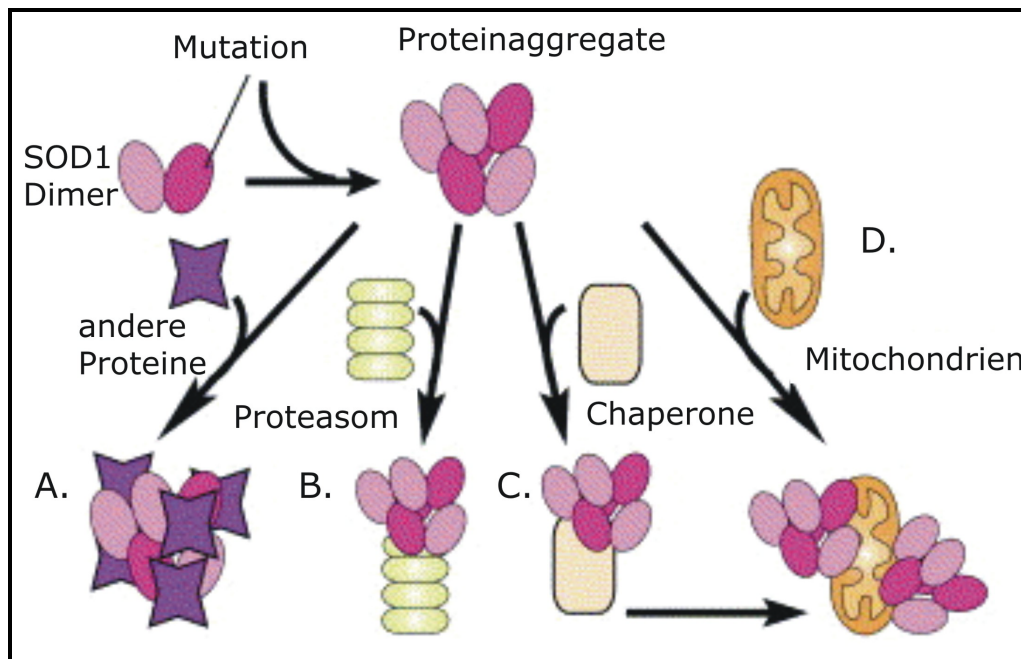


Abbildung 4: Mögliche Mechanismen der Toxizität von Proteinaggregaten

Proteinaggregate mutanter SOD1 könnten zu einem Verlust von Proteinfunktionen durch Co-Aggregation (A), zu einer Verstopfung des Proteasoms (B), zu einer Depletion von Chaperonen (C) oder zu einer Fehlfunktion von Zellorganellen (D) führen. Verändert nach BOILLEE *et al.* (2006).

Überlastung des Proteasoms, so dass die vom Proteasom ausgeübte *normale* Degradation von Proteinen nicht mehr stattfinden kann (JOHNSTON *et al.* 2000; Abbildung 4B). Diese Theorie wird durch eine Markierung der Proteinaggregate mit Ubiquitin gestützt, die sowohl bei sALS als auch bei fALS auftritt (BRUIJN *et al.* 1998; INCE *et al.* 1998; KATO *et al.* 2000; STIEBER *et al.* 2000b; TAGAWA *et al.* 2006; WATANABE *et al.* 2001). Die Polyubiquitinylierung markiert Proteine, die im Proteasom degradiert werden sollen. Weiterhin könnten die Proteinaggregate toxisch wirken, wenn sie Chaperone in ihrer Funktion beeinträchtigen (Abbildung 4C). Chaperone sind Proteine, die für die korrekte Proteinfaltung während der Proteinbiosynthese benötigt werden. Sie vermitteln allerdings auch die Rückfaltung bereits fehlgefalteter, reifer Proteine. Aus fehlgefalteten Proteinen bestehende Oligomere könnten dem Metabolismus überproportional viele Chaperone entziehen, so dass die Faltung neu synthetisierter Proteine beeinträchtigt würde. Weiterhin könnte die Toxizität zustande kommen, indem die Chaperonaktivität spezifisch durch hSOD1^{mut} gehemmt würde. Diese These wird dadurch gestützt, dass *in vitro* rekombinante hSOD1^{mut} die Chaperone inhibieren und dass auch in ALS1-Mausmodellen eine Verminderung der Chaperonaktivität beobachtet wurde

(BRUENING *et al.* 1999; TUMMALA *et al.* 2005). Außerdem könnten Proteinaggregate die Funktion verschiedener Zellorganellen (z. B. Mitochondrien) beeinträchtigen (Abbildung 4D).

1.3.2. Mitochondriale Fehlfunktion

Ebenso wie das Auftreten von Proteinaggregaten sind mitochondriale Schädigungen ein gemeinsames Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen. Sowohl bei sALS als auch bei fALS konnten vakuolisierte und vergrößerte Mitochondrien mit atypischer Struktur nachgewiesen werden (AFIFI *et al.* 1966; HIRANO *et al.* 1984a; HIRANO *et al.* 1984b; SASAKI and IWATA 2007). Als möglicher Mechanismus für diese Vakuolenbildung wurde die Ausdehnung des mitochondrialen Intermembranraums und eine damit einhergehende Ausweitung der mitochondrialen Membranen postuliert (HIGGINS *et al.* 2003). Derart veränderte Mitochondrien wurden sowohl in Motoneuronen als auch in Muskelzellen beschrieben. Sie führen zu einer Beeinträchtigung der Zellatmung und zu erhöhten Spiegeln von entkoppelnden Proteinen (CHUNG and SUH 2002; DUPUIS *et al.* 2003; ECHANIZ-LAGUNA *et al.* 2002; VIELHABER *et al.* 1999; WIEDEMANN *et al.* 2002). In Patienten und Tiermodellen SOD1^{mut}-abhängiger ALS wurde eine Akkumulation von SOD1^{mut} in den Mitochondrien von Motoneuronen gezeigt, wohingegen SOD1^{WT} nicht angereichert war (BERGEMALM *et al.* 2006; LIU *et al.* 2004; VIJAYVERGIYA *et al.* 2005). In welcher Form SOD1^{mut} die motoneuronalen Mitochondrien schädigt, konnte bisher noch nicht geklärt werden (Abbildung 5). Es wäre möglich, dass hSOD1^{mut} die Zellatmung beeinträchtigt, indem es Elemente der Elektronentransportkette behindert (Abbildung 5A). Untersuchungen der einzelnen Komponenten der Elektronentransportkette von hSOD1^{mut}-transgenen Mäusen ergaben jedoch keine konsistenten Resultate (BOILLÉE *et al.*, 2006). Ein weiterer möglicher Weg, wie hSOD1^{mut} mitochondriale Funktionen beeinträchtigen könnte, ist die Blockade des Imports von kernkodierten mitochondrialen Proteinen (Abbildung 5B). Sowohl der in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisierte Proteintransporter TOM als auch der in der inneren mitochondrialen Membran gelegene Transporter TIM könnten durch aggregierte oder membranassoziierte SOD1^{mut} behindert

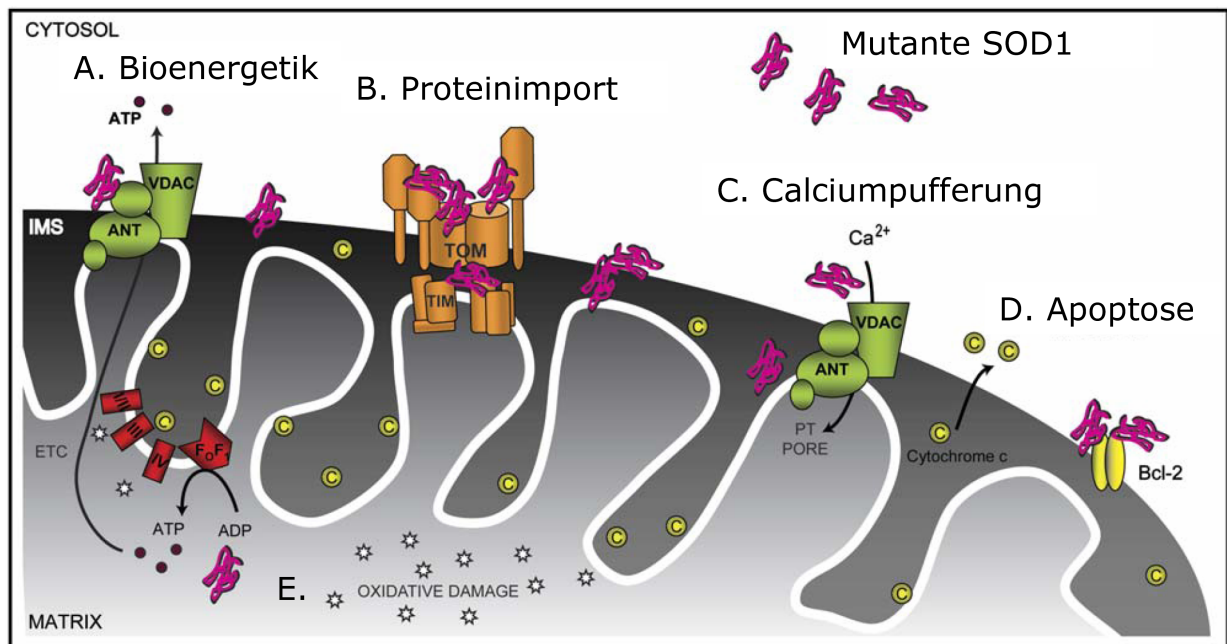


Abbildung 5: Schema der hSOD1^{mut} Toxizität auf Mitochondrien

Die Mitochondrien könnten durch SOD1^{mut}-bedingte Veränderungen an der Elektronentransportmaschinerie (A), an dem Proteintransportsystem (B), an Calciumkanälen (C), an der apoptotischen Maschinerie (D) oder durch erhöhte oxidative Schäden (E) beeinträchtigt werden. Verändert nach BOILLEE *et al.* (2006).

werden (LIU *et al.* 2004). Auf ganz ähnlichem Wege könnte das mitochondriale Calciumpuffersystem durch eine Blockade oder Veränderung von Calciumkanälen durch hSOD1^{mut} beeinträchtigt werden (Abbildung 5C). Bereits in präsymptomatischen transgenen hSOD1^{mut}-Mauslinien wurde eine Motoneuronen-spezifische Schädigung der mitochondrialen Calciumpufferkapazität nachgewiesen (DAMIANO *et al.* 2006). Auch ein Einfluss von hSOD1^{mut} auf Komponenten der apoptotischen Maschinerie könnte verantwortlich für mitochondriale Fehlfunktionen sein (Abbildung 5D). Es wurde eine Wechselwirkung von hSOD1^{mut} mit dem mitochondrialen antiapoptotischen Protein Bcl-2 beschrieben, die dessen antiapoptotische Aktivität hemmen könnte und somit einen möglichen Apoptose-induzierenden Toxizitätsmechanismus darstellt (PASINELLI *et al.* 2004). Eine Erhöhung der Expression von Bcl-2 durch Verpaarung mit Bcl-2-überexprimierenden Mäusen (KOSTIC *et al.* 1997) sowie die intraspinale Injektion eines adeno-assoziierten, für Bcl-2 kodierenden Virus in das Rückenmark (AZZOUC *et al.* 2000) führte in hSOD1^{G93A} transgenen Mäusen zu einem späteren Krankheitsausbruch; die Krankheitsdauer wurde jedoch nicht verändert. Die Beeinträchtigung der Mitochondrien könnte aber auch durch oxidative Schädigung mitochondrialer Proteine

verursacht werden (Abbildung 5E). Eine mutationsbedingt veränderte SOD1-Aktivität hat eventuell die Katalyse einer aberranten toxischen Reaktion zur Folge (siehe 1.3.4.). Außerdem könnte die von SOD1^{WT} katalysierte, nur in sehr geringem Maße ablaufende, Rückreaktion der Dismutation (die Peroxidationsreaktion) und die Nitrierung von Tyrosinresten bei hSOD1^{mut} verstärkt ablaufen und somit in einer oxidativen Modifikation mitochondrialer Proteine resultieren (YIM *et al.* 1997; YIM *et al.* 1996). Letztendlich führt eine Beschädigung von Mitochondrien zur Öffnung der PTP (*permeability transition pore*), was in einer Freisetzung von Cytochrom C ins Cytosol resultiert. Dort aktiviert Cytochrom C die Caspase-3, die schließlich den apoptotischen Zelltod induziert (JULIEN 2001; TAKEUCHI *et al.* 2002).

1.3.3. Exzitotoxizitätshypothese

Sowohl in sALS- als auch in fALS-Patienten konnten erhöhte Glutamatspiegel in der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) nachgewiesen werden (ROTHSTEIN *et al.* 1990; SHAW *et al.* 1995a) und in hSOD1^{G93A}-transgenen Mäusen wurden erhöhte extrazelluläre kortikale Glutamatspiegel detektiert (PERRY *et al.* 1990). Hohe extrazelluläre Glutamatspiegel führen zu einer Stimulierung der Glutamatrezeptoren und folglich zu einem erhöhten Calciumeinstrom in das postsynaptische Neuron. Dadurch wird die Calciumhomöostase gestört, was in neuronaler Degeneration resultieren kann (CARRIEDO *et al.* 1996; CHOI 1987; VAN DEN BOSCH *et al.* 2000). Eine derartige Überstimulierung von Glutamatrezeptoren und die dadurch hervorgerufene neuronale Degeneration wird als Exzitotoxizität bezeichnet (OLNEY 1978). Sie kann sowohl durch AMPA- als auch durch NMDA-Rezeptoren für Glutamat vermittelt werden. Spinale Motoneuronen sind sehr anfällig für AMPA-Rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität (CURTIS and MALIK 1985; HUGON *et al.* 1989; IKONOMIDOU *et al.* 1996; KRUMAN *et al.* 1999; NAKAMURA *et al.* 1994; PISHARODI and NAUTA 1985), da sie einen hohen Anteil an AMPA-Rezeptoren ohne GluR2-Untereinheit besitzen, die im Gegensatz zu AMPA-Rezeptoren mit GluR2-Untereinheit permeabel für Calciumionen sind (HOLLMANN *et al.* 1991). Außerdem ist die Calciumpufferungskapazität der spinalen Motoneuronen im Vergleich

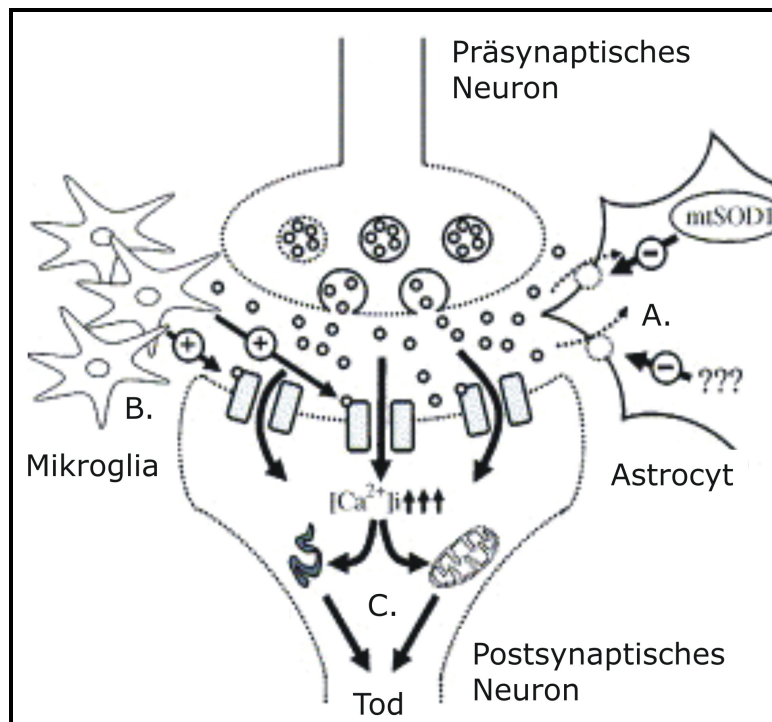


Abbildung 6: Mechanismen der Exzitotoxizität in ALS

Eine verminderte Glutamatwiederaufnahme (A) erhöht den Glutamatspiegel des synaptischen Spaltes, so dass es zu einer gesteigerten Aktivierung von AMPA-Rezeptoren kommt. Zusätzlich werden die AMPA-Rezeptoren von mikroglial sezernierten Substanzen aktiviert (B). Die hohe Menge an einströmendem Calcium kann nicht vollständig von den Mitochondrien abgepuffert werden und führt zu einer erhöhten ROS-Produktion und zu einer Überaktivierung Calcium-abhängiger Proteine, was letztendlich zum neuronalen Zelltod führt (C). Verändert nach VAN DEN BOSCH *et al.* (2006).

zu anderen Motoneuronen sehr niedrig, was an einer geringen Expression von Calciumbindepoteinen liegt (ALEXIANU *et al.* 1994; CELIO 1990; INCE *et al.* 1993). Um eine neurotoxische Überstimulierung von Glutamatrezeptoren zu verhindern, entfernt normalerweise der gliale Glutamattransporter EAAT2/GLT1 den Neurotransmitter Glutamat aus dem synaptischen Spalt. Im Motorkortex und im Rückenmark von sporadischen und familiären ALS-Patienten wurde jedoch ein selektiver Verlust von EAAT2/GLT1 beschrieben, so dass die Glutamatwiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt vermindert wurde (FRAY *et al.* 1998; ROTHSTEIN *et al.* 1992; ROTHSTEIN *et al.* 1995; SASAKI *et al.* 2000). Außerdem wurde ein Verlust von EAAT2/GLT1 im ventralen Horn von $hSOD1^{G37R}$ - und $hSOD1^{G93A}$ -transgenen Mäusen sowie $hSOD1^{G93A}$ -transgenen Ratten detektiert (BENDOTTI *et al.* 2001; BRUIJN *et al.* 1997b; HOWLAND *et al.* 2002). Es konnte sogar eine Verbindung zwischen dem Auftreten von $hSOD1^{mut}$ und einer reduzierten EAAT2/GLT1-Funktion identifiziert werden: Die Katalyse von H_2O_2 durch

hSOD1^{mut} verursacht oxidative Schädigungen am carboxyterminalen Ende von EAAT2/GLT1, die zu einem reduzierten Glutamattransport führen (TROTTI *et al.* 1999; Abbildung 6A). Außerdem können aktivierte Mikrogliazellen und/oder Astrozyten (BEZZI *et al.* 2001) Substanzen in den synaptischen Spalt sezernieren, die die glutamaterge Stimulierung des postsynaptischen Neurons weiter erhöhen (VAN DEN BOSCH *et al.* 2006; Abbildung 6B). Das durch die aktivierten Glutamat-rezeptoren in das postsynaptische Neuron einströmende Calcium wird zum Teil von den Mitochondrien abgepuffert. Sobald aber die Pufferkapazität der Mitochondrien erschöpft ist, kommt es zur Bildung von ROS in den Mitochondrien und zu einer Überaktivierung von intrazellulären Calcium-abhängigen Enzymen (Abbildung 6C). Dies interferiert mit der normalen neuronalen Funktion und endet letztlich in neuronalem Zelltod.

1.3.4. Veränderte SOD1-Aktivität

Ein weiterer möglicher Mechanismus, wie hSOD1^{mut} toxische Eigenschaften erlangt, ist eine veränderte Aktivität des Enzyms. Möglicherweise wird durch Mutationen die Konformation des Enzyms modifiziert, so dass andere Substrate als O₂⁻ zum aktiven Zentrum gelangen könnten. So wurde beispielsweise eine veränderte Affinität von hSOD1^{mut} für das stabilisierende Zinkion gezeigt (CROW *et al.* 1997). Ohne diese wichtige strukturelle Komponente des SOD1-Enzyms könnten vermehrt H₂O₂ oder Peroxynitrit das aktive Zentrum erreichen (ESTEVEZ *et al.* 1999). Denkbar wäre ebenfalls, dass die in geringer Rate auch bei hSOD1^{WT} auftretende Peroxidasereaktion und die Nitrierung von Tyrosinresten durch eine mutationsbedingte Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes oder durch eine Veränderung der Aminosäurereste, die für die Anionen-Selektivität des aktiven Zentrums zuständig sind (BECKMAN *et al.* 1993), verstärkt würden. Eine Erhöhung des Spiegels von freiem Nitrotyrosin konnte sowohl in ALS-Patienten (BEAL *et al.* 1997) als auch in hSOD1^{mut}-transgenen Mäusen gezeigt werden (BRUIJN *et al.* 1997a; FERRANTE *et al.* 1997b). Protein- und Membran-gebundenes Nitrotyrosin wurde jedoch nicht detektiert (BRUIJN *et al.* 1997a). Vor allem eine veränderte Kupferchemie von hSOD1^{mut} wird kontrovers diskutiert. Es wurde spekuliert, dass hSOD1^{mut} im aktiven Zentrum eine geringere Affinität für das Kupferion hat als hSOD1^{WT}, so dass Kupferionen ins Cytosol freigesetzt

werden. Da freies Kupfer sehr reaktiv und toxisch ist, würde dies zu einer neuronalen Degeneration führen. Weiterhin wurde spekuliert, dass CCS (siehe 1.2.1.) hSOD1^{mut} weniger effizient mit Kupferionen beladen kann oder dass die Katalyse einer konservierten Disulfidbrücke durch CCS aufgrund der Fehlfaltung von hSOD1^{mut} inhibiert ist. In CCS-defizienten Mäusen ist die Aktivität von SOD1 um ca. 80 % reduziert. Trotz dieser Verminderung der SOD1 Aktivität konnte nach einer Verpaarung mit hSOD1^{mut}-überexprimierenden Mäusen jedoch keine Änderung in Hinsicht auf den Krankheitsbeginn und die Überlebensdauer festgestellt werden (SUBRAMANIAM *et al.* 2002). Interessanterweise führte die Verpaarung hSOD1^{G93A}-transgener Mäuse mit CCS-überexprimierenden Mäusen jedoch zu einer überaus deutlichen Verkürzung der Lebensspanne im Vergleich zu einfach hSOD1^{G93A}-transgenen Mäusen (SON *et al.* 2007). Um die Toxizität von kupferfreier hSOD1 zu untersuchen generierten WANG und Kollegen (2003) hSOD1^{mut}, bei denen die das Kupferion koordinierenden Histidinreste deletiert sind (hSOD1^{QUAD}). Mäuse, die das Kupfer-defiziente hSOD1^{QUAD} überexprimierten zeigten ALS-ähnliche Symptome. Da Kupfer-defiziente SOD1 nicht in der Lage ist, die Dismutase-Reaktion zu katalysieren und trotzdem ein ALS-Phänotyp in hSOD1^{QUAD}-transgenen Mäusen beobachtet wurde, wird eine veränderte Aktivität der hSOD1^{mut} als Krankheitsursache weitestgehend ausgeschlossen (BOILLEE *et al.* 2006). Neben dem aktiven Zentrum kann Kupfer allerdings noch an einen Cysteinrest (Cys111), der an der Proteinoberfläche in der Nähe der Dimerisierungsdomäne lokalisiert ist, binden (LIU *et al.* 2000). Dieser Cysteinrest scheint eine hSOD1^{mut}-abhängige erhöhte Kupferaffinität und Instabilität zu bedingen, was durch dessen Substitution gezeigt werden konnte: hSOD1^{mut} ohne Cys111 hatte eine mit hSOD1^{WT} vergleichbare Kupferaffinität und Stabilität (WATANABE *et al.* 2007). Die aberrante Bindung von Kupfer an das Cys111 von hSOD1^{mut} ist potentiell toxisch, da falsch koordinierte zweiwertige Kupferionen eine hohe Redoxaktivität besitzen, die zur Generierung von ROS (WIEDAU-PAZOS *et al.* 1996; YIM *et al.* 1996) oder reaktiven Stickstoffspezies (RNS; BECKMAN *et al.* 1993; CROW *et al.* 1997) führen kann.

1.4. *Caenorhabditis elegans* als genetischer Modellorganismus

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*; Abbildung 7) ist ein in den gemäßigten Klimazonen weit verbreiteter, bodenlebender Fadenwurm. Er ist ca. 1 mm lang und ernährt sich von Bakterien. Normalerweise tritt *C. elegans* als Hermaphrodit auf, lediglich 0,05–0,5 % einer Population sind männlich. *C. elegans*-Männchen zeichnen sich durch eine geringere Körperlänge und ein verbreitertes Körperende mit einem als Spikula bezeichneten, schaufelartigen Reproduktionsorgan aus. Sie haben eine somatische Zellzahl von 1031, während die Hermaphroditen aus exakt 959 somatischen Zellen aufgebaut sind. Die Neuronen machen mit 302 Zellen circa ein Drittel der Gesamtzellzahl des Wurms aus (HODGKIN 1988). Das Nervensystem besteht aus einem Schlundganglion, von dem ein dorsaler und ein ventraler Nervenstrang ausgehen. Neben diesem einfachen Nervensystem besitzt *C. elegans* mit einer Epidermis, einem Gastrointestinaltrakt und Gonaden alle wichtigen Merkmale höherer Organismen (JORGENSEN and MANGO 2002). *C. elegans* hat eine durchschnittliche Gesamtlebensdauer von 21 Tagen. Bereits 3 Tage nach dem Schlüpfen werden die Hermaphroditen geschlechtsreif und legen bis zum achten Tag ihrer Lebensspanne ca. 300 Eier (BRENNER 1974; SULSTON and HODGKIN 1988). Die Entwicklungsdauer der verschiedenen Larvenstadien ist temperaturabhängig. Bei 25°C schlüpfen 14 h nach der Eiablage Larven des Stadiums 1 (L1-Larven). 12 h später häuten sich die L1-Larven und werden zu L2-Larven. Unter Stressbedingungen wie Nahrungsmangel können die L2-Larven zu Dauerlarven mit einer stark verdickten Kutikula werden, die bis zu vier Monate ohne Nahrung überleben (RIDDEL 1988). Unter optimalen Bedingungen entwickeln sich aus L2-Larven jedoch innerhalb von 7 h L3-Larven und wiederum 8 h später L4-Larven. Circa 10 h danach ist das jung-adulte Entwicklungsstadium erreicht, und die Produktion von Eiern beginnt. Neben einer großen Homologie vieler *C. elegans*-Proteine mit menschlichen Proteinen haben die kurze Generationszeit, sowie eine leichte Kultivierung und das Vorhandensein vieler Mutantensämme dazu beigetragen, dass *C. elegans* als einfachstes mehrzelliges Tier den Status eines Modellorganismus einnimmt (ANKENY 2001). Bereits 1998 wurde das *C. elegans* Genom – als erstes tierisches Genom – komplett sequenziert. Es besteht aus 97000 Basenpaaren und enthält mehr als 19000 Gene (THE C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM 1998). Da *C. elegans* morphologisch und genetisch

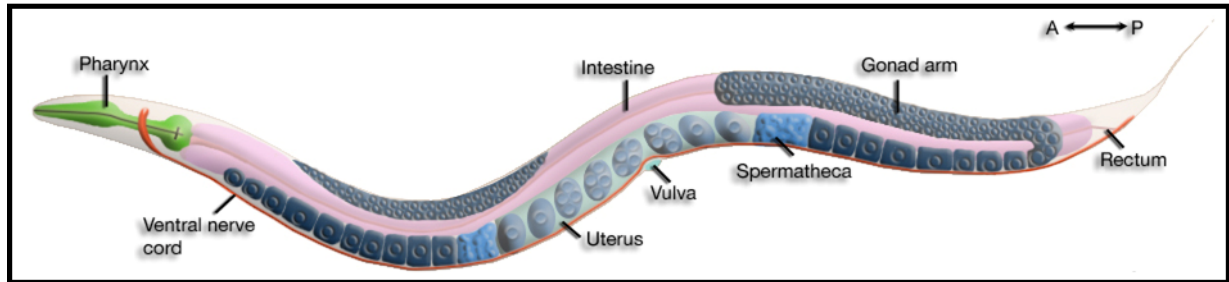


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines adulten Hermaphroditen

Der Pharynx (grün) mündet in den Gastrointestinaltrakt (rosa), der im Rektum endet. In den Gonaden (dunkelblau) reifen Eizellen heran, die in der Spermathek (blau) befruchtet werden. Die befruchteten Eier (grau) verlassen nach der Gastrulation den Uterus durch die Vulva (hellblau). Das Nervensystem (orange) besteht aus dem den Pharynx umschließenden Nervenring und einem dorsalen und einem ventralen Nervenstrang.
Quelle: <http://www.wormatlas.org/handbook/bodyshape.htm>

vergleichsweise einfach organisiert ist, sind genetische Manipulationen z. B. durch Mikroinjektion von DNA (FIRE 1986) oder RNA-vermittelte Interferenz (RNAi) möglich.

Eine Konservierung der zellulären und molekularen Funktionen zwischen Nematoden und dem Menschen ermöglicht die Nutzung von *C. elegans* als Modellsystem für menschliche Krankheiten (LINK 2006). Besonders die Mechanismen altersabhängiger, neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer (LINK 1995), Parkinson (KUWAHARA *et al.* 2006; LAKSO *et al.* 2003; VED *et al.* 2005) und Huntington (BRIGNULL *et al.* 2006; FABER *et al.* 2002), wurden bereits von zahlreichen Arbeitsgruppen anhand transgener Nematoden untersucht. In einem ALS1-Modell mit hSOD1^{mut}-transgenen *C. elegans* konnte eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Paraquat-vermitteltem oxidativen Stress nachgewiesen werden, die in einer verstärkten Aggregation resultierte (OEDA *et al.* 2001). Da sowohl die erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress als auch eine verstärkte Aggregation in etablierten ALS1-Modellsystemen gezeigt werden konnte (BRUIJN *et al.* 1997b; DURHAM *et al.* 1997; PASINELLI *et al.* 1998), scheint sich *C. elegans* auch als Modellsystem für die Untersuchung der zu ALS1 führenden Pathomechanismen – zumindest in Hinsicht auf die Toxizität und das Aggregationsverhalten mutanter hSOD1-Spezies – zu eignen.

1.5. Zielsetzung

Bei ALS1 handelt es sich um eine dominant vererbte Erkrankung. Jeder ALS1-Patient besitzt folglich ein wildtypisches und ein mutiertes Allel des *hsod1*-Gens, so dass sowohl wildtypische als auch mutierte hSOD1-Untereinheiten gebildet werden können. Bei der Dimerisierung dieser Untereinheiten entstehen drei Varianten des hSOD1-Enzyms: hSOD1^{WT}-hSOD1^{WT}, hSOD1^{mut}-hSOD1^{mut} und hSOD1^{mut}-hSOD1^{WT}. Obwohl heterodimere hSOD1^{mut}-hSOD1^{WT} theoretisch einen signifikanten Anteil an dimerem hSOD1-Protein ausmacht, wurden bisher kaum Untersuchungen hinsichtlich einer Toxizität dieser Proteinspezies durchgeführt. Erste Hinweise auf eine mögliche Involvierung wildtypischer hSOD1 in die ALS1-Pathomechanismen wurden anhand der Co-Expression von hSOD1^{mut} und hSOD1^{WT} in doppelt-transgenen Mäusen gefunden: In drei unabhängigen Arbeitsgruppen wurde eine signifikant verkürzte Lebensspanne der doppelt-transgenen Mäuse im Vergleich zu einzeln-transgenen Mäusen beobachtet (DENG *et al.* 2006; FUKADA *et al.* 2001; JAARSMAN *et al.* 2000). Neben einer vorgeschlagenen oxidationsabhängigen Konvertierung wildtypischer hSOD1 in eine aggregationsträchtige hSOD1-Spezies (DENG *et al.* 2006) könnte wildtypische hSOD1 auch in Form mutant-wildtypischer Heterodimere zu einer ALS1-auslösenden Toxizität führen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkungen heterodimerer hSOD1^{mut}-hSOD1^{WT} im Vergleich zu homodimerer hSOD1^{mut}-hSOD1^{mut} auf die Pathomechanismen der ALS1 zu untersuchen. Zunächst sollte anhand von Aktivitätsgelen transient transfizierter hSOD1-Monomere sichergestellt werden, dass sich zwischen endogener hSOD1^{WT} und den transfizierten hSOD1^{mut-eGFP} Heterodimere bilden können. Um eine Diskriminierung zwischen den heterodimeren und homodimeren SOD1-Spezies zu ermöglichen, sollten die transfizierten hSOD1-Monomere mit eGFP markiert werden. Zur spezifischen Untersuchung dimerer mutanter SOD1-Formen, sollten anschließend artifizielle Dimerfusionsproteine generiert werden, die aus zwei durch einen flexiblen Peptidlinker kovalent miteinander verbundenen Monomeren bestehen sollten. Neben hSOD1^{WT-WT}-Homodimeren sollten hSOD1^{mut-mut}- und hSOD1^{mut-WT}-Konstrukte von den vier hSOD1^{mut} hSOD1^{G37R}, hSOD1^{G85R}, hSOD1^{G93A} und hSOD1^{A4V} erstellt werden. Zur Visualisierung der Proteine in der Zelle sollten die Dimere mit eGFP oder DsRed2 markiert werden. Anhand der Fusionsproteine sollte das Aggregationsverhalten und die Toxizität

von homo- und heterodimerer hSOD1 sowohl mit Zellkulturmethoden als auch *in vivo* mittels des genetischen Modellorganismus *C. elegans* untersucht werden. Weiterhin sollten eGFP- und DsRed2-fusionierte hSOD1-Monomere generiert werden, um die Involvierung von hSOD1^{WT} in die Aggregatbildung im Zellkulturmodell anhand konfokaler Co-Lokalisationsstudien zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Absaugsystem VacuSafe	Integra, Fernwald
Axiovert Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
Dampfsterilisator VarioClav	H+P, Oberschleißheim
GENterphorese Gelelektrophorese System	GENterprise, Mainz
Heizblöcke	Eppendorf, Hamburg
Klimatisierte Brutschränke	Thermo, Dreieich
Micro Ultrasonic Cell Disrupter	Fisher, Schwerte
Mikroinjektionsequipment	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplattenlesegerät	Thermo Labsystems, Ulm
Mini protean III, Western Blotting System	BioRad, München
PCR DNA Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	InoLab, Weilheim
Power Pack 300	BioRad, München
LAS-3000 Intelligent Dark Box	Fuji, Düsseldorf
Scanner Epson Perfection 2400 Photo	Epson, Meerbusch
Spektrophotometer	Beckmann, München
Stereomikroskop SZ61	Olympus, Hamburg
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Trans-Blot-System	BioRad, München
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen

2.1.2. Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Bacto-Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Pepton	Difco, Detroit (USA)
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Biozym LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl_2)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cholesterol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dulbecco´s modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Lösung	Millipore, Bedford (USA)
Elvanol	Serva, Heidelberg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fötales bovines Serum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Geneticin (G-418)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Gibco BRL, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Ipegal (NP-40)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magermilchpulver	Swissmilk, Bern (Schweiz)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

MassRuler DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Methanol	Roth, Karlsruhe
N,N-Dimethylformamid	Fluka, Deisenhofen
N,N,N ⁺ ,N ⁺ -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad, München
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Paraphenyldiamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PeqGOLD Protein-Marker IV	PeqLab, Erlangen
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Proteinaseinhibitor Cocktail Complete Mini	Roche, Mannheim
Retinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Riboflavin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Uracil	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Xanthin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Xanthin Oxidase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.3. Kits

<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce, Bonn
<i>Gen Elute HP Plasmid Midiprep Kit</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>JetStar Maxi Kit</i>	Genomed, Bad Oeynhausen
<i>NucleoSpin Extract II Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>NucleoSpin Plasmid Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>Omniscript RT Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	Roche, Mannheim
<i>Total RNA Isolation Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren

2.1.4. Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei immortalisierte Zelllinien verwendet. Für transiente Transfektionen wurde die humane Zelllinie HEK 293T (ATCC CRL-11268) benutzt, die sich von embryonalen Nierenzellen ableitet. Um verschiedene Konstrukte in einem neuronalen Hintergrund zu exprimieren, wurde mit der murinen Neuroblastomzelllinie N2A (ATCC CCL-131) gearbeitet.

2.1.5. Bakterien

Für die Transformation von DNA wurden chemokompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien des Stammes DH5 α benutzt (Invitrogen, Karlsruhe). Als Nahrungsquelle für *C. elegans* wurden Uracil-auxotrophe *E. coli* Bakterien des Stammes HB101 verwendet (*Caenorhabditis Genetics Center*, Minnesota, USA).

2.1.6. Nematoden

Für die Generierung transgener Nematoden wurde der für seine niedrige Frequenz spontaner Mutationen bekannte *C. elegans* Wildtypstamm Variation Bristol (N2; *Caenorhabditis Genetics Center*, Minnesota, USA) verwendet.

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Kultivierung von Zelllinien

Alle immortalisierten Zelllinien wurden in Kompletmedium bei 37°C in einem 5 % CO₂-humidifizierten Brutschrank kultiviert. Sobald die in 60 mm Schalen gewachsenen Zellen konfluent waren, wurden sie mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml 1x Trypsinlösung für wenige Minuten inkubiert, bis die Zellen sich von der Kulturschale abgelöst hatten. Die Zellen wurden in 5 ml Kompletmedium aufgenommen und für 4 min bei 800 g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml 37°C warmem Kompletmedium resuspendiert und in einer Endverdünnung von 1:10 auf 60 mm Zellkulturschalen ausplattiert. Bei stabil mit einem pEGFP-N1-Vektorkonstrukt transfizierten Zellen wurde dem Kompletmedium 600 µg/ml Geneticin (G-418) zugegeben.

Kompletmedium:

phenolrothaltiges *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)

10 % [v/v] aktives fötales bovines Serum (FBS)

1 % [v/v] Natriumpyruvat

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

Trypsinlösung (pH 7,4):

0,05 % [w/v] Trypsin

0,1 % [w/v] EDTA

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄, Anhydrat

1,8 mM KH₂PO₄

1x PBS (pH 7,4):

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄, Anhydrat

1,8 mM KH₂PO₄

2.2.2. Konservierung von Zellen

Zur längeren Lagerung von Zellen wurden die unter 2.2.1. beschriebenen Zellpellets in 3,6 ml Einfriermedium resuspendiert und auf zwei auf Eis stehende 1,8 ml Einfrierröhrchen verteilt. Die Einfrierröhrchen wurden sofort bei -80°C weggefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Wiederinkulturnahme eingefrorener Zellen wurden diese zügig im 37°C Wasserbad aufgetaut, in 10 ml Kompletmedium aufgenommen und 4 min bei 800 g abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Pellet in 5 ml Kompletmedium aufgenommen und in einer 6 cm Zellkulturschale ausplattiert.

Einfriermedium für Zellen:

10 % [v/v] DMSO

40 % [v/v] DMEM

50 % [v/v] aktives FBS

2.2.3. Differenzierung neuronaler Zelllinien

Um neuronale Zellen zu differenzieren, wurden sie in Differenzierungsmedium zwischen 48 h und 144 h kultiviert. Während dieser Zeit bildeten die Zellen verstärkt Ausläufer und die Teilungsrate der Zellen minimierte sich.

Differenzierungsmedium:

phenolrothaltiges DMEM

1 µM Retinsäure

2 % [v/v] aktives FBS

1 % [v/v] Natriumpyruvat

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2.2.4. Herstellung stabiler Zelllinien

Zur Transfektion neuronaler Zellen wurde das Lipofectamin-Reagenz der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Um homo-

gene, stabil transfizierte Zelllinien zu erhalten, wurde die Zellsuspension nach dem Passagieren so verdünnt und auf einer 96-Well-Platte ausplattiert, dass sich durchschnittlich eine Zelle pro Well befand. Zur Selektion der klonalen stabil integrierten Linien wurde 600 µg/ml Geneticin (G418) verwendet.

2.2.5. Transiente Transfektionen

Nichtneuronale Zelllinien wurden mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert (GRAHAM and VAN DER EB 1973). Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen so ausgesät, dass eine 10 cm Schale zu ca. 40 % konfluent war. Am Tag der Transfektion wurde das Medium gewechselt und der Transfektionsansatz hergestellt. 10 µg DNA wurden mit 420 µl ddH₂O und 60 µl 2,5 M CaCl₂ vermischt und unter Luftzuführung zu 480 µl 2x Hepes-Puffer gegeben. Anschließend wurde die Lösung für 2 s gevortext und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde vorsichtig im Kompletmedium auf der 10 cm Schale verteilt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen zur Entfernung überschüssiger Präzipitate des Transfektionsansatzes einmal mit 1x PBS gewaschen und in frischen 10 ml Kompletmedium für weitere 24 h kultiviert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen geerntet. Die Transfektion von Zellen auf 3 cm Schalen (bzw. auf Deckgläschen) wurde analog durchgeführt. Es wurden jedoch kleinere Transfektionsansätze verwendet (pro 35 mm Schale 2 µg DNA, 75 µl ddH₂O, 8,3 µl CaCl₂ und 83 µl 2x Hepes-Puffer).

2x Hepes-Puffer (pH 7,12):

280 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄

50 mM Hepes

2.2.6. Kultivierung von Zellen auf Deckgläschen

Hitzesterilisierte Deckgläschen wurden in einer 6-Well-Platte verteilt und mittig in den Wells platziert, wonach sie 30 min lang mit 0,1 mg/ml poly-L-Ornithin beschichtet wurden. Nach dreimaligem Waschen mit ddH₂O wurden die Zellen in der gewünschten Dichte in Kompletmedium ausplattiert, um sie am nächsten

Tag transient zu transfizieren (siehe 2.2.5.). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4 %-igem [w/v] Paraformaldehyd (PFA) 15 min lang fixiert und anschließend dreimal 10 min mit 1x PBS gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschen in einem das *anti-fading*-Mittel Paraphenyldiamin enthaltenden Einbettmedium (JOHNSON and NOGUEIRA ARAUJO 1981) auf Objektträgern platziert und mit Nagellack versiegelt.

Einbettmedium (pH 8):

1 g Elvanol
7 ml 1x PBS
3 ml Glycerol
10 mg Paraphenyldiamin

2.2.7. Zellüberlebensassays

Um das relative Zellüberleben unterschiedlicher Zelllinien zu quantifizieren, wurden MTT-Zellüberlebensassays durchgeführt (BEHL *et al.* 1994). Hierfür wurden die Zellen in Differenzierungsmedium auf einer 96-*well*-Platte zu $1,5 \times 10^4$ Zellen pro *Well* (90 μ l) ausplattiert. Einige *Wells* wurden mit 90 μ l Medium ohne Zellen gefüllt und dienten als Leerkontrolle. Nach 48-stündiger Differenzierung wurden 10 μ l des adäquat verdünnten Toxins (H_2O_2 oder Xanthin) auf die verschiedenen *Wells* verteilt. Nach 24-stündiger Inkubationszeit der Toxine wurden zu jedem *Well* 10 μ l 5 mg/ml MTT-Lösung gegeben. Während einer vierstündigen Inkubation setzten stoffwechselaktive Zellen das gelbe MTT intrazellulär unter Verbrauch von NADH bzw. NADPH zu blauen Formazankristallen um, die durch Zugabe von 2x Solubilisierungspuffer über Nacht im Dunklen gelöst wurden. Die Extinktionen der Lösungen in den verschiedenen *Wells* wurden anhand eines Mikrotiterplattenlesegeräts bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Microsoft Excel*.

MTT-Lösung (pH 7,4):

5 mg/ml MTT
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na_2HPO_4 , Anhydrat
1,8 mM KH_2PO_4

2x Solubilisierungslösung für MTT:

40 % [v/v] Dimethylformamid

10 % [w/v] SDS

1 % [v/v] Essigsäure

2.2.8. Photodokumentation

Die Fluoreszenzaufnahmen der transfizierten Zellen wurden anhand eines Axiovert Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Göttingen) ausgewertet und mit einer Digitalkamera photographisch dokumentiert. Konfokale Aufnahmen wurden mit den Mikroskopen der AG Technau (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) und der AG Neumann (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) gemacht. Anschließend wurden die Aufnahmen mit dem Programm *Adobe Photoshop CS2* bearbeitet.

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Proteinextraktion

Konfluente Zellen wurden dreimal auf Eis mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und anschließend in 1 ml 1x PBS mit Hilfe eines Zellschabers gründlich von ihrer Zellkulturschale abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach achtminütigem Abzentrifugieren bei 1100 *g* und 4°C wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Zur Herstellung nativer Proteinextrakte wurden Zellen in 1x PBS mit Proteaseinhibitoren (PBS-Lysispuffer) resuspendiert und 4x bei 50 Hz sonifiziert. Für denaturierte Proteinextrakte wurden Zellen in Proteaseinhibitor-haltigem 1x SDS-Lysispuffer aufgenommen und 4x sonifiziert. Anschließend wurden die Lysate 5 min bei 99°C erhitzt. Um Aggregate von löslichen Proteinen zu trennen, wurden Zellextrakte fraktioniert. Die Zellen wurden in 400 µl 1x PBS-Lysispuffer resuspendiert und 4x sonifiziert. Von diesem Extrakt wurden 100 µl abgenommen (L-Fraktion). Das verbleibende Extrakt wurde für 15 min bei 4°C und 15500 *g* zentrifugiert. Der Überstand (Ü-Fraktion) wurde abgenommen und das Pellet wurde mit 100 µl

1x PBS-Lysispuffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 150 µl 1x SDS-Lysispuffer aufgenommen, 4x sonifiziert und für 5 min bei 99°C erhitzt (P-Fraktion).

1x PBS Lysispuffer (pH 7,4):

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄, Anhydrat

1,8 mM KH₂PO₄

1 Tablette / 10 ml PIC (Protease Inhibitor Cocktail, Roche)

1x SDS Lysispuffer:

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8

2 % [w/v] SDS

10 % [w/v] Saccharose

1 Tablette / 10 ml PIC

2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Proteinextrakten wurde anhand des *BCA Protein Assay Kits* der Firma Pierce (Bonn) gemessen. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde relativ zu einer BSA-Konzentrationsreihe bestimmt. Die Messung erfolgte nach halbstündiger Inkubation aller mit einem Detektionsreagenz versetzten Proben in einem 60°C warmen Wasserbad. Der dem Proteingehalt proportionale Farbumschlag der Proben wurde nach Auftrag in eine 96-Well-Platte in einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 560 nm gemessen.

2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das negativ geladene SDS bindet stöchiometrisch (~ 1 SDS/3 AS) an die Proteine, so dass eine Auftrennung – unabhängig von der Eigenladung der Proteine – zur Anode hin erfolgt. Ein niederprozentiges Sammelgel mit einem pH

von 6,8 dient zur Synchronisierung der Proteinextrakte, bevor sie in das Trenngel gelangen. Zur Durchführung einer SDS-PAGE wurden Minigele (Biorad, München) verwendet (Tabelle 2). Die Gele wurden mit einer adäquaten Menge der zu analysierenden Proteinproben beladen, die zuvor in 4x Probenpuffer bei 99°C für fünf Minuten erhitzt wurden. Durch das im Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol wurden die Disulfidbrücken der Proteine reduziert, während das Erhitzen und das SDS nicht-kovalente Wechselwirkungen der Aminosäuren denaturierten. Als Proteinstandard wurden 3 μ l des *peqGOLD Markers IV* (PEQLab, Erlangen) aufgetragen. Die auf das PAGE-Gel aufgetragenen Proteinproben wurden bei einer Spannung von 100–150 V in einer mit 1x Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt, bis die Bromphenolblaufront aus dem Gel ausgetreten war. Die Proteinbanden des Acrylamidgels konnten nun entweder anhand einer Coomassieblaufärbung sichtbar gemacht und fotografiert werden, oder das Proteingel wurde für eine *Westernblot*-Analyse (siehe 2.3.4.) verwendet.

Tabelle 2: Zusammensetzung von PAGE-Gele unterschiedlicher Konzentration

Konzentration		Acrylamid (40 %, 29:1)	Puffer (pH)		Wasser	10 % APS	TEMED
TG	SG		TG (6,8)	SG (8,8)			
8 %	-----	2 ml	2,5 ml	-----	5,5 ml	100 μ l	10 μ l
12 %	-----	3 ml	2,5 ml	-----	4,5 ml	100 μ l	10 μ l
-----	3 %	0,75 ml	-----	2,5 ml	6,5 ml	100 μ l	10 μ l

4x Probenpuffer für SDS-PAGE (pH 6,8):

200 mM Tris-HCl
 40 % Glycerol
 4 % SDS
 0,02 % Bromphenolblau
 200 μ l β -Mercaptoethanol

4x Sammelgelpuffer für SDS-PAGE (pH 6,8):

0,6 M Tris
 4 % [w/v] SDS

4x Trenngelpuffer für SDS-PAGE (pH 8,8):

1,5 M Tris
 4 % [w/v] SDS

1x Laufpuffer für SDS-PAGE:

25 mM Tris
250 mM Glycin
0,1 % [w/v] SDS

2.3.4. *Westernblot*-Analyse

Um Proteine spezifisch durch Immundektion nachweisen zu können, wurden sie von einem PAGE-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer fand in einer mit 1x Transferpuffer gefüllten Nassblotkammer über Nacht bei 30 V oder innerhalb von 2 h bei 100 V statt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und in Ponceau-S-Lösung angefärbt. Nach kurzem Waschen mit Wasser wurde ein Proteinbandenmuster sichtbar, anhand dessen man die Qualität des Transfers und die Gleichmäßigkeit der Beladung des Acrylamidgels beurteilen konnte.

1x Transferpuffer:

25 mM Tris
250 mM Glycin
0,1 % [w/v] SDS
20 % [v/v] Methanol

Ponceau S-Färbelösung:

0,5 % [w/v] Ponceau S
1 % [v/v] Essigsäure

2.3.5. Immundetektion membrangebundener Proteine

Um indirekte Immundektionen durchzuführen, wurde die Nitrozellulosemembran aus 2.3.4. in eine Inkubationskammer überführt und zur Absättigung unspezifischer Bindungen der Proteine 1 h lang mit Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper (Tabelle 3) in 4 ml Blockierungspuffer verdünnt und auf die Membran gegeben, die bei 4°C über Nacht leicht geschwenkt wurde. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die

Membran 3x 10 min in 1x PBST gewaschen. Anschließend wurde der adäquate Sekundärantikörper (Tabelle 4) in 5 ml Blockierungspuffer 1:10000 verdünnt und für eine Stunde bei RT auf die Membran gegeben, wonach die Membran wieder 3x 10 min mit 1x PBST gewaschen wurde. Die Visualisierung der gewünschten Proteinbanden fand anhand einer Peroxidasereaktion mit einem Chemilumineszenzsubstrat (Millipore, Bedford, USA) statt. Das durch die Reaktion der an den Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase mit dem Chemilumineszenz-Substrat entstehende Signal wurde mit Hilfe der *LAS-3000 Intelligent Dark Box* der Firma Fuji dokumentiert.

Tabelle 3: Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Firma	Verdünnung
SOD1-Antikörper	Kaninchen	Stressgen	1:2500
GFP-Antikörper	Maus	Covance	1:5000
Tubulin-Antikörper	Maus	Sigma-Aldrich	1:1000
Aktin-Antikörper	Kaninchen	Sigma-Aldrich	1:1000
Histon H3-Antikörper	Maus	Abcam	1:1000
DNP-Antikörper	Kaninchen	Molecular Probes	1:1000

Tabelle 4: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Konjugat	Firma	Verdünnung
Kaninchen-IgG-Antikörper	HRP	Jackson Immunolab	1:10000
Maus-IgG-Antikörper	HRP	Jackson Immunolab	1:10000

1x PBST (pH 7,4):

137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 10 mM Na₂HPO₄, Anhydrat
 1,8 mM KH₂PO₄
 0,05 % [v/v] Tween20

Blockierungspuffer (pH 7,4):

4 % [w/v] Magermilchpulver
 137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 10 mM Na₂HPO₄, Anhydrat
 1,8 mM KH₂PO₄
 0,05 % [v/v] Tween20

2.3.6. Detektion carbonylierter Proteinreste

Da Aminosäurereste unter Bedingungen des oxidativen Stresses vermehrt carbonyliert werden, kann ihr Carbonylierungsstatus als Marker für oxidative Schädigungen dienen (LEVINE *et al.* 1994). Sechs Tage lang differenzierte N2A-Zellen wurden geerntet, in 300 µl SDS-Lysispuffer lysiert und 4x sonifiziert. Nach fünfminütigem Aufkochen der Extrakte wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 2.3.2.) durchgeführt. Je 15 µg Proteinextrakt wurden in einem 10 µl Ansatz aufgekocht und anschließend bei RT für 20 min mit 10 µl 10 mM DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazin) inkubiert. Nach Neutralisierung des pH-Wertes mit 10 µl 3 M Tris wurden 8 µl 4x Probenpuffer zugegeben und ein 12 %-iges PAGE-Gel mit den Proben beladen. Nach dem Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit 10 % Blockierungspuffer abgesättigt. Carbonylierte Proteinreste wurden anhand eines polyklonalen DNP-Antikörpers detektiert.

2.3.7. Densitometrische Vermessung der detektierten Proteine

Für die Quantifizierung von Proteinbanden nach einer *Westernblot*-Analyse wurde die *Aida Image Analyzer Software* verwendet. Es wurden die relevanten Banden markiert und unter Berücksichtigung des Hintergrundes zweidimensional densitometrisch vermessen. Die Werte der Vermessung wurden in *Microsoft Excel* importiert und zueinander in Relation gesetzt.

2.3.8. SOD1-Aktivitätsassay

Für SOD1-Aktivitätsassays (CRAPO *et al.* 1978) wurden native Proteinextrakte (siehe 2.3.1.) verwendet. Je 30 µg Extrakt wurden in nativem Ladepuffer auf ein nicht-denaturiertes PAGE-Gel (Tabelle 5) geladen und 17 h in nativem Laufpuffer bei 75 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 45 min lichtgeschützt in Färbelösung inkubiert und zur Dokumentation gescannt.

Tabelle 5: Zusammensetzung von nativen PAGE-Gelen

Konzentration	Acrylamid (40 %, 29:1)	50 % Glycerol	1,5 mM Tris pH 8,8	Riboflavin (1 mg/ml)	Wasser	10 % APS	TEMED
7 %	1,75 ml	2,5 ml	2,5 ml	14 µl	3,25 ml	100 µl	10 µl
14 %	3,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	14 µl	1,5 ml	100 µl	10 µl

1x Laufpuffer für native PAGE:

144 g Glycin
 69 g Tris
 ad. 1 l ddH₂O

Färbelösung für SOD1-Aktivitätsassays (pH 7,4):

50 mM K₂HPO₄
 275 µg/ml NBT
 65 µg/ml Riboflavin
 3,2 µl/ml TEMED

2x Ladepuffer für native PAGE (pH 6,8):

1 ml 1M Tris
 2 ml 100 % Glycerol
 400 µl 1 % Bromphenolblau
 40 µl 100 % Ipegal
 ad. 10 ml ddH₂O

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von MULLIS entwickelte PCR ist ein Standardverfahren zur Amplifizierung von DNA (MULLIS *et al.* 1986). Hierbei synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase einen durch zwei flankierende Oligonukleotide begrenzten Bereich innerhalb der DNA, die so in mehreren PCR-Zyklen exponentiell vermehrt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR dafür verwendet, um DNAs für eine Klonierung zu amplifizieren. Es wurden jeweils spezifische DNA-Oligonukleotide entworfen (Tabelle 6, Tabelle 7) und von der Firma MWG (München) synthetisiert. Für PCRs, deren Produkte kloniert werden sollten, wurden 50 µl Ansätze verwendet. Um das Risiko einer fehlerhaften Amplifikation zu minimieren, wurde die *Phusion*

High Stability Polymerase der Firma Invitrogen (Karlsruhe) benutzt, die eine 3'-5'-*Proofreading*-Aktivität besitzt. Test-PCRs wurden in 25 µl Ansätzen mit der *Taq* Polymerase von Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt, die keine *Proofreading*-Eigenschaft besitzt.

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotidname	Oligonukleotidsequenz	Anwendung
egfp_BglII_for	5'-GAAGATCTATGGCCACGAAGGCCGTGTG-3'	Amplifikation (SOD1/1)
XbaI rev	5'-GCTCTAGATTGGGCGATCCCAATTACAC-3'	
ClaI for	5'-CCATCGATATGGCCACGAAGGCCGTGTG-3'	Amplifikation (SOD1/2)
egfp_EcoRI_rev2	5'-CGAATTCCTTGGGCGATCCCAATTACAC-3'	
Linker-XbaI_for	5'-GCTCTAGAGGTGGCGGCAGTGGCGGTG-3'	Amplifikation Linker
Linker-ClaI_rev	5'-CCATCGATGCCACCGCCACTGCCACCG-3'	
egfp_BglII_for_ms	5'-GAAGATCTATGGCGATGAAAGCGGTGTG-3'	Amplifikation msSOD1
egfp_EcoRI_rev2_ms	5'-CGAATTCCTGCGCAATCCCAATCACTC-3'	
egfp_EcoRI_rev_ms	5'-CGAATTCCTACTGCGCAATCCCAATCA-3'	
eleg_for	5'-CGCTACCGACTCAGATCT-3'	Ampl. SOD_dim
eleg_rev	5'-ATACTCGAGTTTTATGTTTCAGGGGG-3'	Seq. 1727_for
eleg_for2	5'-CCAGCTCATTCCATTTAATACT-3'	
eleg_rev2	5'-ATACTCGAGTTTTATGTTTCAGGTTTCAG-3'	Seq. 1727_rev
egfp_EcoRI_rev1	5'-CGAATTCCTATTGGGCGATCCCAATTA-3'	Amplifikation (SOD1/2 _{stop})
egfp_for (=DsRed2_for)	5'-ATAAGCAGAGCTGGTTTAGTG-3'	Seq. pEGFP_for, pDsRed_for
egfp-N_rev	5'-CGTCGCCCGTCCAGCTCGACCAG-3'	Seq. pEGFP_rev
DsRed2_rev	5'-GGTGCCCTCCATGCGCAC-3'	Seq. pDsRed_rev
gfp_for	5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'	Amplifikation gfp
gfp_rev	5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'	
BglII_for_A4V	5'-GAAGATCTATGGCCACGAAGGTCGTGTG-3'	Amplifikation (SOD1 ^{A4V} /1)
ClaI_for_A4V	5'-CCATCGATATGGCCACGAAGGTCGTGTG-3'	Amplifikation (SOD1 ^{A4V} /2)

Tabelle 7: Linker Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz
Linker Oligonukleotidsequenz	5'-GGTGGCGGCAGTGGCGGTGGCAGTGGCGGTGGCACTGGCGGTGGCAGTGGCGGTGGC-3'
Linker Aminosäuresequenz	NH ₂ -GGG(SGGG) ₂ TGGGSGGG-COOH

Schema eines 50 µl PCR-Ansatzes:

1 µl Oligo for (10 pmol)
 1 µl Oligo rev (10 pmol)
 1 µl dNTPs (10 mmol)
 5 µl 10x Puffer (inkl. MgCl₂)
 0,5 µl Phusion Polymerase
 10 – 50 ng DNA
 ad. 50 µl ddH₂O

Schema eines 25 µl PCR-Ansatzes:

0,5 µl Oligonukleotid for (10 pmol)
 0,5 µl Oligonukleotid rev (10 pmol)
 0,5 µl dNTPs (10 mmol)
 2,5 µl 10x Puffer (ohne MgCl₂)
 0,75 µl 50 mM MgCl₂
 0,1 µl *Taq* Polymerase
 10 – 50 ng DNA
 ad. 25 µl ddH₂O

2.4.2. Agarose-Gelelektrophorese

Um das Vorhandensein und die Größe von DNA-Fragmenten zu überprüfen, wurden 5 µl PCR- oder Restriktions-Produkt mit 6x Probenpuffer vermischt und auf ein vertikales 1,0–1,5 %-iges Agarosegel (Genterprise, Mainz) geladen. Als DNA-Standard wurden 2,5 µl *Massruler* der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) aufgetragen. Die DNA wurde in einer mit 1x TBE gefüllten Elektrophoresekammer bei 100 mA aufgetrennt, bis die Bromphenolblaufront des Probenpuffers zu ca. zwei Dritteln das Gel passiert hatte. Das Gel wurde für einige Minuten in ein Ethidiumbromid-Färbebad gelegt, so dass die den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid enthaltende DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden konnte.

1x TBE-Puffer:

10,8 g Tris
5,5 g Borsäure
4 ml 0,5 M NaEDTA
ad. 1 l ddH₂O

6x Probenpuffer für Agarose-Gelelektrophorese:

10 mM Tris-HCl pH 8,0
50 % [v/v] Ficoll
0,006 % [w/v] Bromphenolblau

2.4.3. Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden diese auf ein vertikales 1,0–1,5 %-iges Agarosegel geladen und wie unter 2.4.2. beschrieben aufgetrennt. Um Mutationen der DNA zu vermeiden, wurde für die Visualisierung der zu extrahierenden Banden energiearmes UV-Licht der Wellenlänge 366 nm verwendet. Der die Ziel-DNA enthaltende Agarosebereich wurde mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und gewogen. Anschließend wurde die DNA mit dem *Nucleo-spinExtract Kit II* der Firma Macherey-Nagel (Düren) gemäß den Angaben des Herstellers wiedergewonnen.

2.4.4. Restriktion

Für eine gerichtete Klonierung wurden sowohl der Zielvektor als auch die *Insert*-DNA in einem Doppelverdau restringiert. Es wurden jeweils für beide Enzyme optimale Puffer und ggf. BSA verwendet. In einem 60 µl Restriktionsansatz wurden 5 µg DNA eingesetzt und bis zum vollständigen Verdau (1–2 h) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die relevanten Banden durch präparative Gel-elektrophorese (siehe 2.4.3.) wiedergewonnen und aufgereinigt. Für Testrestriktionen wurden 10 µl Restriktionsansätze verwendet.

Schema eines 60 µl Doppelrestriktions-Ansatzes:

1,5 µl Restriktionsenzym 1
1,5 µl Restriktionsenzym 2
6 µl Puffer
[0,6 µl BSA]
5 µg DNA
ad. 60 µl ddH₂O

Schema eines 10 µl Doppelrestriktions-Ansatzes:

0,25 µl Restriktionsenzym 1
0,25 µl Restriktionsenzym 2
1 µl Puffer
[0,1 µl BSA]
50-500 ng DNA
ad. 10 µl ddH₂O

2.4.5. Ligation

Um gerichtet restringierte Vektoren und *Inserts* zu ligieren, wurde das *Rapid DNA Ligation Kit* von Roche (Mannheim) verwendet. Das Verhältnis zwischen der DNA-Menge des Vektors im Vergleich zur DNA-Menge des *Inserts* betrug 1:3. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 10 µl 2x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase verwendet.

2.4.6. Transformation

Zur Transformation von Bakterien mit Vektor-DNA wurde der 20 µl Ligationsansatz oder 100 ng Plasmid-DNA mit einem 50 µl Aliquot chemokompetenter *E. coli* DH5α Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde den Bakterien ein 30-sekündiger Hitzeschock von 42°C versetzt, wonach sie sofort zurück auf Eis gestellt wurden. Anschließend wurden die Bakterien für 30 min bei 37°C in 1 ml LB-Medium geschwenkt, damit sie sich von dem Transformationsstress erholen konnten. Zwischen 50 und 200 µl Bakterien-suspension wurden auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht in einem 37°C-Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Klone mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 4 ml antibiotikahaltiges LB-Medium überführt. Die Bakterienkulturen wurden ca. 16 h lang in einem 37°C Schüttelinkubator geschwenkt.

LB-Medium (pH 7,5):

1 % [w/v] Bacto-Trypton

0,5 % [w/v] Hefeextrakt

1 % [w/v] NaCl

autoklavieren

LB-Agar:

1 % [w/v] Bacto-Trypton

0,5 % [w/v] Hefeextrakt

1 % [w/v] NaCl

1,5 % [w/v] Bacto-Agar

autoklavieren

2.4.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Um aus Bakterienkulturen Plasmid-DNA zu isolieren wurden Plasmidpräparationen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (BIRNBOIM and DOLY 1979) durchgeführt. Für die Plasmidpräparation von 4 ml Übernachtskulturen (siehe 2.4.6.) wurde das *NucleoSpin Plasmid Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Für die Mikroinjektion von *C. elegans* (siehe 2.5.4.) wurden Plasmidpräparationen

mit hoher Reinheit benötigt. Deshalb wurde für die Präparation der *C. elegans*-Expressionsvektoren das *GenElute HP Plasmid Midiprep Kit* der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) benutzt. Die Plasmidpräparation im großen Maßstab (200 ml Ansatz) wurde anhand des *JetStar Maxi Kits* der Firma Genomed (Bad Oeynhausen) durchgeführt. Alle Kits wurden gemäß den Angaben der Vertreiber verwendet. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Midipräparation betrug sie normalerweise zwischen 300 und 600 ng/ μ l, wohingegen die Ausbeute einer Maxipräparation zwischen 3 und 6 μ g/ μ l lag.

2.4.8. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Zur RNA-Extraktion wurde das *Total RNA Isolation Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Extinktion der gewonnenen RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt, woraus die RNA-Konzentration anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet wurde. Die Reinheit der RNA wurde anhand des Quotienten der Extinktionen bei 260 und 280 nm bestimmt. Bei reiner RNA betrug der Quotient zwischen 1,7 und 2,1.

2.4.9. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das *Omniscript RT PCR Kit* der Firma Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils 2 μ g RNA eingesetzt.

2.4.10. DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt. Anschließend wurden die Sequenzrohdaten anhand des Programms *Chromas* editiert. *Alignments* wurden mit dem Programm *Clone Manager 7 (Sci Ed Software)* erstellt.

2.5. *C. elegans* Methoden

2.5.1. Kultivierung von *C. elegans*

Der Nematode *C. elegans* wurde in einem klimatisierten Brutschrank bei 20°C auf NGM (*Nematode Growth Medium*)-Agarplatten kultiviert. Es wurden Agarplatten verwendet, auf denen ein Bakterienrasen des Stammes *E. coli* HB101, ausgesät war. Zur Kultivierung wurden einige Nematoden mit einem abgeflamnten Platindraht auf eine frische NGM-Agarplatte transferiert, bevor der Bakterienrasen komplett verbraucht war. NGM-Agarplatten wurden unter sterilen Bedingungen gegossen, wobei 4,5 ml Agar auf 35 mm Petrischalen und 11,5 ml Agar auf 60 mm Petrischalen gegeben wurde. Sobald die Agarplatten nach ca. 16 h vollständig getrocknet waren, wurden sie mit bakteriellen Starterkulturen beimpft.

1 M PPB (ph 6,0 mit 10 N KOH):

0,72 M KH_2PO_4

0,28 M K_2HPO_4

NGM-Agarplatten:

0,3 % [w/v] NaCl

0,25 % [w/v] Bacto-Pepton

1,6 % [w/v] Bacto-Agar

Autoklavieren und auf 60°C abkühlen lassen

25 mM PPB (pH 6,0)

1 mM CaCl_2

1 mM MgSO_4

200 µg/ml Uracil

500 µg/ml Cholesterol

100 µg/ml Streptomycin

2.5.2. Bakterielle Starterkulturen

Als Nahrungsquelle für *C. elegans* dienten Uracil-auxotrophe *E. coli* HB101, so dass die Bakterien ausschließlich auf dem Uracil-supplementierten NGM-Agar

wachsen konnten. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Bakterien stets frisch angesetzt. Eine bakterielle Dauerkultur wurde auf einer LB-Streptomycin-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Klon in einen sterilen, 100 ml LB-Streptomycin-Medium enthaltenden, Erlenmeyerkolben überführt und für ca. 16 h bei 37°C in einen Brutschrank gestellt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf NGM-Agarplatten pipettiert, wobei auf die 35 mm Agarplatten 150 µl und auf die 60 mm Agarplatten 350 µl Bakteriensuspension gegeben wurden. Die Bakteriensuspension wurde so auf den NGM-Agarplatten verteilt, dass der Randbereich des Agars bakterienfrei war. Anschließend wurden die Platten für 48 h getrocknet und bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert.

2.5.3. Konservierung von *C. elegans*

Da *C. elegans* unter Stressbedingungen (wie Nahrungsmangel) im L2-Stadium widerstandsfähige Dauerlarven entwickelt, ist es möglich, gehungerte Nematoden zur langfristigen Aufbewahrung einzufrieren. Es wurden drei 60 mm Schalen gehungerter Nematoden mit 1 ml M9-Puffer nacheinander von den NGM-Agarplatten gespült und in einem 1,8 ml Gefrierröhrchen auf Eis mit 1 ml *C. elegans* Einfriermedium (SULSTON et al., 1974) vermischt. Um eine ungleichmäßige Sedimentation der Nematoden zu vermeiden, wurden die Gefrierröhrchen bis zum vollständigen Durchfrieren vertikal bei -80°C gelagert; danach konnten sie senkrecht bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff für unbegrenzte Zeit gelagert werden.

10x M9-Puffer:

6 % [w/v] Na₂HPO₄, Anhydrat

3 % [w/v] KH₂PO₄, Anhydrat

1 % [w/v] NH₄Cl

0,5 % [w/v] NaCl

autoklavieren

2x *C. elegans* Einfriermedium:

100 mM NaCl
50 mM PPB (pH6,0)
30 % [v/v] Glycerol
0,3 mM MgSO₄
sterilfiltrieren

2.5.4. Mikroinjektion von DNA in *C. elegans*

Zur Herstellung transgener *C. elegans* wurden verschiedene DNA-Konstrukte in die Gonaden von L4-Larven des Wildtypstammes N2 mikroinjiziert (FIRE 1986). Um transgene Nematoden identifizieren zu können, wurde eine Co-Injektion des DNA-Konstrukts mit dem Markerkonstrukt pRF4 (rol6 [su1006dm]) durchgeführt, so dass transgene Nachkommen kein Kollagen synthetisieren konnten und deshalb den *Roller*-Phänotyp zeigten. Beide Plasmide wurden in äquimolaren Mengen eingesetzt (jeweils 60 ng), nachdem sie zur Sedimentierung grober Partikel, die die Injektionsnadel verstopfen könnten, bei 15500 *g* abzentrifugiert worden waren. Für die Injektion wurden dünne 3 %-ige Agarosepads auf Objektträgern vorbereitet, auf denen die L4-Larven in einem Tropfen Halocarbonöl fixiert wurden. Nach der Co-Injektion der Plasmide in die Gonaden wurden die Nematoden mit 1x M9-Puffer von dem Agarosepad gelöst und auf 35 mm NGM-Platten transferiert. Die F1-Nachkommen wurden anhand des *Roller*-Phänotyps selektiert und vereinzelt. Ca. 10 % der F1-Nachkommen vererbten die in die Parentalgeneration injizierte DNA als extrachromosomale DNA-Elemente an die F2-Generation weiter und bildeten somit stabile extrachromosomale Linien. Die Penetranz der extrachromosomalen Vererbung war bei jeder Linie konstant und betrug zwischen 10 % und 90 % (MELLO and FIRE 1995).

2.5.5. Generierung von stabil integrierten Linien

Um extrachromosomal vorliegende Plasmide stabil in *C. elegans* zu integrieren, wurden 60 L4-Larven auf eine bakterienfreie NGM-Platte transferiert. Anschließend wurde die Platte ohne Deckel in einem *UV-Crosslinker* mit 300 J/m² UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Die F1-Generation der bestrahlten

Nematoden wurde vereinzelt und anhand der Frequenz der *rol6*-transgenen Tiere selektiert.

2.5.6. Generierung männlicher *C. elegans*

Um männliche *C. elegans* zu erhalten, wurden L4-Larven einem sechsstündigen Hitzeschock von 30°C ausgesetzt. Anschließend wurden die Nematoden wieder bei 20°C in Kultur genommen. Die Frequenz männlicher Nematoden, die anhand einer schaufelförmigen Struktur am Schwanzende identifiziert wurden, stieg durch den Hitzeschock auf ca. 5 % an. Anschließend wurden die männlichen Nematoden isoliert und mit Hermaphroditen verpaart (siehe 2.5.7.), was in einem Männeranteil des Nachwuchses von 50 % resultierte.

2.5.7. Verpaarung von *C. elegans*

Um UV-bedingte Schäden zu reduzieren, wurden die mit UV-Licht bestrahlten *C. elegans* Hermaphroditen mindestens zweimal mit männlichen *C. elegans* ausgekreuzt. Hierfür wurden NGM-Agarplatten verwendet, auf denen lediglich ein Tröpfchen *E. coli* HB101 ausgesät war, so dass alle sich auf der Platte befindenden Nematoden mit hoher Wahrscheinlichkeit in dieser Region aufeinandertrafen. Es wurde jeweils eine bestrahlte L4-Hermaphrodite mit vier bis sechs männlichen *C. elegans* zusammengesetzt. Eine erfolgreiche Verpaarung zeigte sich in einem hohen Anteil (ca. 50 %) männlicher Nachkommen.

2.5.8. Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurden Mischkulturen nicht gehungerter Nematoden mit M9-Puffer von fünf 60 mm Kulturschalen gespült und für 1 min bei 3000 g abzentrifugiert. Der die Bakterien enthaltende Überstand wurde abgesaugt und die pelletierten Nematoden wurden in 1x PBS-Lysispuffer oder in 1x SDS-Lysispuffer (siehe 2.3.1.) resuspendiert. Anschließend wurden die Extrakte 4x sonifiziert. Für eine Fraktionierung von *C. elegans* wurde analog zu 2.3.1. verfahren.

2.5.9. SOD1-Aktivitätsassay

Der SOD1-Aktivitätsassay wurde größtenteils wie unter 2.3.8. beschrieben durchgeführt. Anstatt des Komplettlysates wurden jedoch ca. 60 µg der Ü-Fraktion auf ein 6 %-iges natives PAGE-Gel geladen und bei 30 V für 17 h laufen gelassen.

2.5.10. Bewegungsassay

Um das Bewegungsvermögen transgener Nematoden zu untersuchen, wurden L4-Larven in einen Tropfen M9-Puffer überführt. Nach einminütiger Regenerationsphase wurden für 30 s alle Ausschläge der Nematoden gezählt.

2.5.11. Paraquat Überlebensassay

Als Induktor für oxidativen Stress wurde das Herbizid Paraquat in Konzentrationen von 2,5 mM und 5 mM verwendet. Je 20 L4-Larven wurden auf bakterien- und 0,1 mg/ml 5-fluorodeoxyuridine (FUDR)-haltigen Paraquat- oder Kontroll-NGM-Platten überführt und bei 20°C kultiviert. Das Überleben der Nematoden wurde alle 24 h überprüft, indem anhand eines Platindrahtes ein leichter Druck auf die Würmer ausgeübt wurde. Nematoden, die nicht auf den Druck reagierten, wurden als tot bewertet. Unauffindbare oder mechanisch verletzte Würmer wurden aus der Statistik entfernt.

2.5.12. Bestimmung der Lebensspanne

Für die Lebenszeitbestimmung wurden mindestens 20 L4-Larven pro Linie auf eine bakterienhaltige NGM-Platte gesetzt. Während der reproduktiven Phase wurden die Nematoden jeden Tag auf eine frische NGM-Platte transferiert, nach der reproduktiven Phase wurde alle drei Tage die NGM-Platte erneuert. Das Überleben der Nematoden wurde alle 24 h überprüft, indem anhand eines Platindrahtes ein leichter Druck auf die Würmer ausgeübt wurde. Nematoden, die

nicht auf den Druck reagierten, wurden als tot bewertet. Unauffindbare oder mechanisch verletzte Würmer wurden aus der Statistik entfernt.

3. Ergebnisse

3.1. Generierung und Charakterisierung von SOD1-Monomer-konstrukten

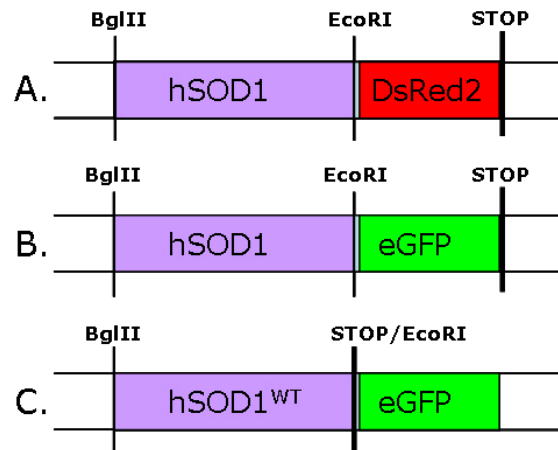
Zur Untersuchung der Pathomechanismen, die den selektiven Zelltod von Neuronen in ALS1-Patienten zur Folge haben, wurden eukaryotische Expressionsvektoren mit unterschiedlichen punktmutierten SOD1-cDNAs generiert. Neben zwei Wildtyp-ähnlichen Mutationen, die sich in den β -Faltblättern befinden (hSOD1^{G37R} und hSOD1^{G93A}), wurde eine Mutation, die in der Nähe des aktiven Zentrums liegt und folglich zu einem Aktivitätsverlust der Untereinheit führt (hSOD1^{G85R}), sowie eine Mutation, die sich an der Dimerisierungsdomäne befindet (hSOD1^{A4V}), ausgewählt. Zur besseren Visualisierung der Fusionsproteine und zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens der verschiedenen hSOD1^{mut} wurden die cDNAs in den pEGFP-N1 Vektor und in den pDsRed2-N1 Vektor kloniert, die jeweils ein Grün- bzw. Rot-fluoreszierendes Protein codierten.

3.1.1. Generierung von SOD1-Monomerkonstrukten

Zur Generierung von SOD1-Monomerkonstrukten wurden die entsprechenden SOD1^{mut}- oder SOD1^{WT}-cDNAs mittels PCR amplifiziert. Die cDNAs für hSOD1^{WT}, hSOD1^{G37R}, hSOD1^{G85R} und hSOD1^{G93A} waren bereits in den pTRE2 Vektor der Firma Clontech kloniert worden. Sie wurden mit Oligonukleotiden amplifiziert, an die die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BglII und EcoRI angehängt waren. Die DNA-Sequenz für hSOD1^{A4V} wurde anhand eines Oligonukleotids gewonnen, das zusätzlich zu der BglII-Restriktionssequenz einen Basenaustausch am 14. Nukleotid (Cytosin => Thymin) der hSOD1-Sequenz enthielt. Anhand dieses Oligonukleotids wurde eine PCR mit der hSOD1^{WT}-cDNA durchgeführt, die in einem hSOD1^{A4V}-Amplifikat resultierte. Für die Generierung der msSOD1^{WT}-cDNA wurde aus der murinen Zelllinie HT22 RNA extrahiert und revers transkribiert. Anhand der entstandenen cDNA wurde *mssod1* mittels PCR mit Oligonukleotiden amplifiziert, die ebenfalls überhängende Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BglII und EcoRI hatten. Damit die SOD1-cDNAs im gleichen Leserahmen wie

Abbildung 8: Schematische Darstellung der SOD1-Monomerkonstrukte

Die hSOD1-cDNAs (lila) wurden unter Deletion des Stopcodons im Leserahmen des DsRed2 (rot) bzw. des eGFP (grün) über die BglII- und die EcoRI-Restriktionsschnittstelle in den pDsRed2-N1 (A) bzw. in den pEGFP-N1 (B) Vektor kloniert. Um unfusionierte hSOD1^{WT} zu generieren wurde ein Stopcodon in das reverse Oligonukleotid eingebaut (C).



das eGFP bzw. das DsRed2 waren, wurde in das reverse Oligonukleotid ein zusätzliches Nukleotid eingebaut. Außerdem wurde das Stopcodon der hSOD1-cDNA deletiert, um die Fusion der beiden Proteine zu ermöglichen (Abbildung 8A & B). Konstrukte, die auf Proteinebene nicht mit eGFP oder DsRed2 fusionieren sollten, wurden mit Oligonukleotiden amplifiziert, die das Stopcodon enthielten (Abbildung 8C). Die Amplifikate mit den angehängten Restriktionsschnittstellen wurden mit BglII und EcoRI restringiert und in die gleichermaßen restringierten Expressionsvektoren pEGFP-N1 bzw. pDsRed2-N1 kloniert. Abschließend wurde die Nukleotidabfolge der Konstrukte mittels einer Sequenzierung verifiziert.

3.1.2. Charakterisierung transient in HEK 293T-Zellen exprimierter hSOD1^{eGFP}-Fusionsproteine

Zunächst musste überprüft werden, ob die SOD1-Fusionsproteine trotz des eGFPs korrekt gefaltet und somit in der Lage waren, zu dimerisieren und die für die SOD1^{WT} typische Dismutase-Reaktion zu katalysieren. Hierfür wurden hSOD1^{WT-eGFP}, hSOD1^{G37R-eGFP}, hSOD1^{G85R-eGFP}, hSOD1^{G93A-eGFP} und hSOD1^{A4V-eGFP}, sowie eGFP (Mock^{eGFP}) transient in HEK 293T-Zellen exprimiert. Mit nativen Komplettlysaten dieser Zellen wurde die Dismutaseaktivität anhand eines Aktivitätsassays bestimmt (Abbildung 9A). Dabei wurde gezeigt, dass hSOD1^{WT-eGFP}, hSOD1^{G37R-eGFP} und hSOD1^{G93A-eGFP} einerseits aktive Homodimere bildeten, und

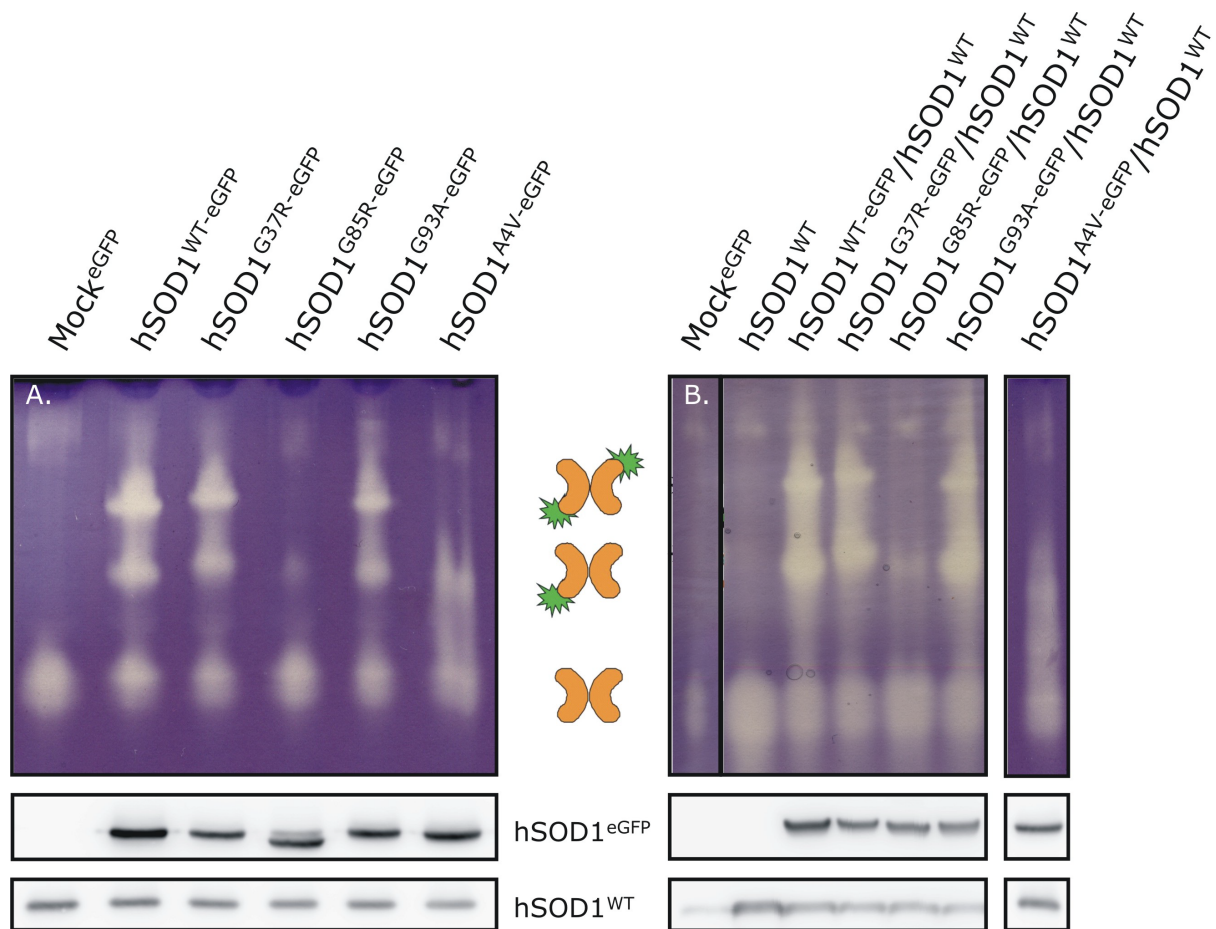


Abbildung 9: Transient transfizierte hSOD1^{eGFP}-Fusionskonstrukte zeigen eine spezifische Dismutaseaktivität

SOD1-Aktivitätsassay und Immunblot von Extrakten transient transfizierter HEK 293T-Zellen. Je 30 µg Komplettlysat der Zellen wurden auf ein 15 %-iges SOD1-Aktivitätsgel und je 15 µg Komplettlysat wurden auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen. Die Immundetektion der Fusionsproteine und der als Ladekontrolle benutzten endogenen hSOD1^{WT} erfolgte anhand eines SOD1-Antikörpers. (A) Einzeltransfektion von hSOD1^{eGFP}. (B) Co-Transfektion von hSOD1^{eGFP} mit hSOD1^{WT}.

sich andererseits mit der endogenen HEK 293T-hSOD1^{WT} zu aktiven Heterodimeren zusammensetzen konnten (Abbildung 9A, Spur 2, 3 und 5). Während sowohl die Homo- als auch die Heterodimere von hSOD1^{WT-eGFP} (Abbildung 9A, Spur 2) und hSOD1^{G93A-eGFP} (Abbildung 9A, Spur 5) sehr ähnliche Laufhöhen in Aktivitätsgelen aufwiesen, liefen das hSOD1^{G37R-eGFP}-hSOD1^{WT}-Heterodimer und das hSOD1^{G37R-eGFP}-hSOD1^{G37R-eGFP}-Homodimer vergleichsweise höher (Abbildung 9A, Spur 3). Nach der Transfektion von hSOD1^{A4V} wurde lediglich eine Aktivitätsbande, die in etwa die Laufhöhe der Heterodimerbanden hatte, detektiert. Die aufgrund der in der Nähe des aktiven Zentrums gelegenen Mutation als inaktiv beschriebene hSOD1^{G85R} (BORCHELT *et al.* 1994) wies als hSOD1^{G85R-eGFP}-hSOD1^{G85R-eGFP}-Homodimer keine Aktivität auf; als hSOD1^{G85R-eGFP}-hSOD1^{WT}-

Heterodimer mit der endogenen HEK 293T-hSOD1^{WT} konnte jedoch eine (wenngleich schwache) Aktivität detektiert werden (Abbildung 9A, Spur 4). Deutlicher konnte diese Aktivität bei der Co-Expression des hSOD1^{G85R-eGFP}-Fusionsproteins mit hSOD1^{WT} gezeigt werden (Abbildung 9B, Spur 5). Durch die Co-Expression mit hSOD1^{WT} wurde auch bei hSOD1^{WT-eGFP}, hSOD1^{G37R-eGFP} und hSOD1^{G93A-eGFP} die Heterodimer-Aktivitätsbande verstärkt (Abbildung 9B, Spur 3, 4 und 6). Bei der Immundetektion der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Fusionsproteine konnte gezeigt werden, dass sie ein Molekulargewicht von ~50 kDa aufwiesen (Abbildung 9A, unten), was sich aus ~20 kDa hSOD1 und ~27 kDa eGFP zusammensetzt. Wie bereits für hSOD1^{G85R} beschrieben (BORCHELT *et al.* 1994), lief das hSOD1^{G85R-eGFP}-Fusionsprotein (Abbildung 9A unten, Spur 4) in der SDS-PAGE etwas weiter als die anderen Fusionsproteine. Möglicherweise liegt das an einer stärkeren Entfaltung des Proteins, so dass mehr SDS gebunden werden kann und das Protein somit von einem stärker negativen Ladungsmantel umgeben wird (HAYWARD *et al.* 2002). Die endogene hSOD1^{WT} der HEK 293T-Zellen wurde als Beladungskontrolle verwendet (Abbildung 9A & B). Da die korrekte Beladung mit Kupfer- und Zinkionen, sowie die native Faltung der Fusionsproteine anhand einer spezifischen Dismutaseaktivität in Aktivitätsassays gezeigt werden konnte, war es möglich, die Fusionsproteine als Modellsystem zu verwenden. Zuerst wurde die Expression der transient in HEK 293T transfizierten Konstrukte (s. o.) mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse untersucht. Bei einer Anregung von 488 nm emittierte das eGFP ein grünes Fluoreszenzsignal (507 nm). In Zellen, die unfusioniertes eGFP exprimierten war eine homogene grüne Fluoreszenz des gesamten Zellkörpers zu erkennen. Da eGFP ein niedriges Molekulargewicht hat (~27 kDa), kann es die Zellkernporen passieren, weshalb auch der Zellkern eine grüne Fluoreszenz aufwies (Abbildung 10A). Die SOD1^{eGFP}-Konstrukte wurden sowohl wegen ihres höheren Molekulargewichts von ~50 kDa, als auch wegen der Dimerisierung mit anderen hSOD1-Untereinheiten sterisch an der Passage der Zellkernporen gehindert. Deshalb wurde bei der Expression der Fusionsproteine keine derartige Kernlokalisierung, sondern lediglich eine cytosolische Fluoreszenz beobachtet. Zusätzlich zu dieser cytosolischen Lokalisation traten bei allen hSOD1^{mut-eGFP} perinukleäre aggregatartige Strukturen auf, die bei der hSOD1^{WT-eGFP}-Transfektion (Abbildung 10B) nicht zu sehen waren (Abbildung 10). Das Aggregationspotential der SOD1^{mut-eGFP}-Fusionsproteine

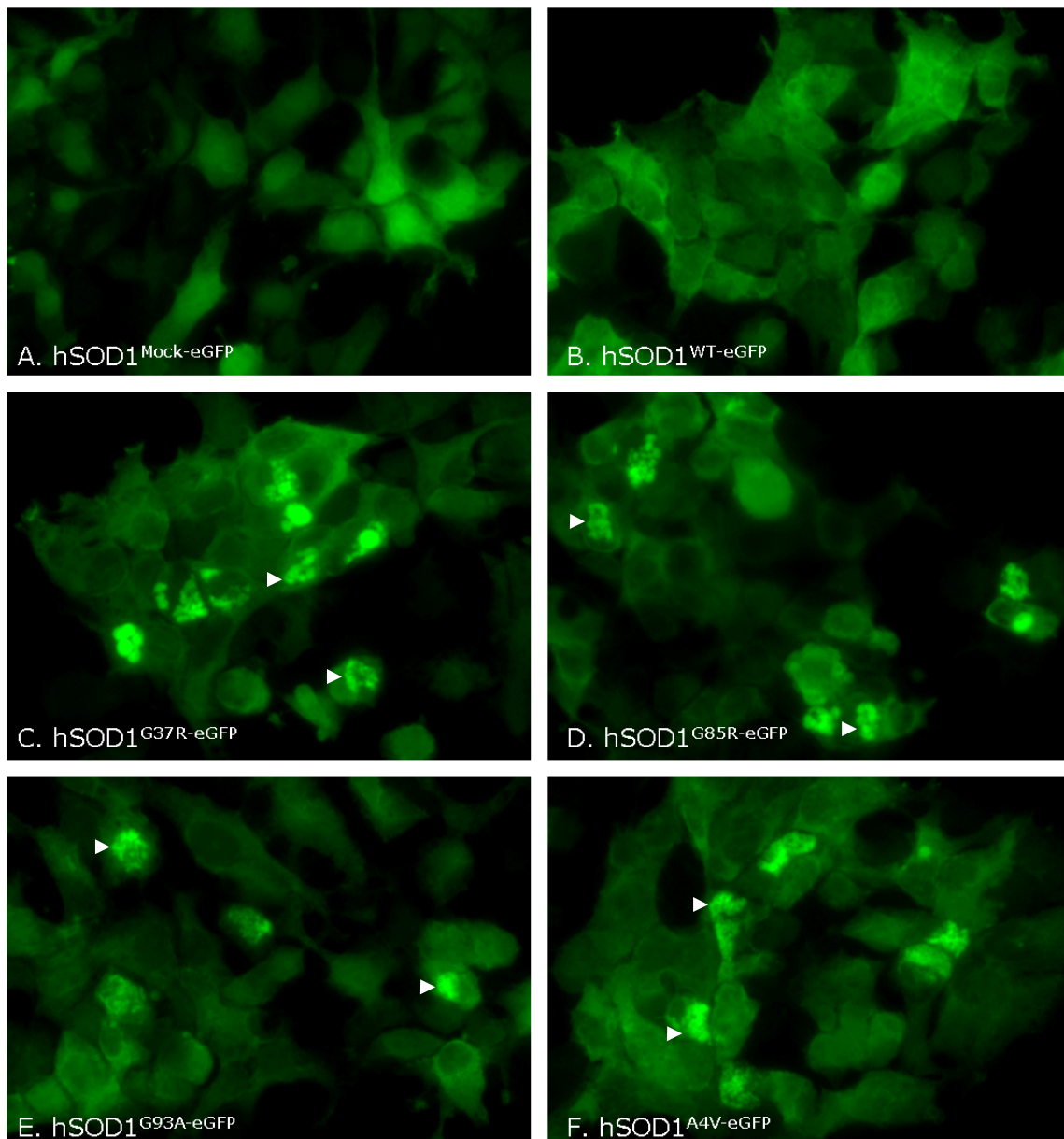


Abbildung 10: Mutante hSOD1^{eGFP} induziert cytoplasmatische Proteinaggregate

Fluoreszenzmikroskopie transient transfizierter HEK 283T-Zellen. Mock^{eGFP}- (A) und hSOD1^{WT-eGFP}- (B) transfizierte Zellen bildeten keine Proteinaggregate aus. In hSOD1^{G37R-eGFP}- (C), hSOD1^{G85R-eGFP}- (D), hSOD1^{G93A-eGFP}- (E) und hSOD1^{A4V-eGFP}- (F) transfizierten Zellen wurden kleine, körnige Aggregate gebildet (Dreiecke).

konnte auch proteinbiochemisch nachgewiesen werden. Hierfür wurden Zell-extrakte der transient transfizierten HEK 293T-Zellen durch eine differentielle Fraktionierung in eine PBS-lösliche Überstandsfraktion (Ü) und eine PBS-unlösliche (jedoch SDS-lösliche) Pelletfraktion (P) unterteilt (Abbildung 11A). Die beiden Fraktionen waren klar voneinander abgegrenzt, was durch Immundetektionen

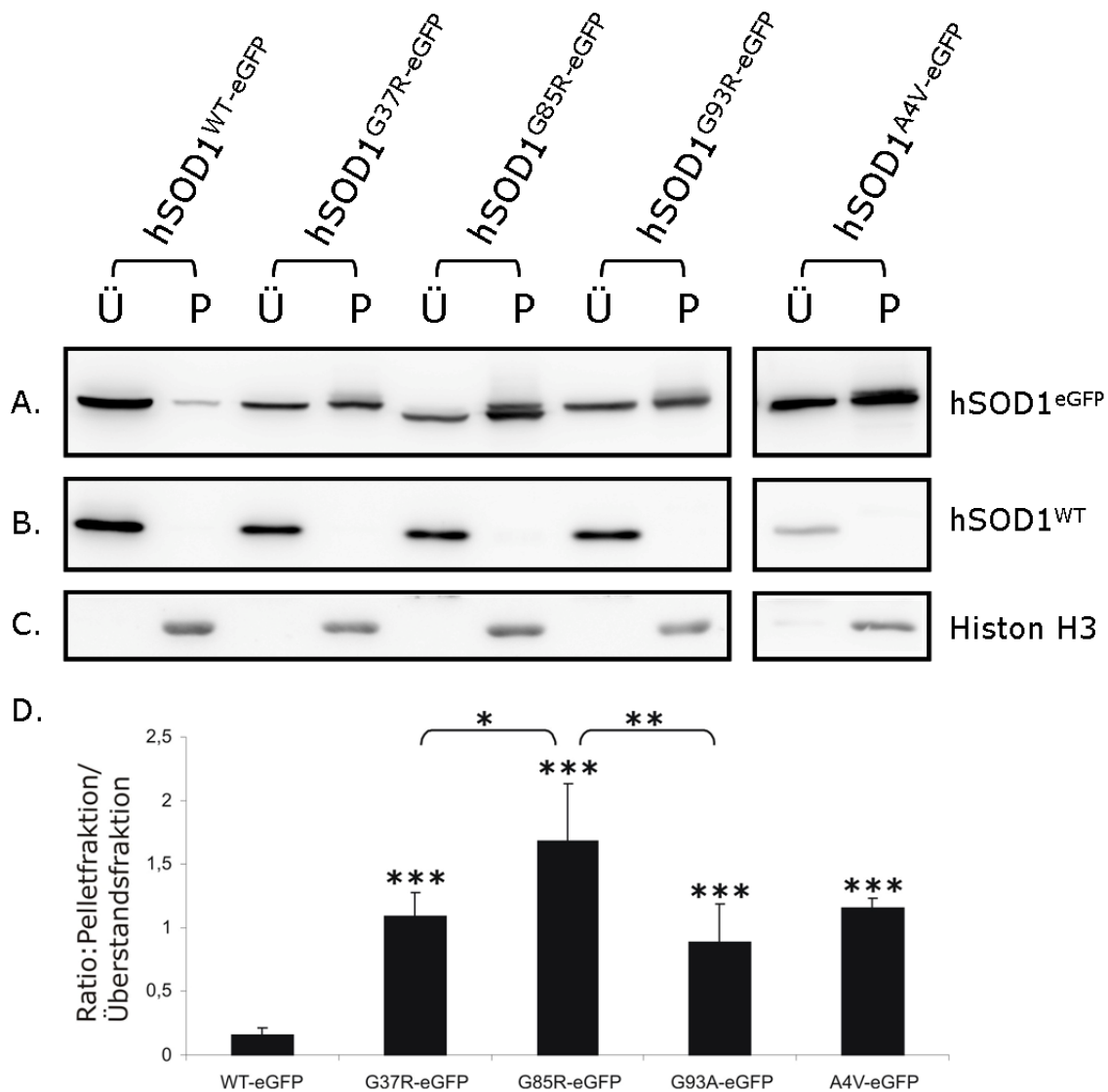


Abbildung 11: Mutante hSOD1^{eGFP} haben ein erhöhtes Aggregationspotential

Differentielle Fraktionierung transient transfizierter HEK 293T-Zellen. Je 15 µg Überstands (Ü)- bzw. Pelletfraktion (P) wurden auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen. Die Immundetektion der Fusionsproteine (A) und der endogenen hSOD1^{WT} (B) erfolgte anhand eines SOD1-Antikörpers. Die korrekte Auftrennung in Überstandsfraktion und Pelletfraktion wurde durch Immundetektionen der endogenen hSOD1^{WT} (B) und des Histons H3 (C) überprüft. Die gegen die Gesamtproteinmenge normalisierten Proteinbanden wurden densitometrisch vermessen. Der durchschnittliche Quotient aus Pellet- und Überstandsfraktion wurde in einem Graphen dargestellt (D). (*) über den Balken repräsentieren die statistische Signifikanz mit hSOD1^{WT-eGFP}, während die (*) über der Klammer die statistische Signifikanz zwischen den verschiedenen hSOD1^{mut-eGFP} darstellen (hSOD1^{WT-eGFP}, hSOD1^{G37R-eGFP}, hSOD1^{G93A-eGFP}; n=7; hSOD1^{G85R-eGFP}; n=6; hSOD1^{A4V-eGFP}; n=3; Zweiseitiger t-Test *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005)

der endogenen hSOD1^{WT}, die sich ausschließlich in der Überstandsfraktion befand (Abbildung 11B), und von Histone H3, das nur in der Pelletfraktion lokalisiert war, nachgewiesen werden konnte (Abbildung 11C). SOD1^{WT} ist ein cytosolisches Enzym, weshalb der überwiegende Teil von hSOD1^{WT-eGFP} in der Überstandsfrak-

tion detektiert wurde. $\text{hSOD1}^{\text{mut-eGFP}}$ war signifikant stärker in der Pelletfraktion angereichert und es wurden zusätzlich hochmolekulare hSOD1 -Strukturen detektiert (Abbildung 11A). Das Aggregationspotential der verschiedenen hSOD1 -Formen wurde durch das Verhältnis zwischen Pelletfraktion und Überstandsfraction nach densitometrischer Vermessung der Proteinbanden bestimmt (Abbildung 11D). Während dieses Verhältnis bei $\text{hSOD1}^{\text{WT-eGFP}}$ relativ niedrig war, waren die Verhältnisse bei den $\text{hSOD1}^{\text{mut}}$ -Fusionsproteinen signifikant höher, wobei $\text{hSOD1}^{\text{G85R-eGFP}}$ mit einem zehnmal so hohen Aggregationspotential wie $\text{hSOD1}^{\text{WT-eGFP}}$ das aggregationsträchtigste mutante Protein war. Die durchschnittlichen Aggregationspotentiale für $\text{hSOD1}^{\text{G37R-eGFP}}$ ($\sim 7\times$ so hoch wie $\text{hSOD1}^{\text{WT-eGFP}}$), $\text{hSOD1}^{\text{G93A-eGFP}}$ ($\sim 6\times$ so hoch wie $\text{hSOD1}^{\text{WT-eGFP}}$) und $\text{hSOD1}^{\text{A4V-eGFP}}$ ($\sim 7\times$ so hoch wie $\text{hSOD1}^{\text{WT-eGFP}}$) waren etwas niedriger, aber doch signifikant erhöht im Vergleich zu $\text{hSOD1}^{\text{WT-eGFP}}$.

Anhand der transienten Expression eGFP-fusionierter SOD1-Proteine in einer humanen Zelllinie konnte gezeigt werden, dass sich aktive Heterodimere zwischen allen untersuchten $\text{hSOD1}^{\text{mut-eGFP}}$ und hSOD1^{WT} bilden. Da eine spezifische Dismutaseaktivität aller Heterodimere und der meisten Homodimere nachgewiesen werden konnte, wurde weder die korrekte Beladung mit Kupfer- und Zinkionen, noch die Konformation der Proteine durch das fusionierte eGFP behindert. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass auch inaktive hSOD1 -Untereinheiten in Form eines Heterodimers mit hSOD1^{WT} eine Dismutase-aktive SOD1 -Spezies bilden können. Für jede Mutation konnte ein charakteristisches Aggregationsverhalten nachgewiesen werden, das stets signifikant stärker war als das von hSOD1^{WT} .

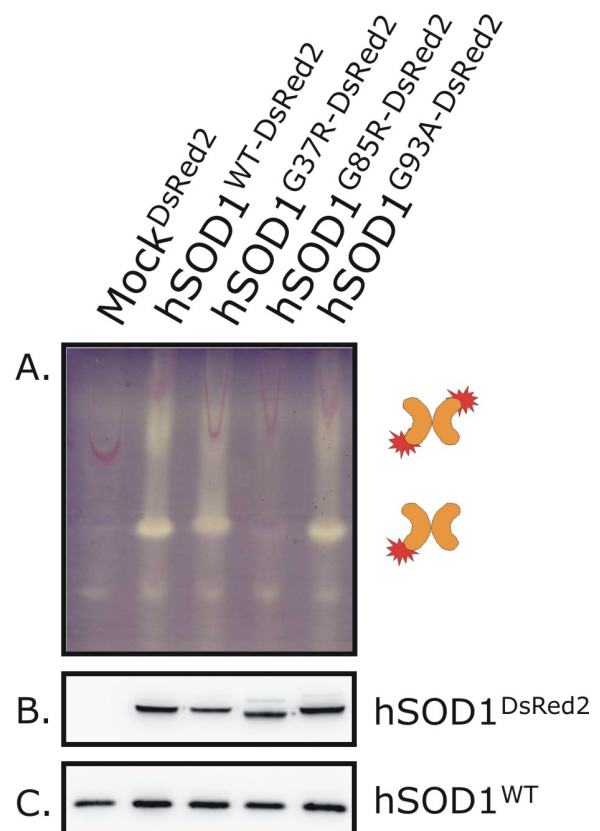
3.1.3. Charakterisierung transient in HEK 293T-Zellen exprimierter $\text{hSOD1}^{\text{DsRed2}}$ -Fusionsproteine

Die $\text{SOD1}^{\text{DsRed2}}$ -Fusionsproteine $\text{hSOD1}^{\text{WT-DsRed2}}$, $\text{hSOD1}^{\text{G37R-DsRed2}}$, $\text{hSOD1}^{\text{G85R-DsRed2}}$ und $\text{hSOD1}^{\text{G93A-DsRed2}}$ wurden analog zu den $\text{SOD1}^{\text{eGFP}}$ -Konstrukten transient in HEK 293T-Zellen exprimiert und anhand eines Aktivitätsassays ihre Dismutaseaktivität überprüft. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur des DsRed2, das im nativen Gel sehr viel langsamer lief als das eGFP, wurde jedoch ein niederprozentigeres Aktivitätsgel verwendet, um die optimale Auftrennung der Proteinban-

den zu erreichen. Wie zuvor bei den hSOD1^{eGFP}-Fusionsproteinen beschrieben, wurden für hSOD1^{WT-DsRed2}, hSOD1^{G37R-DsRed2} und hSOD1^{G93A-DsRed2} jeweils zwei Aktivitätsbanden detektiert, die der Aktivität des hSOD1^{DsRed2}-hSOD1^{DsRed2}-Homodimers bzw. des hSOD1^{DsRed2}-hSOD1^{WT}-Heterodimers entsprachen (Abbildung 12A). Das hSOD1^{G85R-DsRed2}-Fusionsprotein zeigte keine homodimere Dismutaseaktivität; eine sehr schwache heterodimere Dismutaseaktivität schien jedoch vorhanden zu sein. Die SOD1^{DsRed2}-Fusionsproteine hatten ein Molekulargewicht von ~50 kDa, das sich aus dem Molekulargewicht der hSOD1 (~20 kDa) und dem Molekulargewicht des DsRed2 (~29 kDa) zusammensetzt. Wie bereits unter 3.1.2. beschrieben, lief hSOD1^{G85R-DsRed2} aufgrund der stärkeren Auffaltung im SDS-PAGE-Gel etwas schneller (Abbildung 12B, Spur 4). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der transient transfizierten HEK 293T-Zellen fand bei einer Anregung von 558 nm und einer Emission von 583 nm statt, was den Fusionsproteinen eine rote Fluoreszenz verlieh. Zusätzlich zu einer cytoplasmatischen Fluoreszenz traten sowohl bei hSOD1^{WT-DsRed2} als auch bei den

Abbildung 12: Transient exprimierte hSOD1^{DsRed2}-Fusionsproteine zeigen eine spezifische Dismutaseaktivität

SOD1-Aktivitätsassay und Immunblot von Extrakten transient transfizierter HEK 293T-Zellen. Je 30 µg Komplettlysat der Zellen wurden auf ein 7,5 %-iges SOD1-Aktivitätsgel (A) und je 15 µg Komplettlysat wurden auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen (B). Die Immundetektion der Fusionsproteine (B) und der als Ladekontrolle benutzten endogenen hSOD1^{WT} (C) erfolgte anhand eines SOD1-Antikörpers.



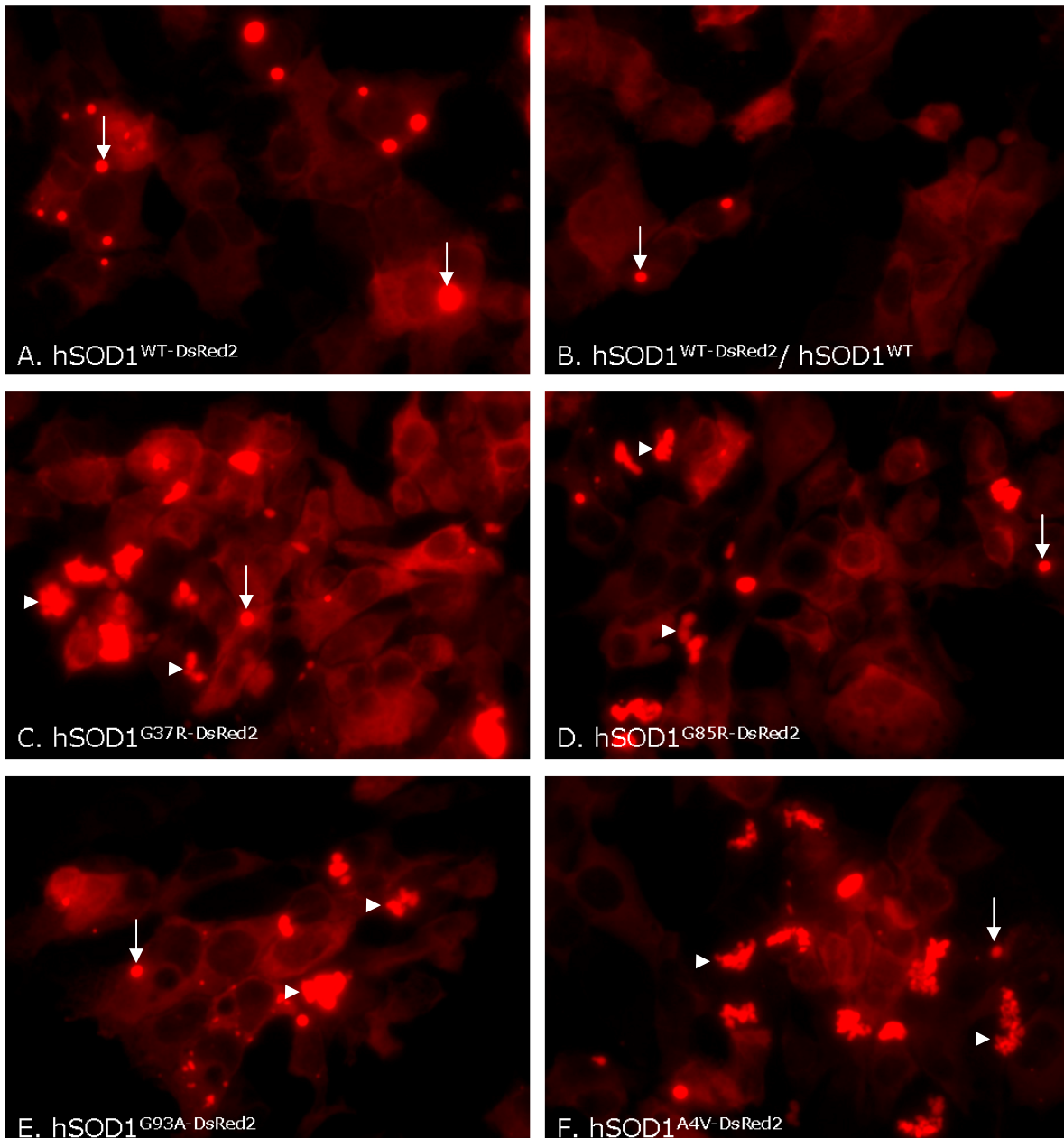


Abbildung 13: Mutante hSOD1^{DsRed2} induziert cytoplasmatische Proteinaggregate

Fluoreszenzmikroskopie transient transfizierter HEK 283T-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten nach Transfektion von hSOD1^{WT-DsRed2} eine cytoplasmatische Fluoreszenz und einige sehr hell leuchtende sphärische Strukturen (Pfeile; A & B). Da die Menge dieser globulären Strukturen durch Co-Expression unfusionierter hSOD1^{WT} stark verringert wurde (B), handelt es sich wahrscheinlich um ein Überexpressionsartefakt. Zellen, die mit hSOD1^{mut-DsRed2} transfiziert wurden, wiesen zusätzlich zu diesen globulären Strukturen (Pfeile) körnige aggregatartige Strukturen auf (Dreiecke; C-F).

hSOD1^{mut-DsRed2}-Fusionsproteinen aggregatartige Strukturen auf. Diese Strukturen konnten in zwei *Aggregatformen* differenziert werden: Bei hSOD1^{WT-DsRed2} traten ausschließlich große, sphärische Aggregate auf, während die hSOD1^{mut-dsRed2}-Fu-

sionsproteine zusätzlich zu diesen sphärischen Aggregaten zahlreiche kleinere, körnige Aggregate ausbildeten (Abbildung 13). Diese kleineren Aggregate waren mit den Aggregaten der hSOD1^{mut-eGFP}-Fusionsproteine (s. o.) vergleichbar und wurden deshalb als hSOD1-spezifisch betrachtet. Bei den großen, sphärischen Aggregaten handelte es sich wahrscheinlich um ein DsRed2-Artefakt, da DsRed2 bekanntermaßen eine Tendenz zu unspezifischer Aggregatbildung besitzt (BEVIS and GLICK 2002). Diese These wird dadurch unterstützt, dass die Co-Transfektion von hSOD1^{WT-DsRed2} mit hSOD1^{WT} zu einer deutlichen Reduktion der sphärischen Aggregate führte (Abbildung 13B). Weiteren Aufschluss über die Spezifität der Aggregate ergab die proteinbiochemische Fraktionierung der Proteinextrakte der transfizierten Zellen. Trotz der großen, sphärischen Aggregate befand sich hSOD1^{WT-DsRed2} größtenteils in der löslichen Fraktion, wohingegen die hSOD1^{mut-DsRed2}-Fusionsproteine, die zusätzlich die kleinen, körnigen Aggregate aufwiesen, sehr stark in der Pelletfraktion angereichert waren (Abbildung 14A). Auch hochmolekulare SOD1-Spezies waren lediglich in den Pelletfraktionen detektierbar, die hSOD1^{mut-DsRed2}-Fusionsproteine enthielten. Die im Vergleich zum eGFP stärkere Tendenz des DsRed2 zu aggregieren wurde anhand der Werte des Verhältnisses zwischen Pelletfraktion und Überstandsfraktion der DsRed2-Fusionsproteine deutlich (Abbildung 14D). Während bei den eGFP-Fusionsproteinen verglichen mit hSOD1^{WT-eGFP} ein etwa zehnfach erhöhtes Aggregationspotential von hSOD1^{G85R-eGFP} gemessen werden konnte (siehe 3.1.2.; Abbildung 11), ergab die Auswertung der DsRed2-Fusionsproteine für hSOD1^{G85R-DsRed2} ein ~27x erhöhtes Aggregationspotential als hSOD1^{WT-DsRed2}. Die Aggregationspotentiale für hSOD1^{G37R-DsRed2} (~10x höher als hSOD1^{WT-DsRed2}) und hSOD1^{G93A-DsRed2} (~8x höher als hSOD1^{WT-DsRed2}) waren wieder signifikant niedriger als das von hSOD1^{G85R-DsRed2}.

Wie zuvor für die eGFP-fusionierten hSOD1^{mut} beschrieben, konnte auch mit DsRed2-fusionierten hSOD1^{mut} nach transienter Expression in humanen Zellen eine spezifische Dismutaseaktivität der mutant-wildtypischen Heterodimere nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Daten der hSOD1^{eGFP}- und der hSOD1^{DsRed2}-Fusionsproteine wird deutlich, dass die jeweilige Aggregationstendenz von hSOD1^{WT} und den hSOD1^{mut}-Proteinen – trotz eines erhöhten Aggregationspotentials von DsRed2 – sowohl bei den eGFP- als auch bei den DsRed2-

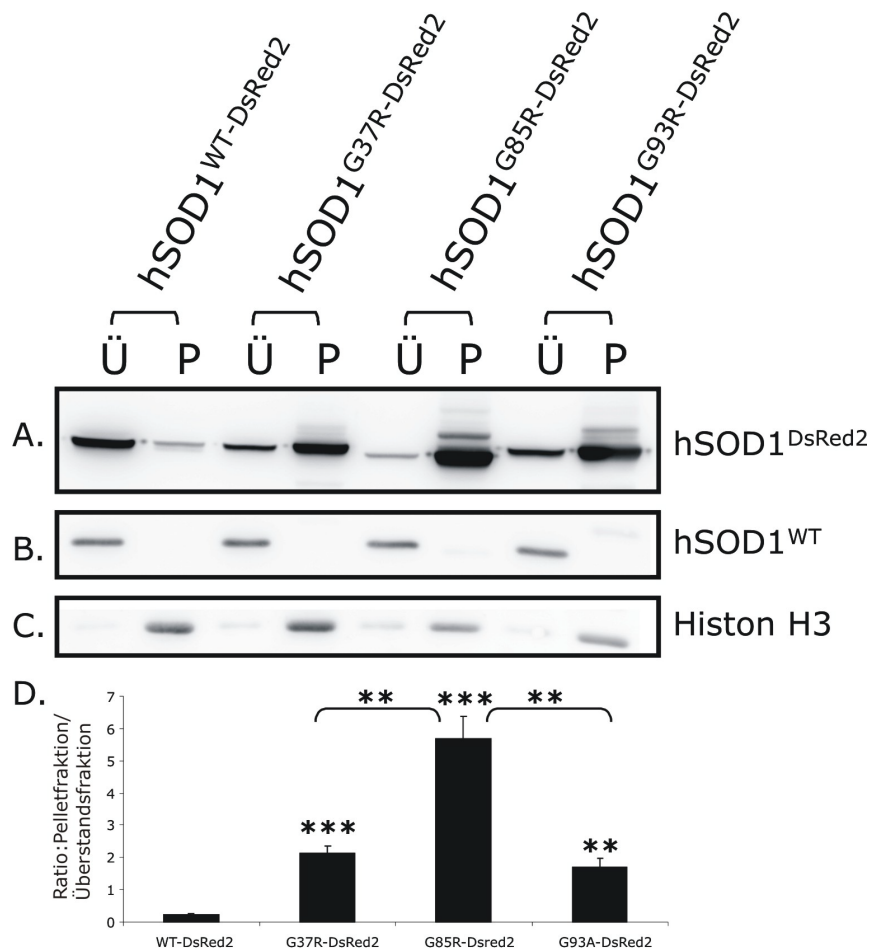


Abbildung 14: Mutante hSOD1^{DsRed2} haben ein erhöhtes Aggregationspotential

Differentielle Fraktionierung transient transfizierter HEK 293T-Zellen. Je 15 µg Überstands- (Ü) bzw. Pelletfraktion (P) wurden auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen. Die Immundetektion der Fusionsproteine (A) und der endogenen hSOD1^{WT} (B) erfolgte anhand eines SOD1-Antikörpers. Die korrekte Auftrennung in Überstandsfraction und Pelletfraktion wurde durch Immundetektionen der endogenen hSOD1^{WT} (B) und des Histons H3 (C) überprüft. Die gegen die Gesamtproteinmenge normalisierten Proteinbanden wurden densitometrisch vermessen. Der durchschnittliche Quotient aus Pellet- und Überstandsfraction +SEM aus drei unabhängigen Experimenten wurde in einem Graphen dargestellt (D). (*) über den Balken repräsentieren die statistische Signifikanz mit hSOD1^{WT-DsRed2}, während die (*) über der Klammer die statistische Signifikanz zwischen den verschiedenen hSOD1^{mut-DsRed2} darstellen (Zweiseitiger t-Test **p<0,01; ***p<0,005).

Fusionsproteinen vergleichbar war: Während die hSOD1^{WT}-Fusionsproteine nahezu keine Aggregationstendenz aufwiesen, konnte eine spezifische Aggregation der mutanten hSOD1 nachgewiesen werden. Das größte Aggregationspotential hatte hSOD1^{G85R}, gefolgt von hSOD1^{G37R} und hSOD1^{G93A}.

3.1.4. hSOD1^{WT-DsRed2} ist nicht in hSOD1^{mut-eGFP}-abhängigen Aggregaten enthalten

Um zu untersuchen, ob hSOD1^{WT} in den durch hSOD1^{mut} entstandenen Aggregaten enthalten war, wurden hSOD1^{eGFP}- und hSOD1^{DsRed2}-Fusionsproteine transient in HEK 293T-Zellen co-exprimiert. Bei der Expression von DsRed2-gekoppelten hSOD1-Fusionsproteinen wurde zuvor demonstriert, dass große, sphärische, unspezifische Aggregate auftraten. Um zu vermeiden, dass diese Artefakte mit den spezifischen, körnigen, kleinen durch hSOD1^{mut} entstehenden Aggregaten verwechselt werden, wurden für die Expression von hSOD1^{mut} bevorzugt eGFP-gekoppelte Proteine verwendet. Da hSOD1^{WT-DsRed2} keine spezifischen körnigen Aggregate ausbildete, war es möglich, DsRed2-gekoppelte hSOD1^{WT} für die Co-Expression mit hSOD1^{mut-eGFP} zu verwenden. Lediglich für die Positivkontrolle, also für die Co-Expression zweier gleicher mutanter hSOD1-Proteine wurden neben den eGFP-gekoppelten hSOD1^{mut} die DsRed-markierten Varianten benutzt. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Co-Transfektion von hSOD1^{WT-DsRed2} mit hSOD1^{WT-eGFP}, hSOD1^{G37R-eGFP}, hSOD1^{G85R-eGFP} und hSOD1^{G93A-eGFP} wiesen zahlreiche Zellen jeweils beide Fusionsproteine auf. Bei der Co-Expression von hSOD1^{WT-DsRed2} mit hSOD1^{WT-eGFP} wurden keine Aggregate gebildet, beide Fusionsproteine zeigten eine homogene cytoplasmatische Lokalisation (Abbildung 15A & B). Interessanterweise wurden nach der Co-Transfektion von hSOD1^{WT-DsRed2} mit hSOD1^{mut-eGFP} in Regionen, wo die hSOD1^{mut-eGFP}-Fusionsproteine die oben beschriebenen, körnigen Aggregate bildeten, im grünen Fluoreszenzkanal keine Aggregate beobachtet (Abbildung 15C & D; Abbildung 16A & B, E & F). Vielmehr waren dort zumeist Aussparungen der Fluoreszenz, was darauf hindeutet, dass hSOD1^{WT} nicht am Aggregationsprozess beteiligt war bzw. nicht in die Aggregate eingeschlossen wurde. Auch dort, wo keine Aussparungen zu sehen waren, sondern die Zellen im roten Kanal homogen hSOD1^{WT-DsRed2} exprimierten, handelte es sich nicht um eine Co-Aggregation von hSOD1^{WT} mit hSOD1^{mut}, was anhand der Positivkontrolle deutlich wurde. Als Positivkontrolle wurden Co-Transfektionen der verschiedenen hSOD1^{mut-eGFP}-Konstrukte mit den hSOD1^{mut-DsRed2}-Konstrukten durchgeführt (Abbildung 15E & F; Abbildung 16C & D, G & H), wobei sich eine Co-Aggregation sehr klar anhand von intensiven aggregatartigen Strukturen in beiden Fluoreszenzkanälen manifestierte.

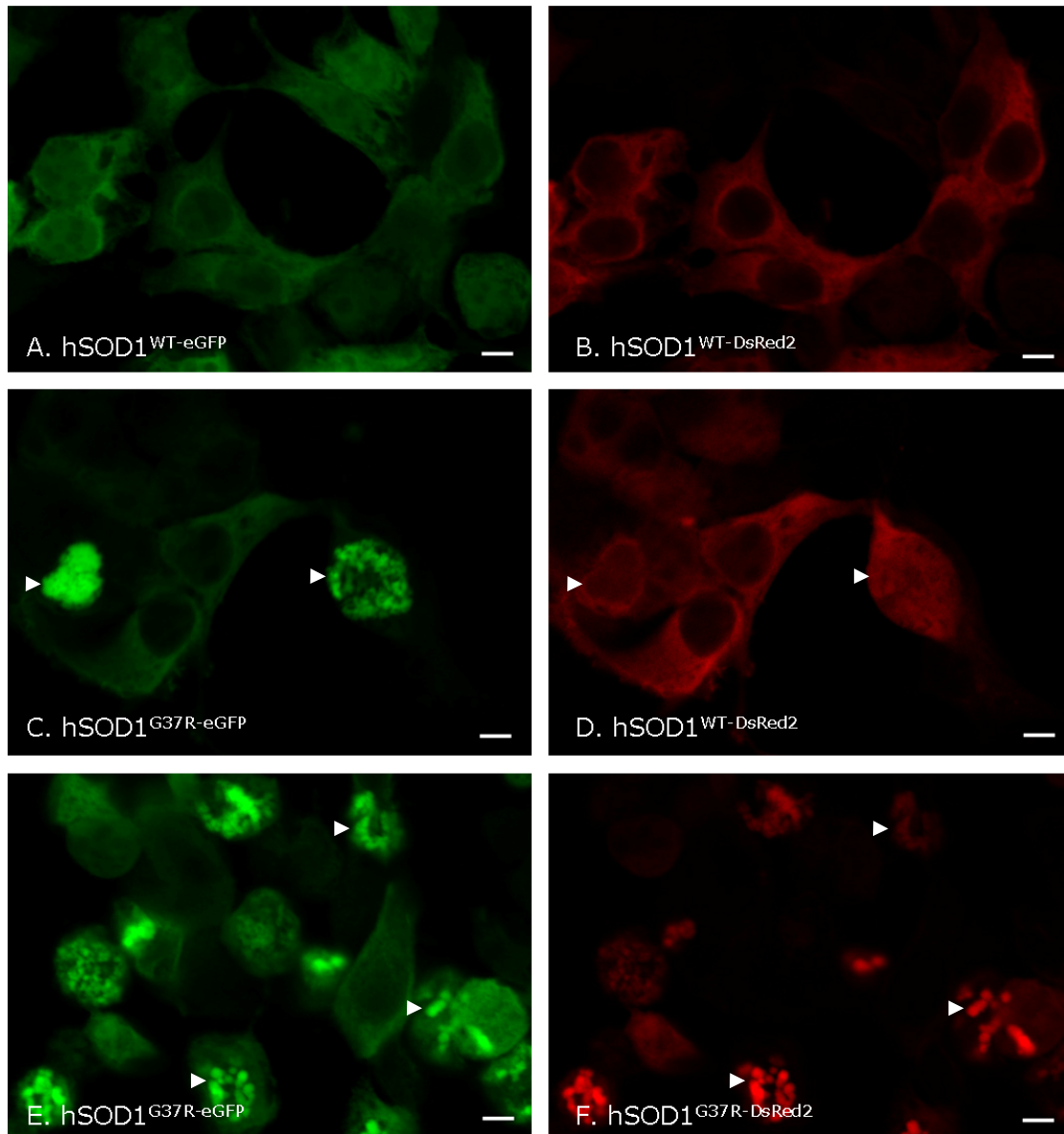


Abbildung 15: hSOD1^{WT-DsRed2} ist nicht in hSOD1^{G37R-eGFP}-Proteinaggregaten enthalten

Fluoreszenzmikroskopie transient transfizierter HEK 283T-Zellen. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Co-Expression von hSOD1^{WT-eGFP} mit hSOD1^{WT-DsRed2} zeigten sowohl im grünen (A) als auch im roten (B) Kanal eine cytoplasmatische Fluoreszenz ohne aggregatartige Strukturen. Bei der Co-Expression von hSOD1^{G37R-eGFP} mit hSOD1^{WT-DsRed2} wurden im grünen Kanal Zellen detektiert, die körnige aggregatartige Strukturen aufwiesen (C), während diese Strukturen nicht im roten Kanal co-lokalisierten (Dreiecke; D). Bei der Co-Expression von hSOD1^{G37R-eGFP} mit hSOD1^{G37R-DsRed2} wurden körnige Aggregate beobachtet, die in beiden Fluoreszenzkanälen co-lokalisierten (Dreiecke; E & F). Größenbalken = 5 μ M.

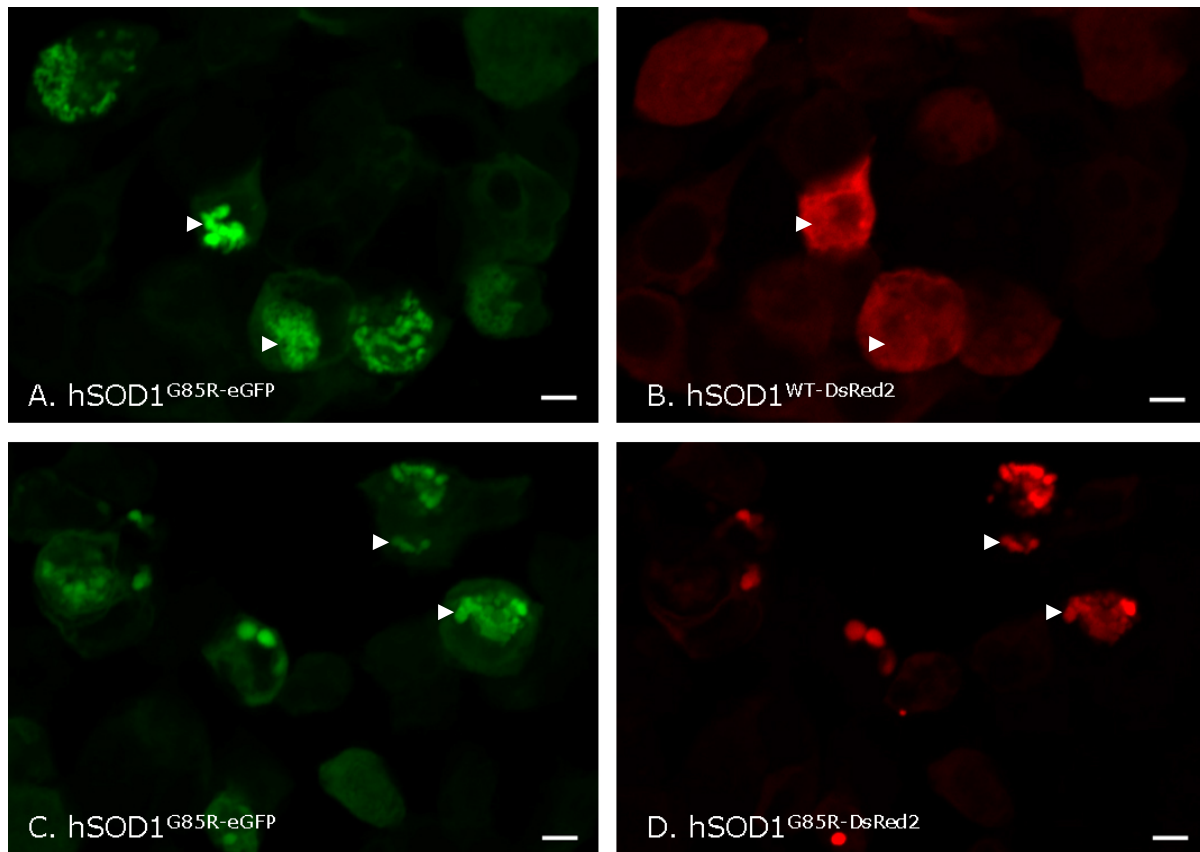


Abbildung 16: $hSOD1^{WT-DsRed2}$ ist nicht in $hSOD1^{G85R-eGFP}$ -Proteinaggregaten enthalten

Fluoreszenzmikroskopie transient transfizierter HEK 283T-Zellen. Bei konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Co-Expression von $hSOD1^{G85R-eGFP}$ mit $hSOD1^{WT-DsRed2}$ wurden im grünen Kanal Zellen detektiert, die körnige aggregatartige Strukturen aufwiesen (A), während diese Strukturen nicht im roten Kanal co-lokalisierten (Dreiecke; B). Bei der Co-Expression von $hSOD1^{G85R-eGFP}$ mit $hSOD1^{G85R-DsRed2}$ wurden körnige Aggregate beobachtet, die in beiden Fluoreszenzkanälen co-lokalisierten (Dreiecke; C & D). Größenbalken = 5 μ M.

Anhand transienter Co-Expression von $hSOD1^{WT-DsRed2}$ mit $hSOD1^{mut-eGFP}$ konnte hier gezeigt werden, dass $hSOD1^{WT}$ nicht mit $hSOD1^{mut}$ co-aggregiert. In Positivkontrollen wurden eGFP- und Dsred2-fusionierte $hSOD1^{mut}$ co-exprimiert, um zu demonstrieren, dass eine Co-Expression der beiden mutanten Fusionsproteine potentiell in einer Co-Aggregation resultierte.

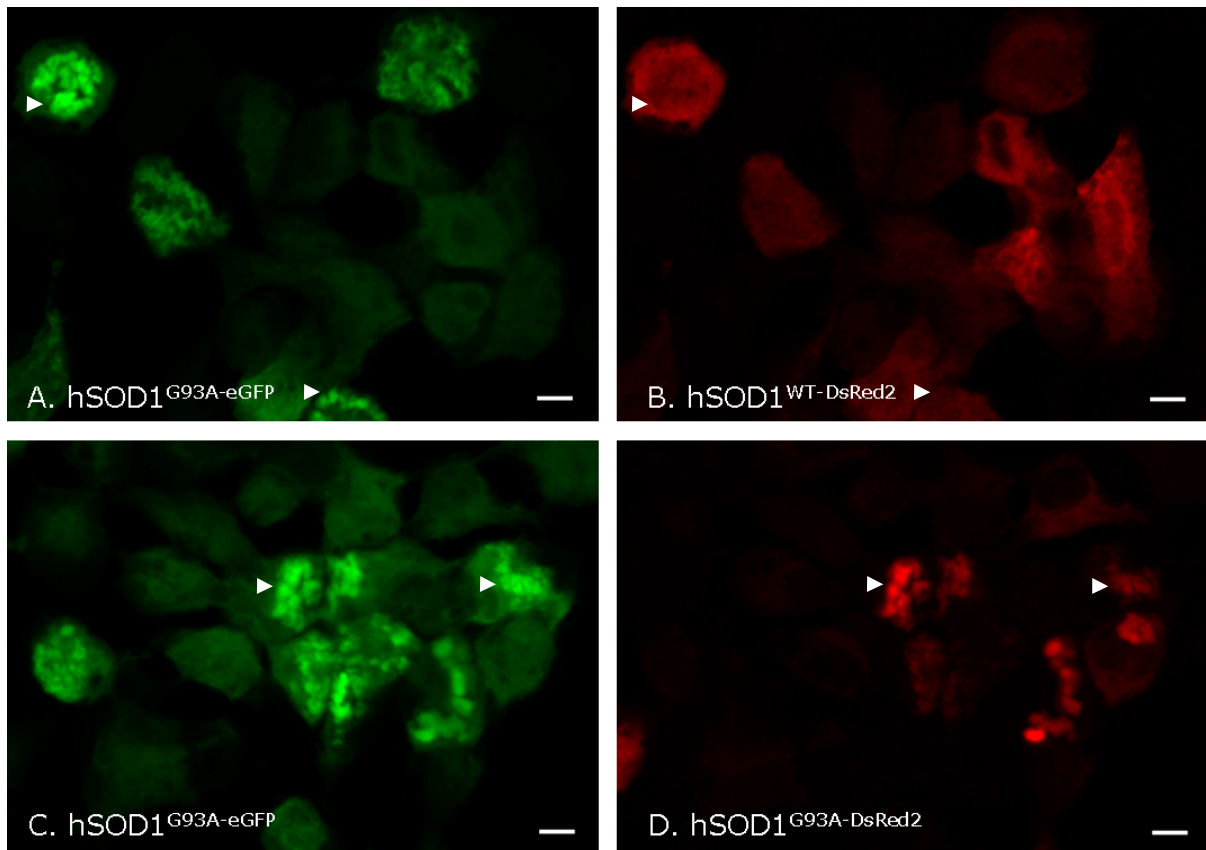


Abbildung 17: $hSOD1^{WT-DsRed2}$ ist nicht in $hSOD1^{G93A-eGFP}$ -Proteinaggregaten enthalten

Fluoreszenzmikroskopie transient transfizierter HEK 283T-Zellen. Bei konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Co-Expression von $hSOD1^{G93A-eGFP}$ mit $hSOD1^{WT-DsRed2}$ wurden im grünen Kanal Zellen detektiert, die körnige aggregatartige Strukturen aufwiesen (A), während diese Strukturen nicht im roten Kanal co-lokalisierten (Dreiecke; B). Nach der Co-Expression von $hSOD1^{G93A-eGFP}$ mit $hSOD1^{G93A-DsRed2}$ wurden körnige Aggregate beobachtet, die in beiden Fluoreszenzkanälen co-lokalisierten (Dreiecke; C & D). Größenbalken = 5 μ m.

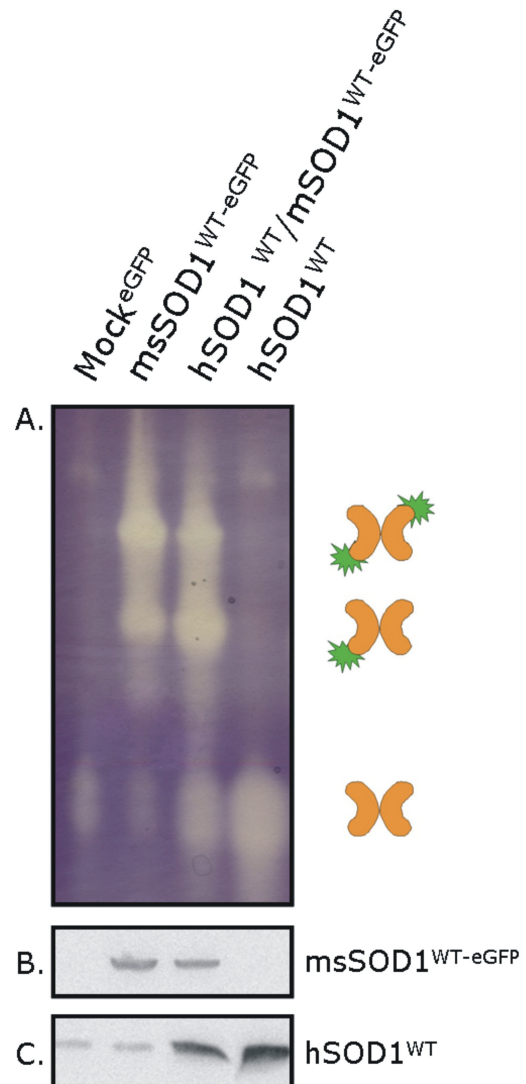
3.1.5. Murine und humane $SOD1^{WT}$ bilden Dismutase-aktive Dimere

Um zu untersuchen, ob $msSOD1^{WT}$ und $hSOD1^{WT}$ miteinander funktionell aktive Dimere bilden können, wurde $msSOD1^{WT-eGFP}$ in HEK 293T-Zellen transient exprimiert und die Zellextrakte auf ein SOD1-Aktivitätsgel geladen. Während bei der $Mock^{eGFP}$ -Transfektion lediglich die endogene $hSOD1^{WT}$ -Aktivitätsbande detektiert wurde (Abbildung 18A, Spur 1), konnte bei der Transfektion von $msSOD1^{WT-eGFP}$ sowohl eine $msSOD1^{WT-eGFP}$ - $hSOD1^{WT}$ -Heterodimerbande als auch eine $msSOD1^{WT-eGFP}$ - $msSOD1^{WT-eGFP}$ -Homodimerbande detektiert werden (Abbildung 18A, Spur 2). Die endogene $hSOD1^{WT}$ -Aktivitätsbande war im Vergleich zu $Mock^{eGFP}$ reduziert, obwohl die Expressionsspiegel gleich blieben (Abbildung 18C, unten). Durch eine Co-Transfektion von $msSOD1^{WT-eGFP}$ mit $hSOD1^{WT}$ konnte die

msSOD1^{WT-eGFP}-hSOD1^{WT}-Heterodimer-Aktivitätsbande verstärkt werden (Abbildung 18A, Spur 3). Auch hier war die hSOD1^{WT}-Aktivitätsbande im Vergleich zur hSOD1^{WT}-Einzeltransfektion (Abbildung 18A, Spur 4) reduziert. Die Existenz einer msSOD1^{WT-eGFP}-hSOD1^{WT}-Heterodimer-Aktivitätsbande und die mit einer Reduktion der hSOD1^{WT}-Aktivitätsbande einhergehende Verstärkung dieser Heterodimerbande bei Transfektionen mit msSOD1^{WT-eGFP} sind Nachweise für eine Heterodimerbildung zwischen muriner und humaner SOD1.

Abbildung 18: Murine SOD1^{WT-eGFP} heterodimerisiert mit menschlicher SOD1^{WT}

SOD1-Aktivitätsassay und Immunblot von Extrakten transient transfizierter HEK 293T-Zellen. Je 30 µg Komplettlysat der Zellen wurden auf ein 15%-iges SOD1-Aktivitätsgel (A) und je 15 µg Komplettlysat wurden auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen (B & C). Die transfizierte msSOD1 und die endogene hSOD1 wurden anhand eines SOD1-Antikörpers detektiert.



3.2. Generierung und Expression von SOD1-Dimerkonstrukten

Bei den Mutationen innerhalb des *sod1*-Gens, die zu ALS1 führen, handelt es sich zum überwiegenden Teil um dominante Mutationen. Ein ALS1-Patient besitzt folglich ein *sod1*-Allel, das die Mutation beinhaltet und ein wildtypisches *sod1*-Allel. Das funktionelle SOD1-Enzym liegt stets in Form eines Dimers vor, das sich aus zwei monomeren SOD1-Untereinheiten, sowie einem Kupfer- und einem Zinkion pro Untereinheit zusammensetzt. Im – rein hypothetischen – Fall einer stöchiometrischen Dimerisierung der durch die zwei *sod1*-Allele codierten Unter-

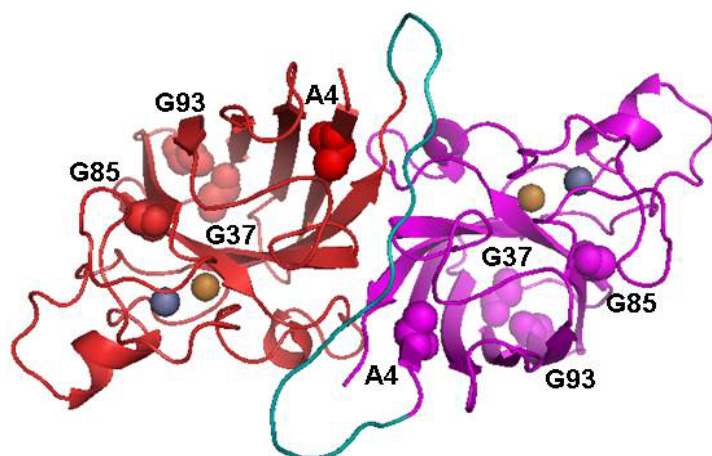
einheiten würden drei hSOD1-Enzymvarianten auftreten (FUKADA *et al.* 2001): das hSOD1^{WT}-hSOD1^{WT}-Homodimer (25%), das hSOD1^{mut}-hSOD1^{WT}-Heterodimer (50%) und das hSOD1^{mut}-hSOD1^{mut}-Homodimer (25%). Um die Eigenschaften der hSOD1^{mut}-hSOD1^{WT}-Heterodimere und der hSOD1^{mut}-hSOD1^{mut}-Homodimere vergleichend mit dem hSOD1^{WT}-hSOD1^{WT}-Homodimer zu untersuchen, wurden hSOD1-Dimerkonstrukte mit den unter 3.1. beschriebenen verschiedenen ALS1-auslösenden SOD1 Mutationen generiert.

3.2.1. Generierung von SOD1-Dimerkonstrukten

Die hSOD1-Dimerfusionsproteine bestanden aus zwei hSOD1-Untereinheiten (hSOD1₁ und hSOD1₂), die durch einen Peptidlinker verbunden waren (Abbildung 19). Für die Generierung der Dimerkonstrukte wurden die cDNAs für hSOD1^{WT}, hSOD1^{G37R}, hSOD1^{G85R}, hSOD1^{G93A} und hSOD1^{A4V} mit Oligonukleotiden amplifiziert, die terminale Restriktionsschnittstellen für BglII und XbaI (hSOD1₁) bzw. für ClaI und EcoRI (hSOD1₂) enthielten. Um die Fusion beider hSOD1-Proteine mit eGFP zu ermöglichen, wurden die jeweiligen Stopcodons mit Hilfe der reversen Oligonukleotide deletiert und das reverse Oligonukleotid für die Amplifikation von hSOD1₂ um ein Nukleotid erweitert (siehe 3.1.1.). Das Linkeroligonukleotid wurde mit Oligonukleotiden amplifiziert, an die terminale Restriktionsschnittstellen für XbaI und ClaI angehängt waren. Alle Amplifikate wurden mit den

Abbildung 19: Struktur der Dimerfusionsproteine

Die hSOD1-Dimerfusionsproteine bestehen aus zwei hSOD1-Untereinheiten (hSOD1₁ rot, hSOD1₂ pink), die durch einen Peptidlinker (blau-grün) kovalent verbunden sind (Rebecca Wade).



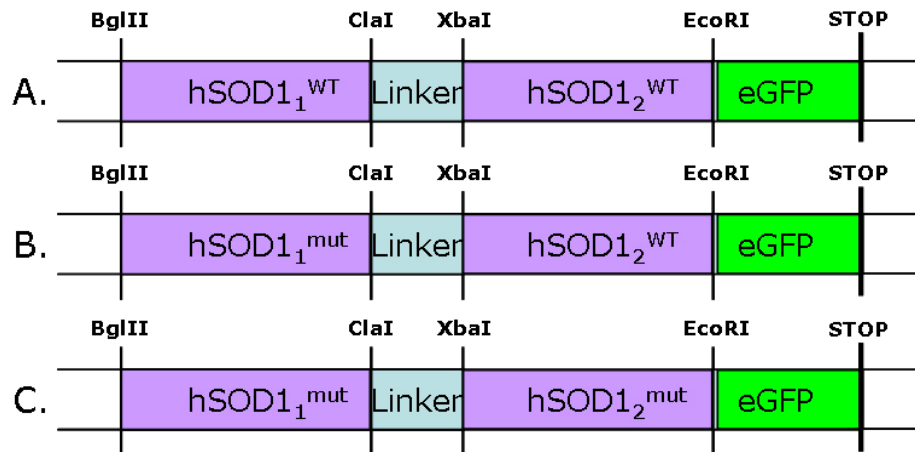


Abbildung 20: Schematische Darstellung der hSOD1-Dimerkonstrukte

Die hSOD1-cDNAs (lila) wurden unter Deletion des Stopcodons im Leserahmen des eGFP (grün) über die BglII- und die ClaI- (hSOD1₁) bzw. die XbaI- und die EcoRI- (hSOD1₂) Restriktionsschnittstelle kloniert. hSOD1^{WT} = humane wildtypische SOD1; hSOD1^{mut} = humane mutante SOD1 (im Rahmen dieser Arbeit wurden hSOD1^{A4V}-; hSOD1^{G37R}-; hSOD1^{G85R}- und hSOD1^{G93A}-cDNAs für die Generierung der Dimerkonstrukte verwendet).

geeigneten Restriktionsendonukleasen restringiert und nacheinander in den gleichermaßen restringierten prokaryotischen Expressionsvektor pET3a kloniert. Durch die modulare Klonierungsstrategie konnten verschiedene wildtypische (Abbildung 20A) oder mutante Homo- (Abbildung 20C) und Heterodimere (Abbildung 20B) generiert werden. Anschließend wurden die Dimerkonstrukte mit BglII und EcoRI restringiert und in den pEGFP-N1 Vektor kloniert (Abbildung 20).

3.2.2. Charakterisierung transient in HEK 293T-Zellen exprimierter hSOD1^{Dimer-eGFP}-Fusionsproteine

Wie bereits für die SOD1^{eGFP}-Fusionsproteine beschrieben (siehe 3.1.2.), wurden die hSOD1^{Dimer-eGFP}-Fusionsproteine transient in HEK 293T exprimiert und mittels eines Aktivitätsassays ihre Dismutaseaktivität überprüft (Abbildung 21A). Während die Mock^{eGFP}-transfizierten Zellen nur eine Aktivitätsbande der endogenen hSOD1^{WT} aufwiesen (Abbildung 21A, Spur 1), konnte für die hSOD1^{WT-WT-eGFP}-transfizierten Zellen eine weitere Aktivitätsbande nachgewiesen werden (Abbildung 21A, Spur 2). Die Aktivitätsbande lief nur geringfügig höher als die des hSOD1^{WT-eGFP}-hSOD1^{WT}-Heterodimers (siehe Abbildung 9). Wie bereits bei der Transfektion von hSOD1^{G37R-eGFP} beobachtet, liefen die hSOD1^{G37R}-Fusionsproteine

etwas höher als die anderen Fusionsproteine, wobei hSOD1^{G37R-G37R-eGFP} (Abbildung 21A, Spur 3) noch höher lief als hSOD1^{G37R-WT-eGFP} (Abbildung 21A, Spur 4). Die anderen Fusionsproteine unterschieden sich hinsichtlich ihrer Laufhöhe kaum von hSOD1^{WT-WT-eGFP}. Sowohl die hSOD1^{G93A-} (Abbildung 21A, Spur 5 und 6) als auch die hSOD1^{A4V-} (Abbildung 21A, Spur 9 und 10) Homo- und Heterodimere wiesen eine Dismutaseaktivität auf, während bei hSOD1^{G85R} lediglich das Heterodimer (Abbildung 21A, Spur 7) aktiv war. Für das

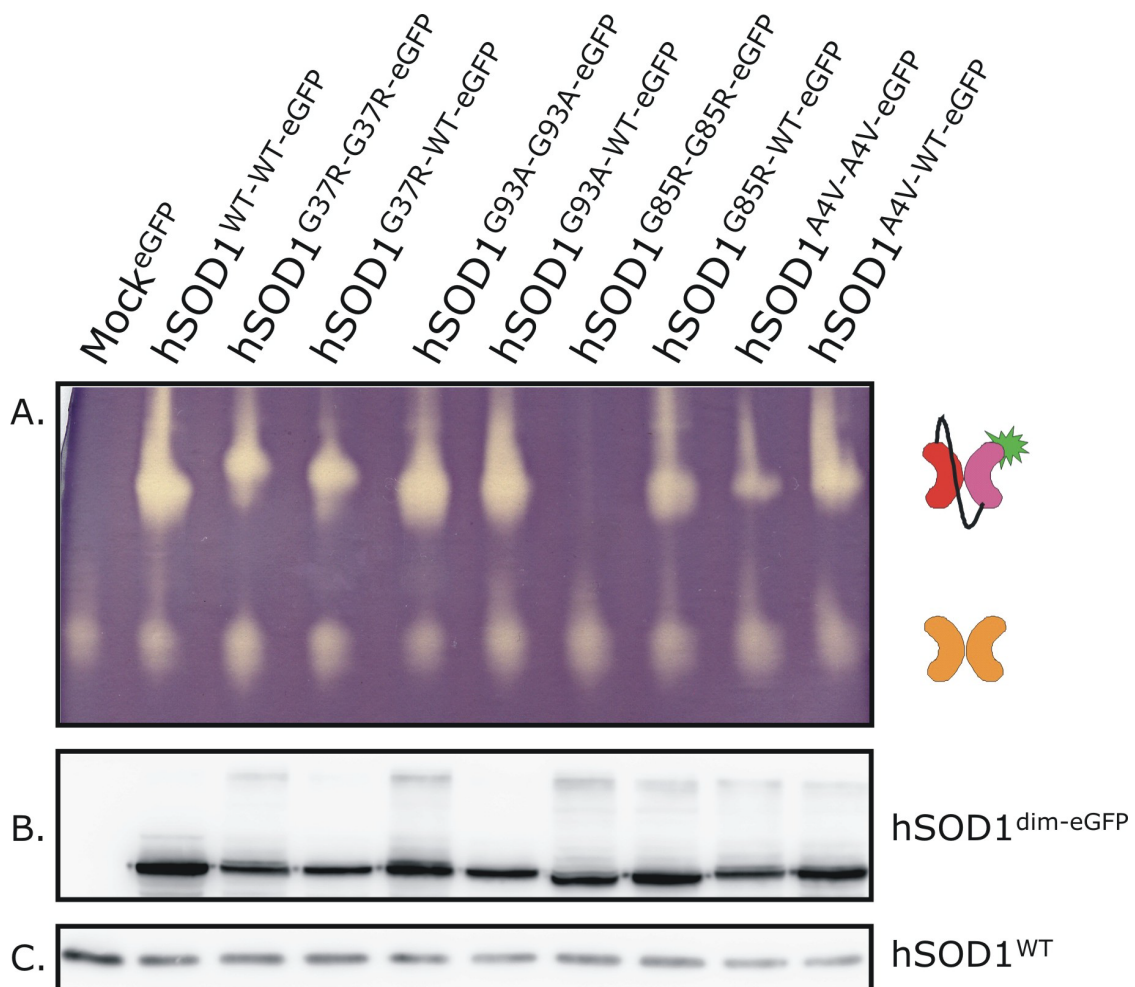


Abbildung 21: Transient exprimierte hSOD1^{Dimer-eGFP}-Fusionsproteine zeigen eine spezifische Dismutaseaktivität.

SOD1-Aktivitätsassay und Immunblot von Extrakten transient transfizierter HEK 293T-Zellen. Je 30 µg Komplettlysat der Zellen wurden auf ein 15 %-iges SOD1-Aktivitätsgel (A) und je 15 µg Komplettlysat wurden auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen (B & C). Die Immundetektion der Fusionsproteine (B) und der als Ladekontrolle benutzten endogenen hSOD1^{WT} (C) erfolgte anhand eines SOD1-Antikörpers.

hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-Homodimer konnte keine Dismutaseaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 21A, Spur 6). Die Dimerfusionsproteine hatten ein Molekulargewicht von ~70 kDa (Abbildung 21B), das sich aus zweimal ~20 kDa hSOD1, ~27 kDa eGFP und dem Protein-Linker zusammensetzte. Lediglich hSOD1^{G85R-G85R-eGFP} und hSOD1^{G85R-WT-eGFP} liefen im SDS-Gel etwas weiter als die anderen Fusionsproteine, was mit den Beobachtungen für hSOD1^{G85R-eGFP} übereinstimmt (siehe 3.1.2.). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Transfektionen zeigte, wie bereits beschrieben (siehe 3.1.2.), bei Mock^{eGFP} eine Fluoreszenz des gesamten Zellkörpers inklusive Zellkern (Abbildung 22A). Bei hSOD1^{WT-WT-eGFP} wurde eine, teilweise perinukleär verstärkte, cytoplasmatische Fluoreszenz beobachtet. Der Zellkern blieb jedoch ausgespart und aggregatartige Strukturen traten nicht auf (Abbildung 22B). Bei hSOD1^{G37R-G37R-eGFP} wurde neben einer cytosolischen Expression eine Vielzahl körniger Aggregate beobachtet (Abbildung 22C). Diese Aggregate konnten bei hSOD1^{G37R-WT-eGFP} nicht nachgewiesen werden, vielmehr war die Expression mit dem Expressionsmuster von hSOD1^{WT-WT-eGFP} vergleichbar (Abbildung 22D). Bei der Expression der hSOD1^{G93A}-Dimere wurde Vergleichbares beobachtet: Während hSOD1^{G93A-G93A-eGFP} neben einer cytoplasmatischen Lokalisation in Form von vielen körnigen Aggregaten auftrat (Abbildung 22E), wurde hSOD1^{G93A-WT-eGFP} ausschließlich cytoplasmatisch exprimiert (Abbildung 22F). Bereits die Anzahl der körnigen Proteinaggregate nach den Transfektionen von hSOD1^{G85R-G85R-eGFP} (Abbildung 23A) und hSOD1^{A4V-A4V-eGFP} (Abbildung 23C) war im Vergleich mit hSOD1^{G37R-G37R-eGFP} und hSOD1^{G93A-G93A-eGFP} etwas höher. Eine stärkere Aggregationsträchtigkeit von hSOD1^{G85R} und hSOD1^{A4V} zeigte sich jedoch vor allem in einer Aggregatbildung der hSOD1^{G85R-WT-eGFP}- (Abbildung 23B) und hSOD1^{A4V-WT-eGFP}-Heterodimerfusionsproteine (Abbildung 23D), die bei hSOD1^{G37R} und hSOD1^{G93A} nicht beobachtet wurde. Die anhand der Fluoreszenzmikroskopie beobachteten Aggregationstendenzen spiegelten sich auch in der biochemischen Fraktionierung der Zellextrakte wider. Während sich hSOD1^{WT-WT-eGFP}, hSOD1^{G37R-WT-eGFP} und hSOD1^{G93A-WT-eGFP} größtenteils in der Überstandsfraction befanden, wurde der Großteil der hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}- und hSOD1^{G93A-G93A-eGFP}-Fusionsproteine, sowie hochmolekulare SOD1-Spezies in der Pelletfraction detektiert (Abbildung 24A). Auch für hSOD1^{G85R-G85R-eGFP} und hSOD1^{A4V-A4V-eGFP} ließ sich eine starke Anreicherung der Proteine in der Pelletfraction nachweisen. Vergleichbar zur Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 23)

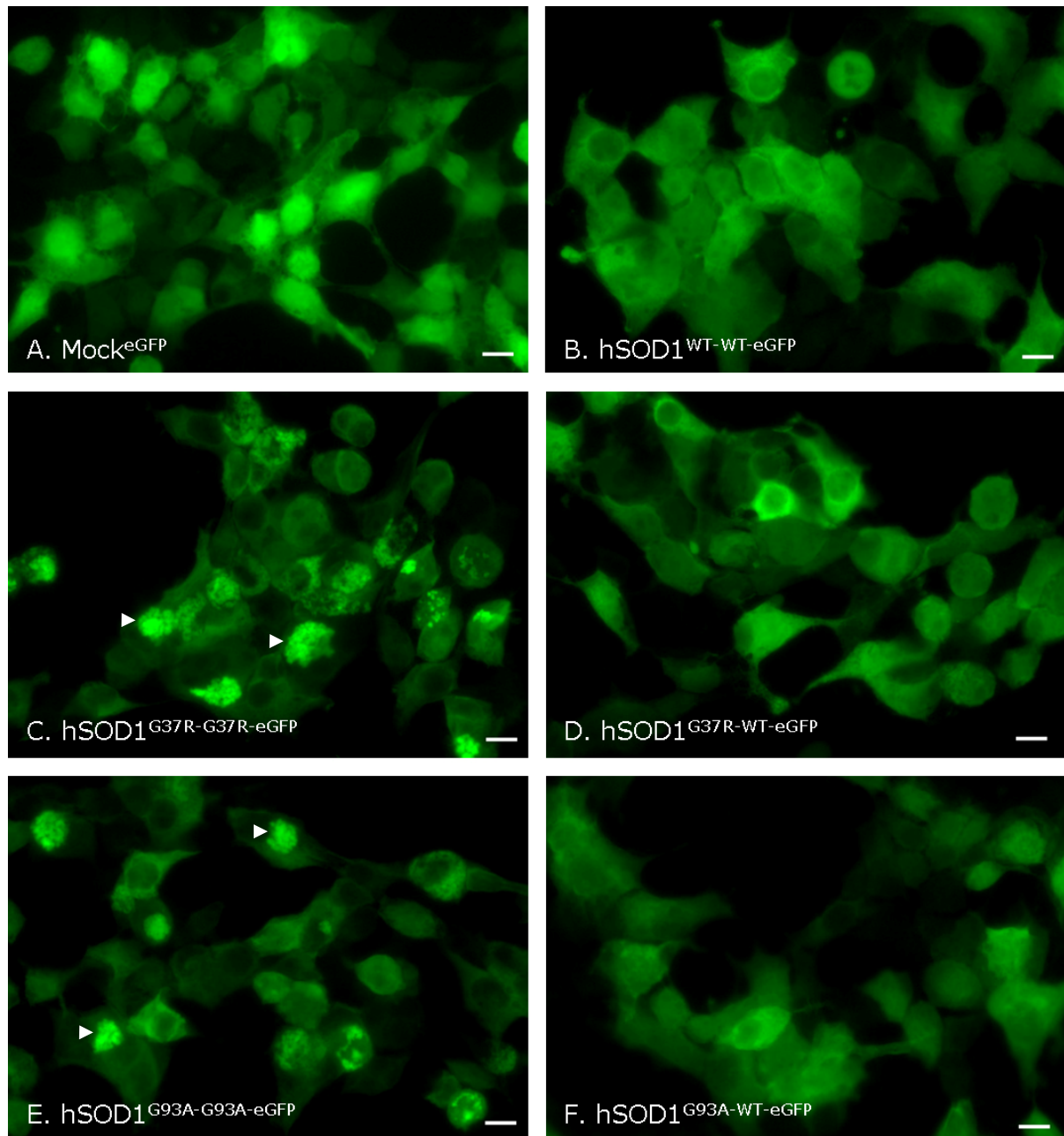


Abbildung 22: hSOD1^{G37R-G37R}-eGFP- und hSOD1^{G93A-G93A}-eGFP-Homodimere induzieren cytoplasmatische Proteinaggregate, während bei hSOD1^{G37R-WT}-eGFP- und hSOD1^{G93A-WT}-eGFP-Heterodimeren keine Aggregate auftreten

Fluoreszenzmikroskopie transient transfizierter HEK 283T-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten eine homogene Fluoreszenz bei Mock^{eGFP}-transfizierten Zellen (A). hSOD1^{WT-WT}-eGFP-transfizierte Zellen wiesen eine cytoplasmatische Lokalisation der Fusionsproteine auf; aggregatartige Strukturen wurden nicht detektiert (B). Bei den hSOD1^{G37R-G37R}-eGFP- (C) und hSOD1^{G93A-G93A}-eGFP-Homodimerfusionsproteinen (E) wurden zusätzlich zu einer cytosolischen Lokalisation aggregatartige Strukturen gebildet (Dreiecke), die bei den hSOD1^{G37R-WT}-eGFP-(D) und hSOD1^{G93A-WT}-eGFP-Heterodimerfusionsproteinen (F) nicht auftraten. Größenbalken = 10 μ M.

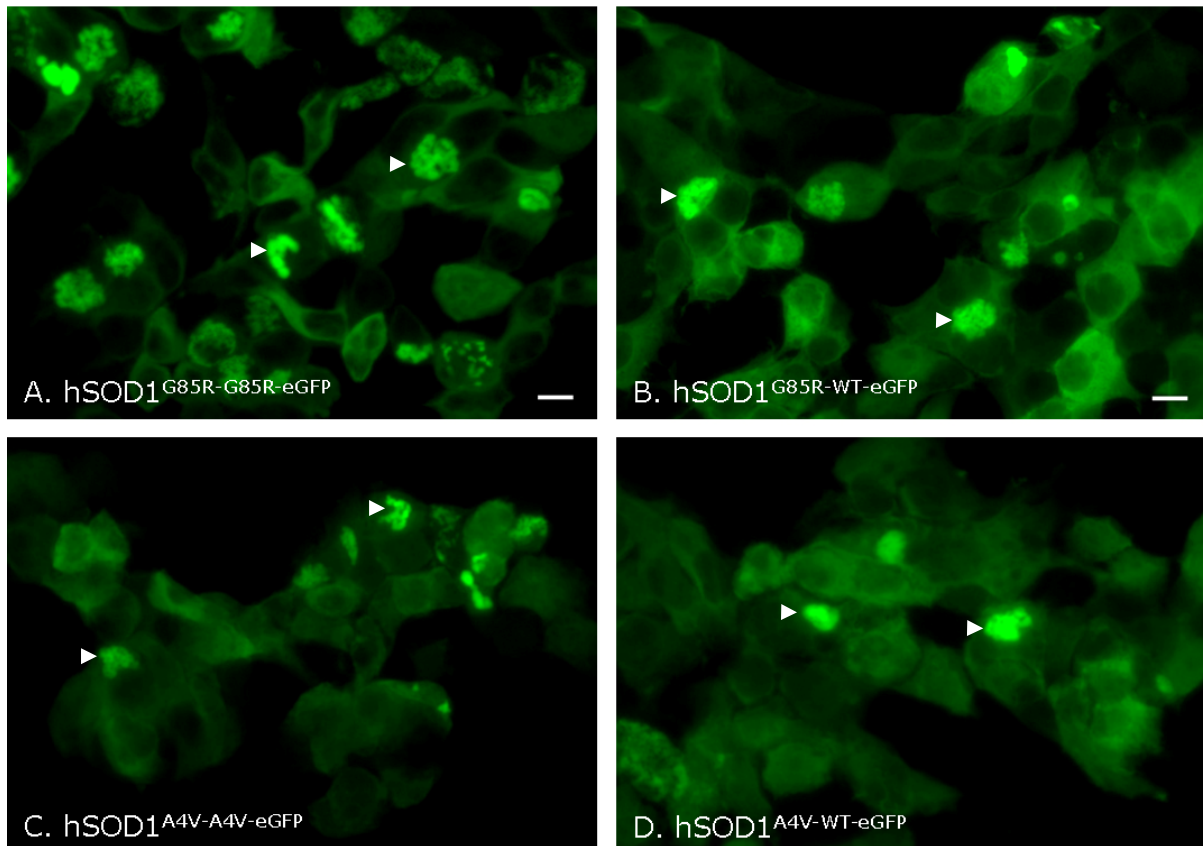


Abbildung 23: hSOD1^{G85R-G85R}-eGFP- und hSOD1^{A4V-A4V}-eGFP-Homodimere sowie hSOD1^{G85R-WT}-eGFP- und hSOD1^{A4V-WT}-eGFP-Heterodimere induzieren cytoplasmatische Proteinaggregate

Fluoreszenzmikroskopie transient transfizierter HEK 283T-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten sowohl bei den hSOD1^{G85R-G85R}-eGFP- (A) und hSOD1^{A4V-A4V}-eGFP- (C) Homodimerfusionsproteinen als auch bei den hSOD1^{G85R-WT}-eGFP (B) und hSOD1^{A4V-WT}-eGFP (D) Heterodimerfusionsproteinen aggregatartige Strukturen (Dreiecke). Größenbalken = 10 µm.

wurde auch bei hSOD1^{G85R-WT}-eGFP und hSOD1^{A4V-WT}-eGFP eine Anreicherung in der Pelletfraktion detektiert. Anhand der statistischen Analyse wurde deutlich, dass das Aggregationspotential der hSOD1^{G37R}- und hSOD1^{G93A}-Homodimere im Vergleich zu Heterodimeren dreimal höher war (Abbildung 24D). hSOD1^{G85R-G85R}-eGFP hatte ein ~2,5-faches Aggregationspotential verglichen mit hSOD1^{G85R-WT}-eGFP, während hSOD1^{A4V-A4V}-eGFP nur ca. 1,3-fach so stark aggregierte wie hSOD1^{A4V-WT}-eGFP. Es konnte also für alle hSOD1^{mut} demonstriert werden, dass die mutanten Heterodimere ein signifikant geringeres Aggregationspotential besitzen als die entsprechenden Homodimere.

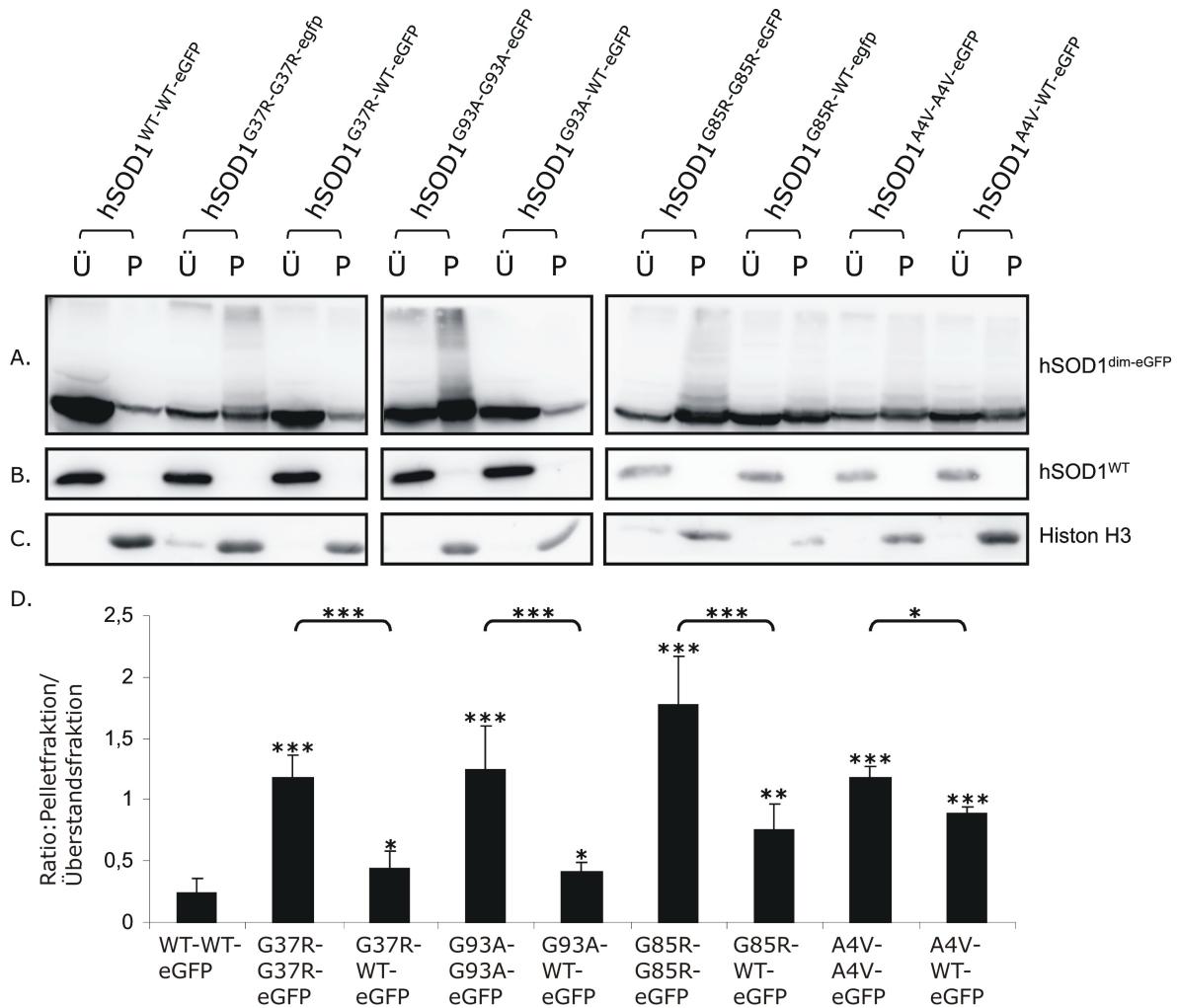


Abbildung 24: Homodimere hSOD1^{mut-mut-eGFP} haben ein höheres Aggregationspotential als heterodimere hSOD1^{mut-WT-eGFP}

Differentielle Fraktionierung transient transfizierter HEK 293T-Zellen. Je 15 µg Überstands- (Ü) bzw. Pelletfraktion (P) wurden auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen. Die Immundetektion der Fusionsproteine (A) und der endogenen hSOD1^{WT} (B) erfolgte anhand eines SOD1-Antikörpers. Die korrekte Auftrennung in Überstandsfraktion und Pelletfraktion wurde durch Immundetektionen der endogenen hSOD1^{WT} (B) und des Histons H3 (C) überprüft. Die gegen die Gesamtproteinmenge normalisierten Proteinbanden wurden densitometrisch vermessen. Der durchschnittliche Quotient aus Pellet- und Überstandsfraktion +SEM wurde in einem Graphen dargestellt (D). (*) über den Balken repräsentieren die statistische Signifikanz mit hSOD1^{WT-WT-eGFP}, während die (*) über der Klammer die statistische Signifikanz zwischen den verschiedenen mutanten Dimeren darstellen (hSOD1^{G85R-WT-eGFP}: n=7; hSOD1^{G93A-G93A-eGFP}: n=6; hSOD1^{WTWT-eGFP}, hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}, hSOD1^{G37R-WT-eGFP}, hSOD1^{G93A-G93A-eGFP}: n=5; hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}: n=4; hSOD1^{A4V-A4V-eGFP}, hSOD1^{A4V-WT-eGFP}: n=3; Zweiseitiger t-Test *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei hSOD1-Monomere mittels eines flexiblen Peptidlinkers kovalent miteinander verknüpft, um die Eigenschaften mutanter hSOD1-Homodimere und mutant-wildtypischer hSOD1-Heterodimere zu untersuchen. Anhand von Aktivitätsassays wurde hier gezeigt, dass weder der Peptidlinker, noch C-terminal fusioniertes eGFP die Konformation oder korrekte Beladung der Fusionsproteine mit Kupfer- und Zinkionen behinderte. Abgesehen von der Kupfermangelmutterante $hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}$ konnte für alle untersuchten homo- und heterodimeren hSOD1-Formen eine spezifische Dismutaseaktivität nachgewiesen werden. Anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen und mittels differentieller Zellfraktionierungen wurde weiterhin demonstriert, dass alle heterodimeren hSOD1-Formen ein signifikant geringeres Aggregationspotential besaßen, als die dazugehörigen Homodimere. Das relative Aggregationspotential der unterschiedlichen mutanten hSOD1-Dimere im Vergleich zueinander entsprach in etwa den Ergebnissen der transfizierten $hSOD1^{mut-eGFP}$ -Monomere.

3.2.3. Charakterisierung stabil in N2A-Zellen exprimierter $hSOD1^{Dimer-eGFP}$ -Fusionsproteine

Um neuronale Zelllinien zu generieren, die die Dimerfusionsproteine in konstanten Spiegeln exprimieren, wurden N2A-Zellen stabil mit den Dimerkonstrukten $hSOD1^{WT-WT-eGFP}$, $hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}$, $hSOD1^{G85R-WT-eGFP}$, $hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}$ und $hSOD1^{G37R-WT-eGFP}$ transfiziert. Die von einem murinen Neuroblastom abgeleiteten N2A-Zellen waren bereits zuvor von zahlreichen Arbeitsgruppen als System etabliert worden, um monomere $SOD1^{mut}$ stabil zu transfizieren und in Zellüberlebensassays mit verschiedenen Stressoren (u. a. Xanthin/Xanthin Oxidase) die Toxizität der $hSOD1^{mut}$ auf die Zelle zu untersuchen (KRISHNAN *et al.* 2006; PASINELLI *et al.* 1998). Für alle mutanten Konstrukte wurden jeweils zwei unabhängige Zelllinien generiert, um Positionseffekte auszuschließen. Aufgrund des fusionierten eGFP konnte die Expression der Fusionsproteine bereits anhand fluoreszenzmikroskopischer Analysen beobachtet werden (Abbildung 25). Es war stets eine cytoplasmatische Lokalisation der Fusionsproteine zu beobachten, wohingegen keine mikroskopisch sichtbaren Aggregate detektiert werden konnten.

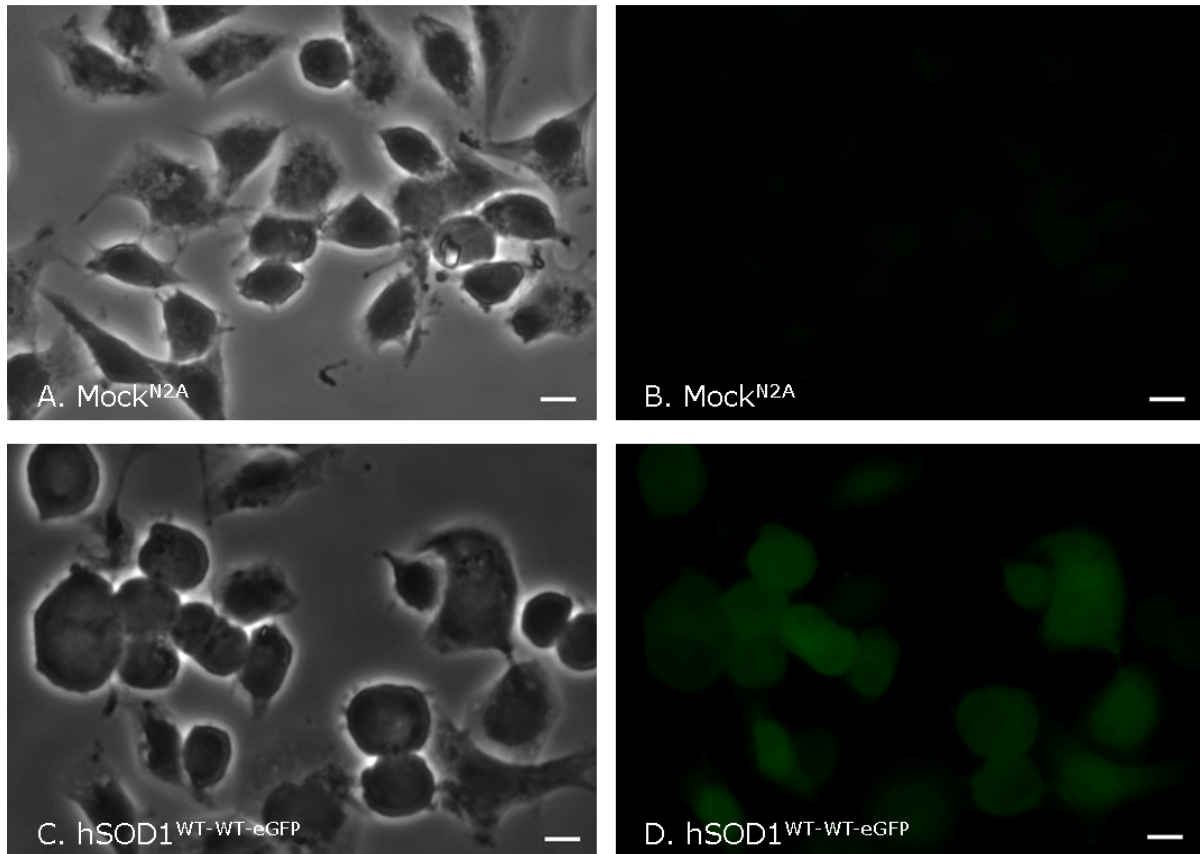


Abbildung 25: Stabil transfizierte N2A-Zellen exprimieren die eGFP-fusionierten Dimere

Untransfizierte N2A-Zellen (A, Phasenkontrastaufnahme) zeigten bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 480 nm keine grüne Fluoreszenz (B). Stabil mit hSOD1^{Dimer-eGFP}-Konstrukten transfizierte N2A-Linien (C, Phasenkontrastaufnahme) wiesen eine homogene cytoplasmatische grüne Fluoreszenz auf. Die mit hSOD1^{WT-WT-eGFP} (D) transfizierte Linie ist repräsentativ für alle stabilen Linien, bei denen ebenfalls keine makroskopisch sichtbaren Aggregate beobachtet wurden. Größenbalken = 10 µM.

Die hSOD1^{dim-eGFP}-Aktivität und Expressionsspiegel der stabilen Linien wurden anhand von Aktivitätsgelen und *Westernblot*-Analysen bestimmt (Abbildung 26). Analog zur transienten Expression der Dimere in HEK 293T-Zellen wurden Aktivitätsbanden unterschiedlicher Höhen beobachtet. Während die Aktivitätsbande von hSOD1^{G37R-G37R-eGFP} deutlich höher lief als die von hSOD1^{WT-WT-eGFP}, wurde die Aktivitätsbande von hSOD1^{G37R-WT-eGFP} zwischen diesen beiden Laufhöhen detektiert (Abbildung 26A). Bei hSOD1^{G85R-G85R-eGFP} wurde wie bei der transienten Expression in HEK 293T-Zellen keine Aktivität detektiert, während die Aktivität von hSOD1^{G85R-WT-eGFP} wahrscheinlich aufgrund zu niedriger Expressionsspiegel nicht nachgewiesen werden konnte. Die Proteinspiegel der hSOD1-Dimere in den stabilen Zelllinien wurden anhand von *Westernblot*-Analysen mit einem

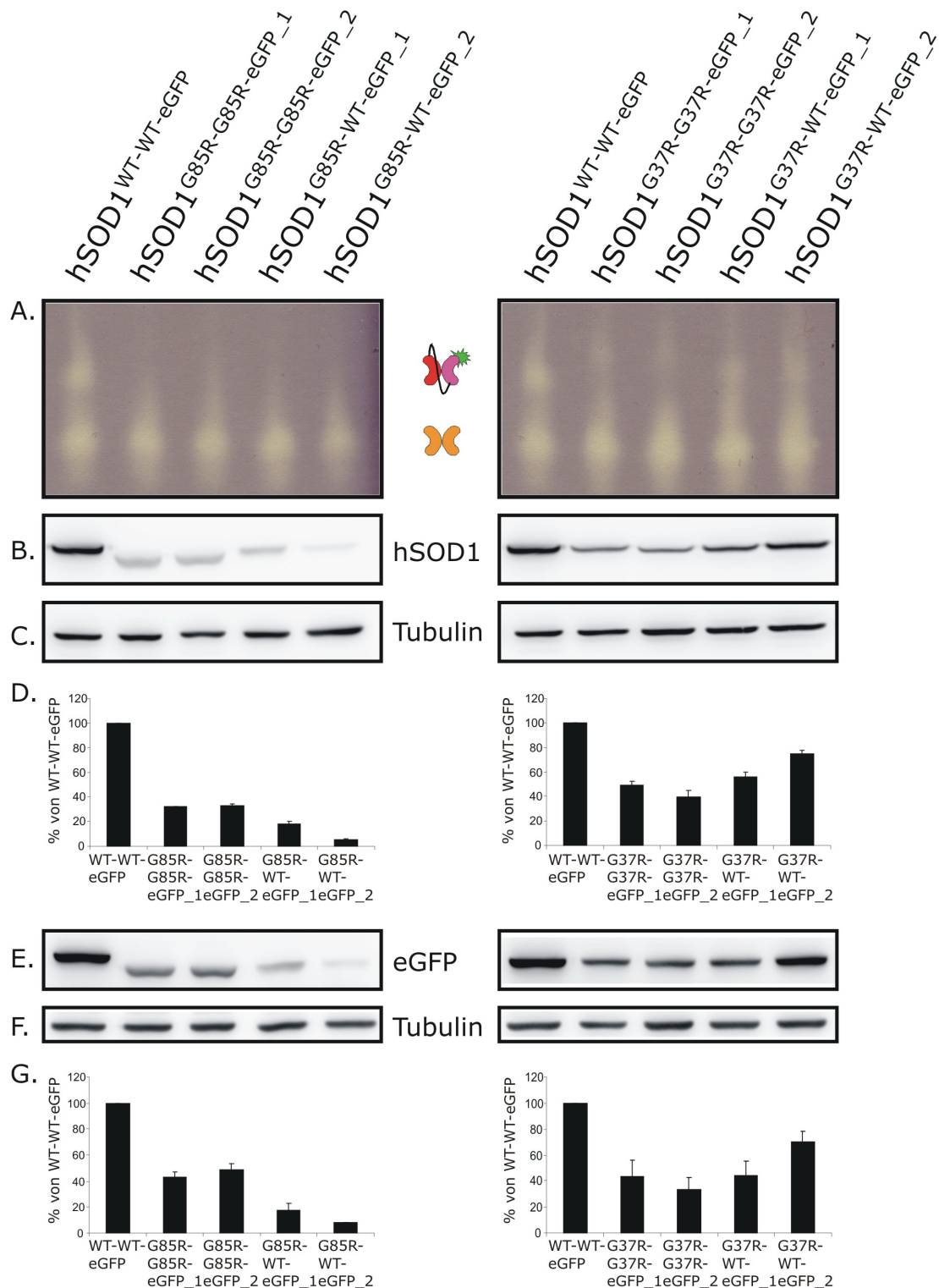


Abbildung 26: Expression und Aktivität der stabil transfizierten Konstrukte

SOD1-Aktivitätsassay und Immunblot von Extrakten stabil transfizierter N2A-Zellen. Je 30 μ g Komplettlysat der Zellen wurden auf ein 15 %-iges SOD1-Aktivitätsgel (A) und je 15 μ g Komplettlysat wurden auf ein 8 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen (B & C, E & F). Die Immundetektion der Fusionsproteine erfolgte anhand eines SOD1-Antikörpers (B) und anhand eines GFP-Antikörpers (E). Als Ladekontrolle wurde Tubulin anhand eines monoklonalen Antikörpers detektiert (C & F). Die Proteinbanden wurden densitometrisch vermessen und gegen Tubulin abgeglichen. Der durchschnittliche prozentuale Anteil der hSOD1^{WTWT}-eGFP-Expression der verschiedenen Linien +SEM aus drei unabhängigen Experimenten wurde in einem Graphen dargestellt (D & G).

hSOD1-Antikörper (Abbildung 26B) und einem GFP-Antikörper (Abbildung 26E) bestimmt. Das Signal des hSOD1-Antikörpers war im Vergleich zum GFP-Antikörper bei hSOD1^{G85R}-Fusionsproteinen leicht verringert, da die Epitope aufgrund einer Konformationsänderung nicht/schlechter erkannt wurden. Zur Normalisierung der Proben wurde ein Tubulin-Antikörper verwendet (Abbildung 26C, D, F, G). Die normalisierten Expressionsspiegel der beiden hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-Linien betragen 45–50 % der Expression von hSOD1^{WT-WT-eGFP}, während die hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-Linien lediglich 10–20 % der hSOD1^{WT-WT-eGFP} exprimierten (Abbildung 26G). Diese starken Expressionsunterschiede weisen darauf hin, dass das hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-Fusionsprotein toxischer für die Zellen ist als die anderen Fusionsproteine und deshalb nur Zellen die Selektionsphase überlebten, die das hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-Heterodimer in vergleichsweise schwachem Umfang exprimierten. Die Expressionsspiegel der beiden hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}-Linien betragen zwischen 35 und 40 % der hSOD1^{WT-WT-eGFP} Linie, während für das hSOD1^{G37R-WT-eGFP}-Heterodimer eine Linie mit 40 % und eine Linie mit 70 % des Expressionsspiegels der hSOD1^{WT-WT-eGFP}-Linie generiert wurde (Abbildung 26G). Obwohl bei keiner der stabilen Linien makroskopisch sichtbare Aggregate beobachtet werden konnten, wurde anhand einer differentiellen Fraktionierung nachgewiesen, dass die hSOD1-Fusionsproteine der verschiedenen Linien unterschiedliche Aggregationspotentiale aufwiesen (Abbildung 27). Für beide Homodimerfusionsproteine konnte eine im Vergleich zu den Heterodimerfusionsproteinen und zu hSOD1^{WT-WT-eGFP} signifikant höhere Aggregationstendenz gezeigt werden. Besonders deutlich wurde der Unterschied der Aggregationspotentiale zwischen den beiden hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}- und den beiden hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-Linien mit einer etwa 2,5-fach höheren Aggregationstendenz der hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-exprimierenden Linien.

hSOD1^{G37R}- und hSOD1^{G85R}-Dimere, die stabil in N2A-Zellen exprimiert wurden, zeigten ein übereinstimmendes Aggregationsverhalten wie solche in HEK 293T-Zellen nach transienter Transfektion. hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-Heterodimere wurden von N2A-Zellen schlecht toleriert, was auf eine erhöhte Toxizität dieser Proteine hinweist. Da die Expressionsspiegel der hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-Heterodimere gering waren, konnte keine Dismutaseaktivität detektiert werden.

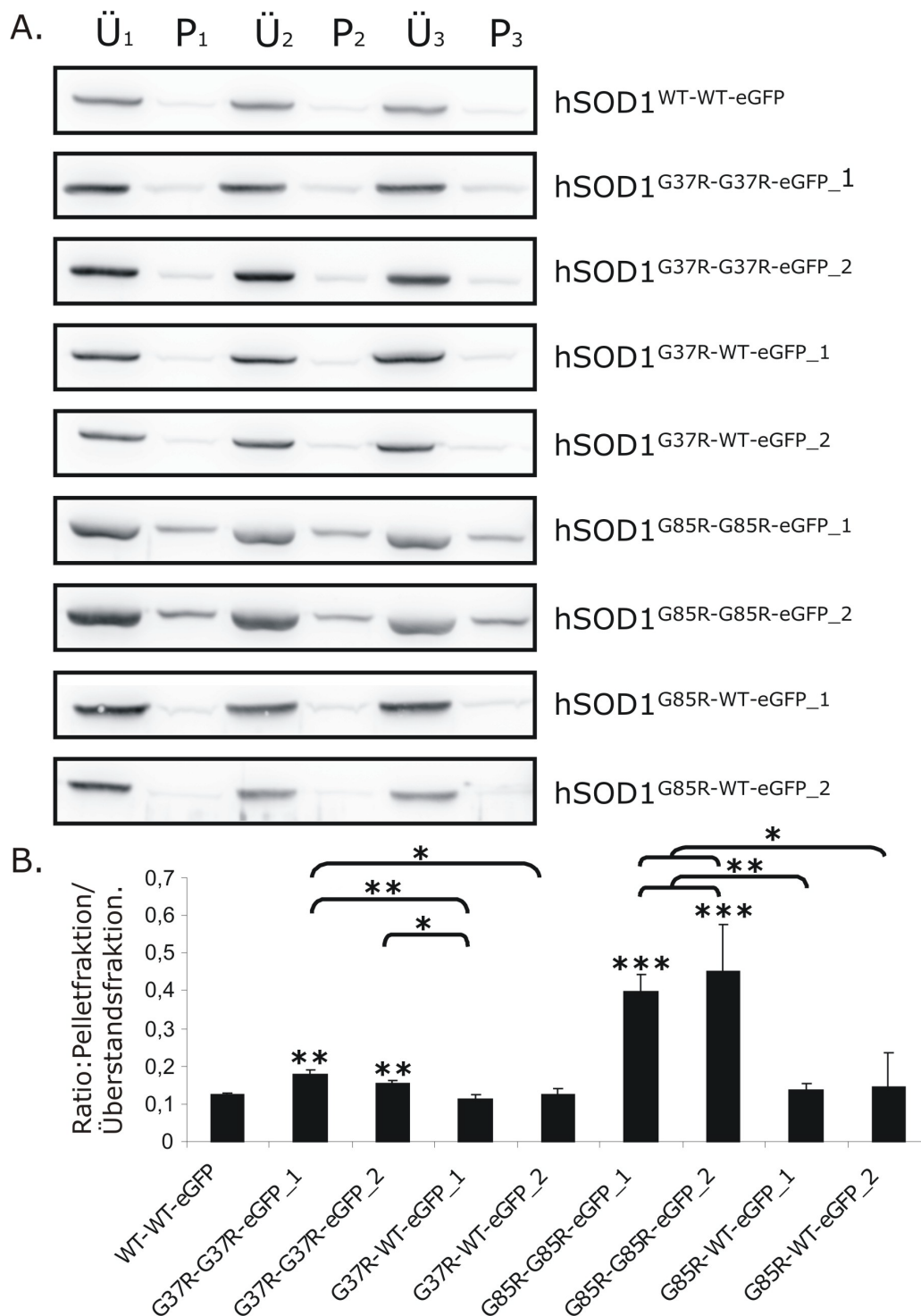


Abbildung 27: Stabil in N2A-Zellen exprimierte hSOD1-Homodimere weisen ein stärkeres Aggregationspotential als hSOD1-Heterodimere auf

Differentielle Fraktionierung stabil transfizierter N2A-Zellen. Je 15 μ g Überstands- (\ddot{U}) bzw. Pelletfraktion (P) aus drei unabhängigen Experimenten wurden auf ein 8 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen. Die Immundetektion der Fusionsproteine erfolgte anhand eines SOD1-Antikörpers (A). Die gegen die Gesamtproteinmenge normalisierten Proteinbanden wurden densitometrisch vermessen. Der durchschnittliche Quotient aus Pellet- und Überstandsfraktion +SEM wurde in einem Graphen dargestellt (B; n=3). (*) über den Balken repräsentieren die statistische Signifikanz mit hSOD1^{WT-WT-eGFP}, während die (*) über der Klammer die statistische Signifikanz zwischen den beiden mutanten Dimeren darstellen (Zweiseitiger t-Test *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

3.2.4. Metalldefiziente hSOD1^{G85R-G85R-eGFP} exprimierende N2A-Zellen sind weniger sensitiv gegenüber sekundärem Stress

Zur Bestimmung der Toxizität homo- und heterodimerer mutanter hSOD1 wurden MTT-Zellüberlebensassays durchgeführt. Hierbei wurden die verschiedenen stabilen neuronalen Zelllinien auf 96-Well-Platten ausplattiert und für 48 h differenziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Toxinen behandelt, um schließlich das Zellüberleben anhand der Reduktion von MTT in Abhängigkeit des zellulären Stoffwechsels zu bestimmen. Als Toxin wurde das indirekt O₂^{•-} generierende Xanthin/Xanthin Oxidase-System (Abbildung 28) und das direkt oxidativ wirkende H₂O₂ (Abbildung 29) verwendet. Bei den Überlebensassays mit dem Xanthin/Xanthin Oxidase-System wurde eine konzentrationsabhängige Wirkung des Toxins gezeigt. Bereits nach Behandlung mit 100 µM Xanthin wurde deutlich, dass die hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-exprimierenden Linien nur geringfügig sensitiver waren als die hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierende Linie, wohingegen die hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-exprimierenden Linien eine höhere Sensitivität gegenüber dem Toxin zeigten (Abbildung 28A). Noch deutlicher wurde dieser Effekt nach Behandlung mit 200 µM Xanthin, nach der die hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-exprimierenden Linien verglichen mit den hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-exprimierenden Linien ein um 50 % geringeres Zellüberleben aufwiesen. Im Vergleich zur hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierenden Linie waren die hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-exprimierenden Linien nur geringfügig sensitiver gegenüber dem Toxin (Abbildung 28A). Im Gegensatz hierzu zeigten sowohl die hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}- als auch die hSOD1^{G37R-WT-eGFP}-exprimierenden Zelllinien kaum Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität nach Xanthin/Xanthin Oxidase-vermitteltem Stress. Beide waren jedoch deutlich sensitiver als die hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierende Linie (Abbildung 28B). Diese Ergebnisse spiegelten sich auch in den Zellüberlebensassays mit H₂O₂ als Stressor wider (Abbildung 29). Noch deutlicher als mit Xanthin/Xanthin Oxidase konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Vulnerabilität der hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-exprimierenden Linien kaum von der hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierenden Linie unterschied, wohingegen die hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-exprimierenden Linien sehr viel sensitiver auf den H₂O₂-Stress reagierten (Abbildung 29A). Auch die hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}- und die hSOD1^{G37R-WT-eGFP}-exprimierenden Zelllinien reagierten im Vergleich zu der hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierenden Linie sehr sensitiv auf den H₂O₂-Stress. (Abbildung 29B).

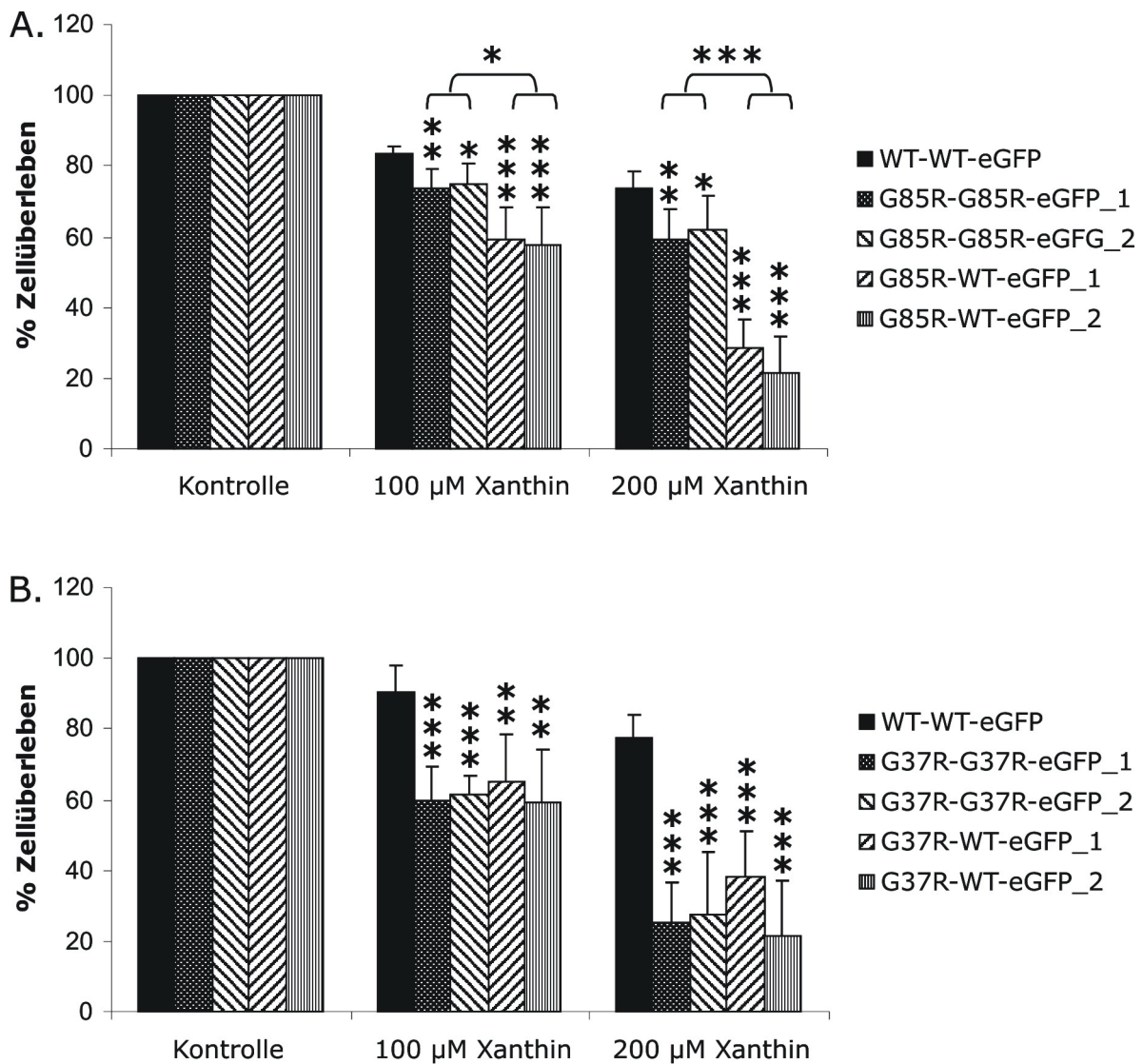


Abbildung 28: hSOD1^{G85R}-WT-eGFP-Heterodimere sind in Xanthin/Xanthin Oxidase-behandelten N2A-Zellen toxischer als hSOD1^{G85R}-G85R-eGFP-Homodimere, während hSOD1^{G37R}-WT-eGFP-Hetero- und hSOD1^{G37R}-G37R-eGFP-Homodimere gleich toxisch sind

Stabil hSOD1^{WT-WT-eGFP}, hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}, hSOD1^{G85R-WT-eGFP} (A), hSOD1^{G37R-G37R-eGFP} und hSOD1^{G37R-WT-eGFP} (B) exprimierende Zelllinien wurden für 48 h differenziert und für 24 h mit Xanthin in Kombination mit 10 mU/ml Xanthin Oxidase behandelt. Das Zellüberleben wurde anhand eines MTT-Assays bestimmt und auf das Überleben unbehandelter Zellen normalisiert. Die Daten repräsentieren die durchschnittlichen Werte +SEM aus 6 unabhängigen Experimenten. (*) über den Balken repräsentieren die statistische Signifikanz gegenüber den hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierenden Zellen, während die (*) über der Klammer die statistische Signifikanz zwischen den beiden mutante Dimere exprimierenden Zellen darstellen (Zweiseitiger t-Test *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

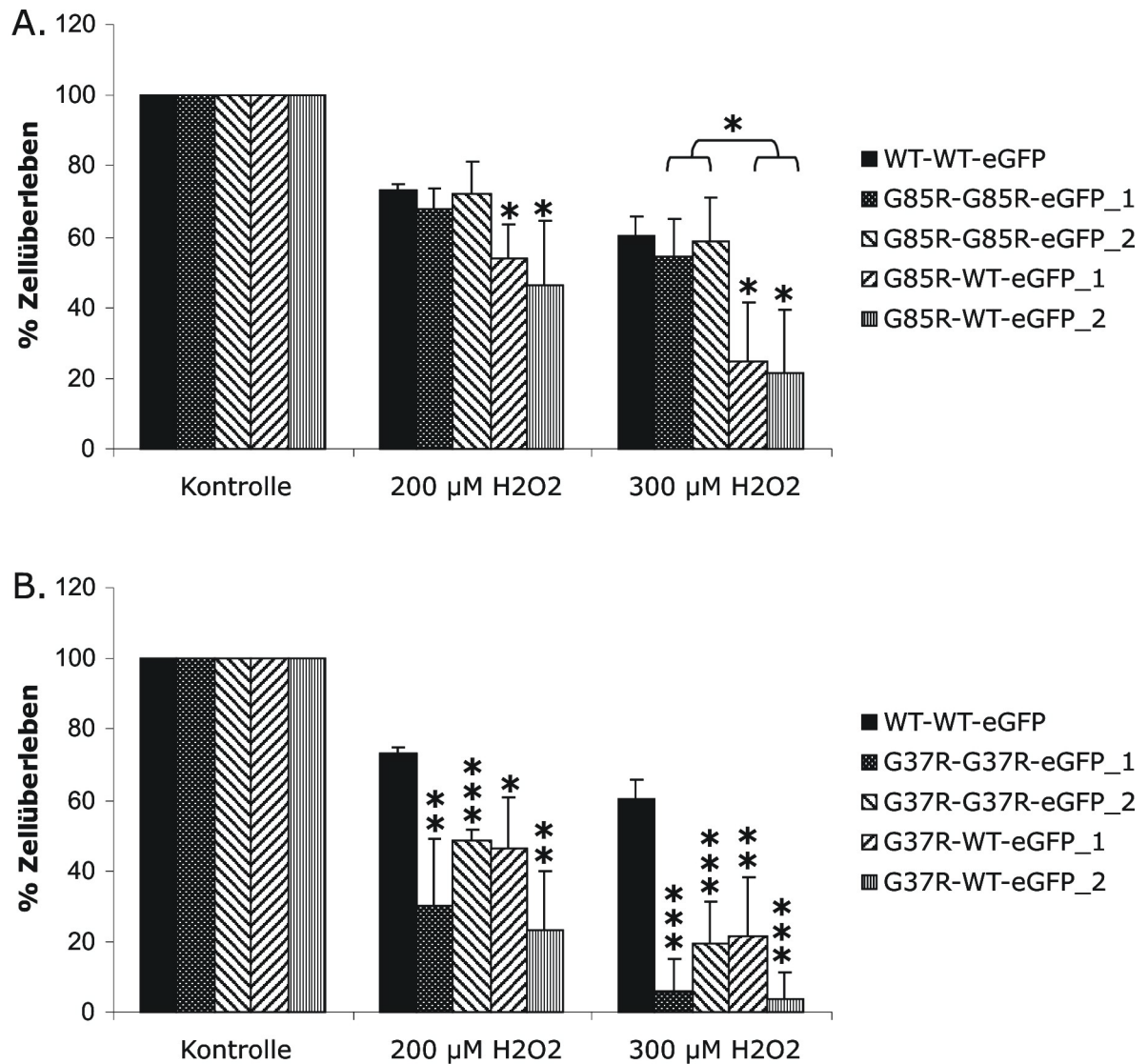


Abbildung 29: hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-Heterodimere sind in H₂O₂-behandelten N2A-Zellen toxischer als hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-Homodimere, während hSOD1^{G37R-WT-eGFP}-Hetero- und hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}-Homodimere gleich toxisch sind

Stabil hSOD1^{WT-WT-eGFP}, hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}, hSOD1^{G85R-WT-eGFP} (A), hSOD1^{G37R-G37R-eGFP} und hSOD1^{G37R-WT-eGFP} (B) exprimierende Zelllinien wurden für 48 h differenziert und für 24 h mit H₂O₂ behandelt. Das Zellüberleben wurde anhand eines MTT-Assays bestimmt und auf das Überleben unbehandelter Zellen normalisiert. Die Daten repräsentieren die durchschnittlichen Werte +SEM aus vier unabhängigen Experimenten. (*) über den Balken repräsentieren die statistische Signifikanz gegenüber den hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierenden Zellen, während die (*) über der Klammer die statistische Signifikanz zwischen den beiden mutante Dimere exprimierenden Zellen darstellen (Zweiseitiger t-Test *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Die Behandlung der stabilen Linien mit oxidativen Stress generierenden Substanzen zeigte eine erhöhte Sensitivität aller mutanten, Dismutase-aktiven hSOD1-Spezies. Die inaktive, aus zwei kupferdefizienten Untereinheiten zusammengesetzte hSOD1^{G85R-G85R-eGFP} tolerierte den oxidativen Stress signifikant besser, teilweise sogar fast so gut wie hSOD1^{WT-WT-eGFP}. Die Korrelation der Dismutaseaktivität mit einer gesteigerten Toxizität der Fusionsproteine lässt auf eine veränderte Enzymaktivität als toxische Eigenschaft schließen, wohingegen ein gesteigertes Aggregationspotential nicht mit der Toxizität korrelierte.

3.2.5. Der oxidative Stress in mutant-wildtypischen hSOD1-Dimeren ist erhöht

Da die Toxizität der verschiedenen Fusionsproteine auf eine aberrante, oxidativen Stress generierende Enzymaktivität zurückzuführen sein könnte, wurde ein Assay etabliert, um erhöhten oxidativen Stress nachzuweisen. Ein Marker für oxidativen Stress ist das Auftreten von erhöhten Spiegeln carbonylierter Proteine, wie sie für ALS beschrieben sind (FERRANTE *et al.* 1997a; SHAW *et al.* 1995b). Um eine Anreicherung oxidativ modifizierter Proteine in den stabil mit den hSOD1^{Dimer-eGFP}-Konstrukten transfizierten N2A-Linien zu ermöglichen, wurden Extrakte von post-mitotischen N2A-Zellen nach sechs Tagen Differenzierung untersucht. Die Carbonylreste der Proteine wurden anhand einer 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)-Behandlung derivatisiert, was auf *Westernblot*-Ebene mittels eines DNP-Antikörpers detektiert und quantifiziert wurde (Abbildung 30). Sowohl bei den hSOD1^{G85R-WT-eGFP}- (Abbildung 30A) als auch bei den hSOD1^{G37R-WT-eGFP}-Heterodimere exprimierenden Zellen (Abbildung 30B) wurden signifikant höhere Carbonylierungsniveaus detektiert als bei den hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}- bzw. hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}-Homodimere exprimierenden Zellen. Interessanterweise waren die Carbonylierungsspiegel der hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}- bzw. hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}-Homodimere exprimierenden Zellen sogar niedriger als die von hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierenden Zellen, was jedoch auf eine stärkere Expression des hSOD1^{WT-WT-eGFP}-Fusionsproteins zurückzuführen sein könnte. Naive N2A-Zellen zeigten mit circa 50 % von hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierenden Zellen hingegen einen geringeren Carbonylierungsspiegel als die transfizierten Zellen.

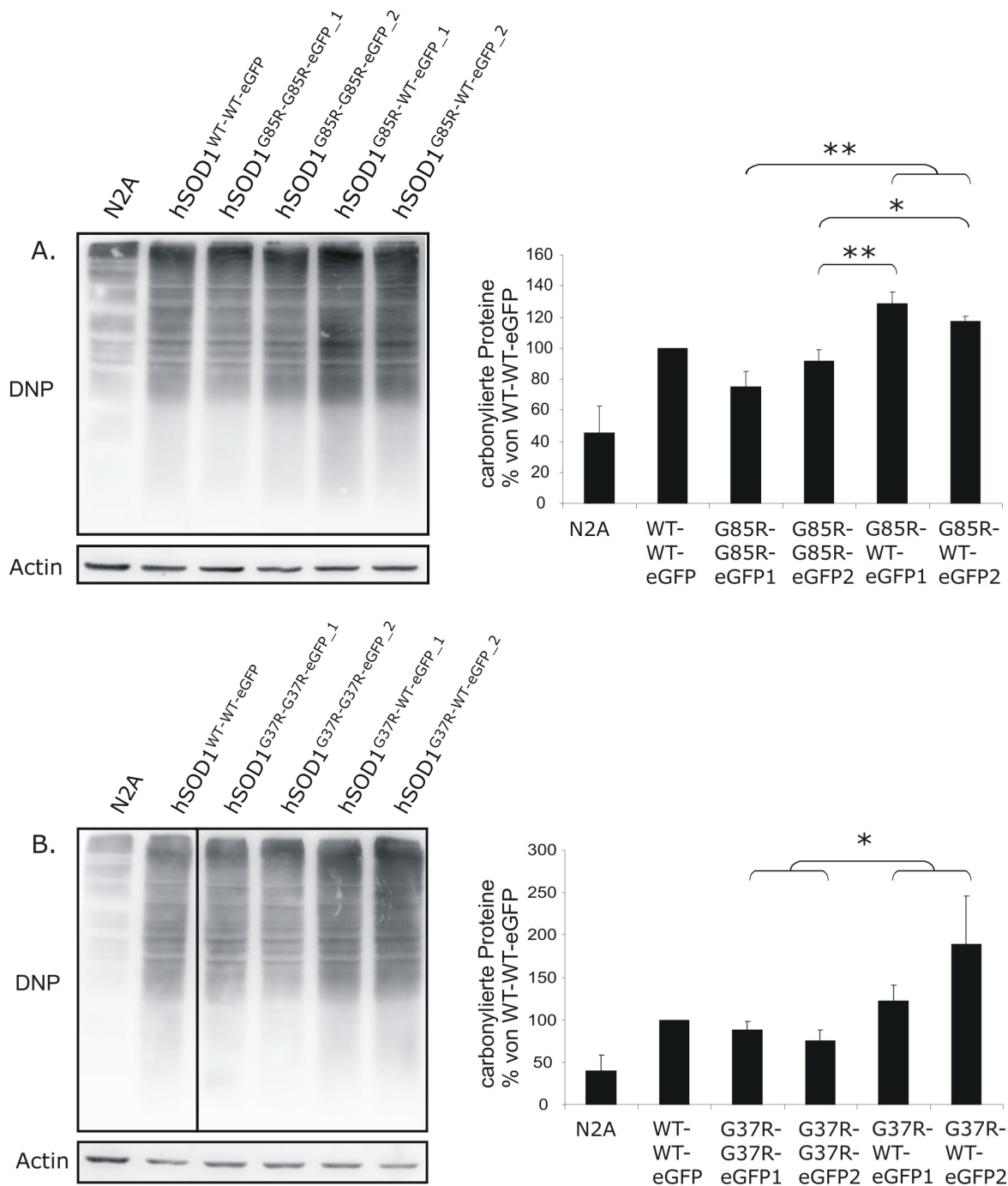


Abbildung 30: In differenzierten hSOD1-Heterodimere stabil exprimierenden N2A-Zellen ist der oxidative Stress erhöht

Extrakte differenzierter, stabil mit hSOD1^{G85R}-Dimer-eGFP (A) bzw. hSOD1^{G37R}-Dimer-eGFP (B) transfizierter N2A-Zellen wurden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) behandelt, um Carbonylgruppen von Proteinen zu derivatisieren. Je 15 µg Zellextrakt wurden auf ein 12 %-iges PAGE-Gel geladen. Die carbonylierten Proteine wurden anhand eines DNP-Antikörpers detektiert. Parallel wurde auf einem weiteren PAGE-Gel die identische Proteinmenge der gleichen Proben geladen, um anhand eines Actin-Antikörpers die Actinspiegel der Zellextrakte zu bestimmen. Die DNP-Proteinbanden wurden densitometrisch vermessen und mit den Actin-Proteinbanden normalisiert. Die durchschnittlichen, prozentual auf hSOD1^{WT-WT}-eGFP normalisierten Anteile carbonylierter Proteine aus drei (A) bzw. vier (B) unabhängigen Experimenten +SEM wurden in einem Graphen dargestellt. (*) über der Klammer stellen die statistische Signifikanz zwischen den mutante Dimere exprimierenden Zellen dar (Zweiseitiger t-Test *p<0,05; **p<0,01).

Anhand eines Assays zur Detektion carbonylierter Proteinreste konnten hier erhöhte oxidative Stressspiegel in Zellen detektiert werden, die Heterodimere aus mutanter und wildtypischer hSOD1 exprimierten. Zellen, die katalytisch inaktive hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-Homodimere exprimierten, wiesen hingegen signifikant niedrigere oxidative Stressspiegel auf, was die Hypothese einer aberranten Enzymaktivität als Ursache der Toxizität der mutanten hSOD1 unterstützt. Allerdings konnten auch in Zellen, die Dismutase-aktive hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}-Homodimere exprimierten, keine erhöhten Carbonylierungsspiegel detektiert werden. Möglicherweise ist das auf eine geringere Stabilität der hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}-Homodimere zurückzuführen, die sich in einem erhöhten Aggregationspotential äußert (siehe Abbildung 27).

3.3. Etablierung eines *C. elegans* Modells

Um neben den gezeigten *in vitro*-Studien die Eigenschaften der verschiedenen hSOD1^{Dimer-eGFP}-Fusionsproteine *in vivo* zu untersuchen, wurden transgene *C. elegans*-Linien generiert. Der Nematode *C. elegans* kann vergleichsweise einfach genetisch verändert werden (Fire 1986). Zudem wurde *C. elegans* bereits als Modellorganismus für altersabhängige neurodegenerative Erkrankungen verwendet (Link 2001; Link 2005; Oeda et al. 2001; Satyal et al. 2000).

3.3.1. Charakterisierung stabil in *C. elegans* exprimierter hSOD1^{Dimer-eGFP}-Fusionsproteine

Eine neuronenspezifische Expression der Konstrukte in *C. elegans* wurde erreicht, indem sie unter der Kontrolle des Promoters des Synaptogyrin-1 Gens (*sng-1*) exprimiert wurden. *Sng-1* codiert für ein ubiquitär in synaptischen Vesikeln exprimiertes integrales Membranprotein, dessen Funktion noch nicht geklärt werden konnte (HUBNER et al. 2002; ZHAO and NONET 2001). Ein *C. elegans* Expressionsvektor, in den der den *sng-1*-Promoter enthaltende 5'-Upstream-Bereich des *sng-1*-Gens über die Restriktionsschnittstellen SalI und BamHI einkloniert worden war, wurde freundlicherweise von Katrin Hüsken (AG Leube,

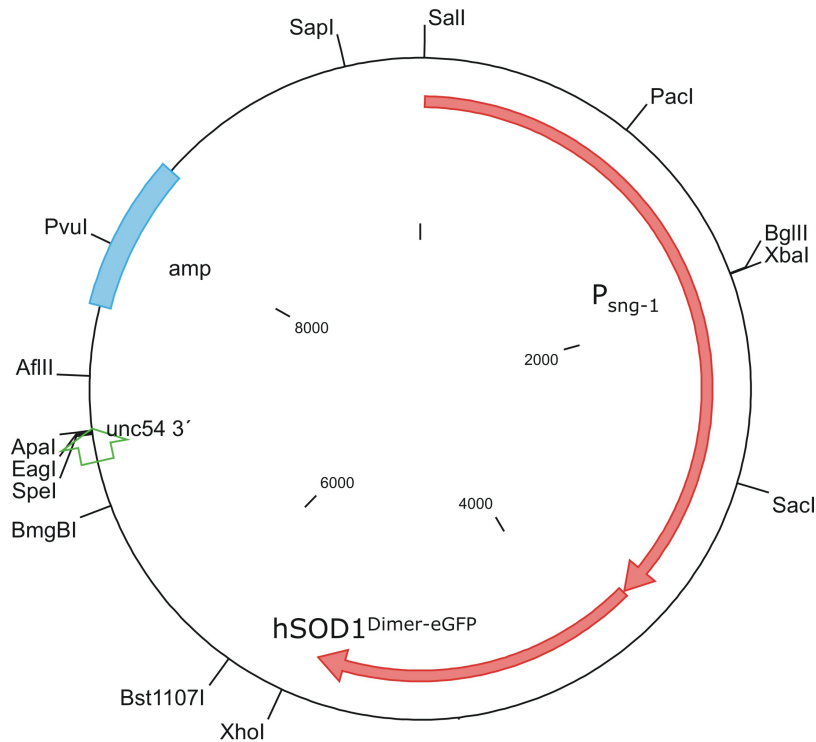


Abbildung 31: Klonierung der Dimerkonstrukte in den *C. elegans*-Expressionsvektor pVH10

Vektorkarte des veränderten Vektors pVH10 (HEATH *et al.* 2004). Der *C. elegans* Synaptogyrin-1-Promoter (P_{sng-1} ; 3579 bp) wurde über die SalI- und die BamHI-Schnittstelle von K. Hüsken (AG Leube, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) einkloniert. Über die BamHI-Schnittstelle wurde anschließend das mit XhoI und dem BamHI-Isoschizomer BglII restringierte hSOD1^{Dimer-eGFP}-Konstrukt (1763 bp) einkloniert, wodurch die BamHI-Schnittstelle verloren ging. Insgesamt bestand der Vektor aus 9631 bp.

Johannes Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Die DNA-Sequenzen der Dimerkonstrukte hSOD1^{WT-WT-eGFP}, SOD1^{G85R-G85R-eGFP}, hSOD1^{G85R-WT-eGFP} und von Mock^{eGFP} wurden anhand von Oligonukleotiden aus den entsprechenden pEGFP-N1 Vektoren amplifiziert (Tabelle 6). Alle vier Konstrukte wurden nach einem Restriktionsverdau mit BglII und XhoI hinter die Promotersequenz in den *C. elegans* Expressionsvektor kloniert (Abbildung 31). Der Expressionsvektor war zuvor mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI geschnitten worden. Da BamHI und BglII Isoschizomere sind, war eine Ligation der mit BglII restringierten DNA-Fragmente mit dem mit BamHI restringierten Vektor möglich. Dieser Schritt war erforderlich, da die Konstrukte eine BamHI-Schnittstelle enthielten. Die die Konstrukte enthaltenden *C. elegans* Expressionsvektoren wurden von Dr. Andreas Kern (AG Behl, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) in die

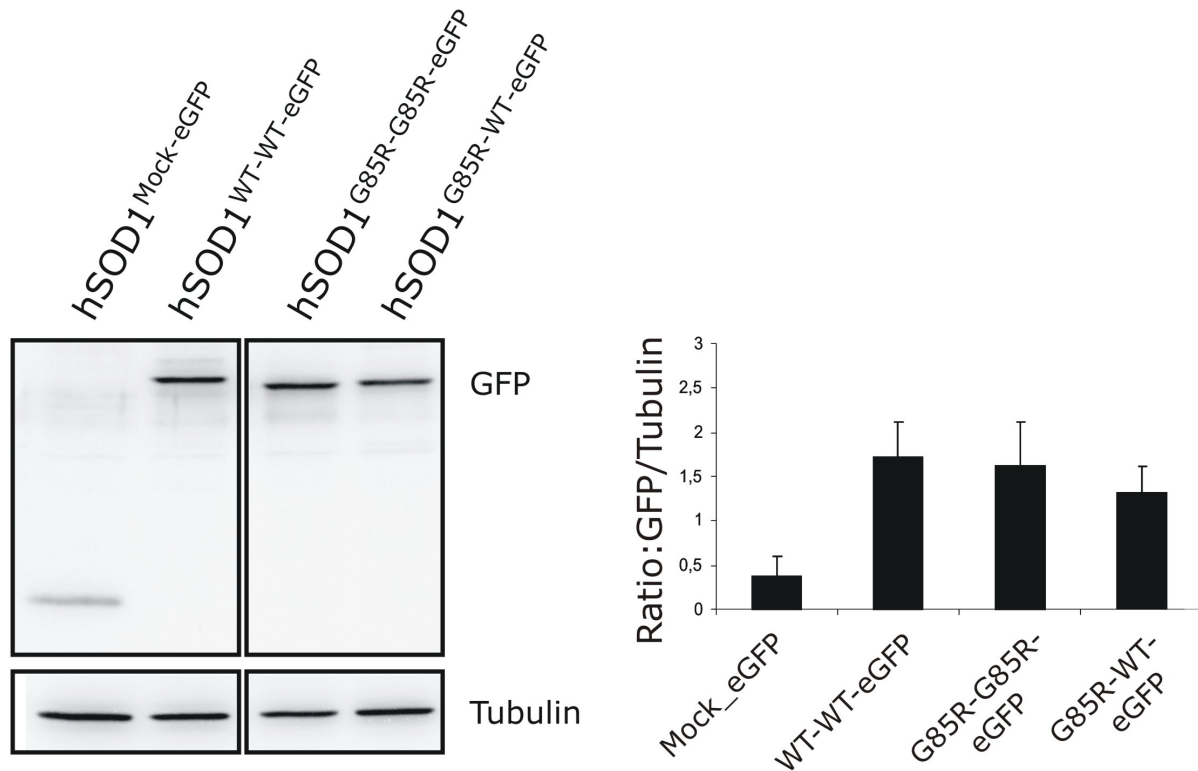


Abbildung 32: Expression der integrierten hSOD1-Konstrukte

Immunblot von *C. elegans*-Proteinextrakten. 10 Nematoden pro Linie wurden in 20 μ l 4x Probenpuffer 2x sonifiziert, aufgekocht und auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen. Die Immundetektion der Fusionsproteine erfolgte anhand eines GFP-Antikörpers. Als Ladekontrolle diente die Immundetektion von Tubulin auf der gleichen Membran. Die GFP-Proteinbanden wurden densitometrisch vermessen und gegen die Tubulin-Banden normalisiert. Der durchschnittliche Quotient der densitometrischen Vermessung der GFP- und Tubulin-Banden \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde in einem Graphen dargestellt.

Gonaden von L4-Hermaphroditen zusammen mit dem Selektionsmarkerplasmid pRF4 (rol6 [su1006dm]) co-injiziert. Alle Nematoden der ersten Filialgeneration (F1), die den Selektionsmarker exprimierten und folglich einen durch mangelnde Kollagensynthese entstehenden *Roller*-Phänotyp aufwiesen, wurden vereinzelt. Sofern Nachkommen der F1-Generation (F2) ebenfalls den *Roller*-Phänotyp zeigten, war eine stabile extrachromosomale Linie etabliert. Die Transgene wurden mit einer Penetranz von 10–90 % vererbt. Um stabil integrierte Linien zu erhalten, wurden L4-Larven der extrachromosomalen Linien mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurden die Nachkommen der bestrahlten Nematoden nach 100 %-igem *Roller*-Anteil selektiert. Zur Eliminierung von UV-bedingten Schädigungen der DNA wurden die stabilen Linien mindestens zweimal mit N2-Männchen ausgekreuzt. Neben einer Mock^{eGFP}- und einer hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierenden

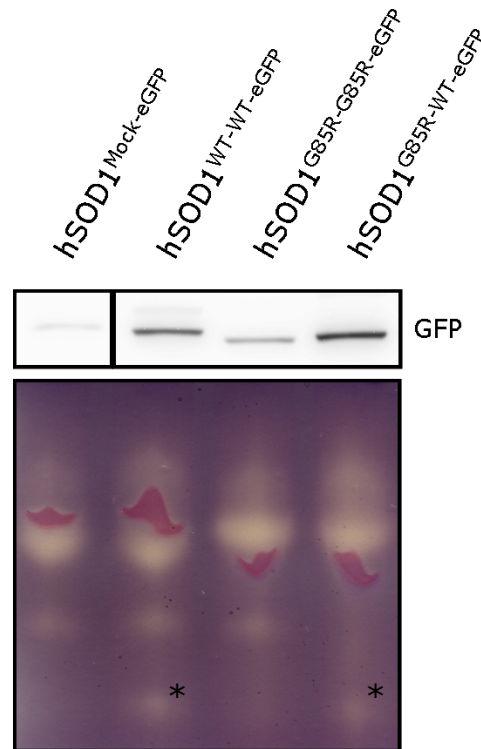


Abbildung 33: Dismutaseaktivität der in *C. elegans* exprimierten Dimer-Proteine

SOD1-Aktivitätsassay von *C. elegans*-Proteinextrakten. Je 60 µg Nematodenlysat wurden auf ein 6 %-iges SOD1-Aktivitätsgel und je 15 µg Nematodenlysat wurden auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen. Die Immundetektion der Fusionsproteine erfolgte anhand eines GFP-Antikörpers. Das Aktivitätsgel zeigte neben endogenen *C. elegans* SOD1-Aktivitätsbanden, die auch bei Mock^{eGFP} auftraten, Aktivitätsbanden, die spezifisch für hSOD1^{WT-WT-eGFP} und hSOD1^{G85R-WT-eGFP} sind (Sternchen).

Linie wurden auf diesem Weg jeweils zwei unabhängige hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}- und hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-exprimierende Linien generiert. Abgesehen von Mock^{eGFP}, das eine wesentlich schwächere Expression aufwies, waren die Expressionsspiegel der verschiedenen Fusionsproteine in etwa vergleichbar (Abbildung 32). Wie bereits bei der transienten Expression der Fusionsproteine in HEK293T-Zellen beobachtet (siehe 3.2.2), wurde auch in *C. elegans* eine Enzymaktivität von hSOD1^{WT-WT-eGFP} und hSOD1^{G85R-WT-eGFP} nachgewiesen, wohingegen weder bei Mock^{eGFP} noch bei hSOD1^{G85R-G85R-eGFP} eine Dismutaseaktivität detektiert wurde (Abbildung 33). Alle stabilen Linien wiesen ein durch den *sng-1*-Promoter kontrolliertes neuronales Expressionsmuster auf (Abbildung 34A). Neben den Neuronen des Nervenrings exprimierten die Neuronen der *Chorda dorsalis* und der *Chorda ventralis* die eGFP-fusionierten Proteine. Die Zellkörper der Motoneuronen der *Chorda ventralis* exprimierten das eGFP der Mock^{eGFP}-transfizierten

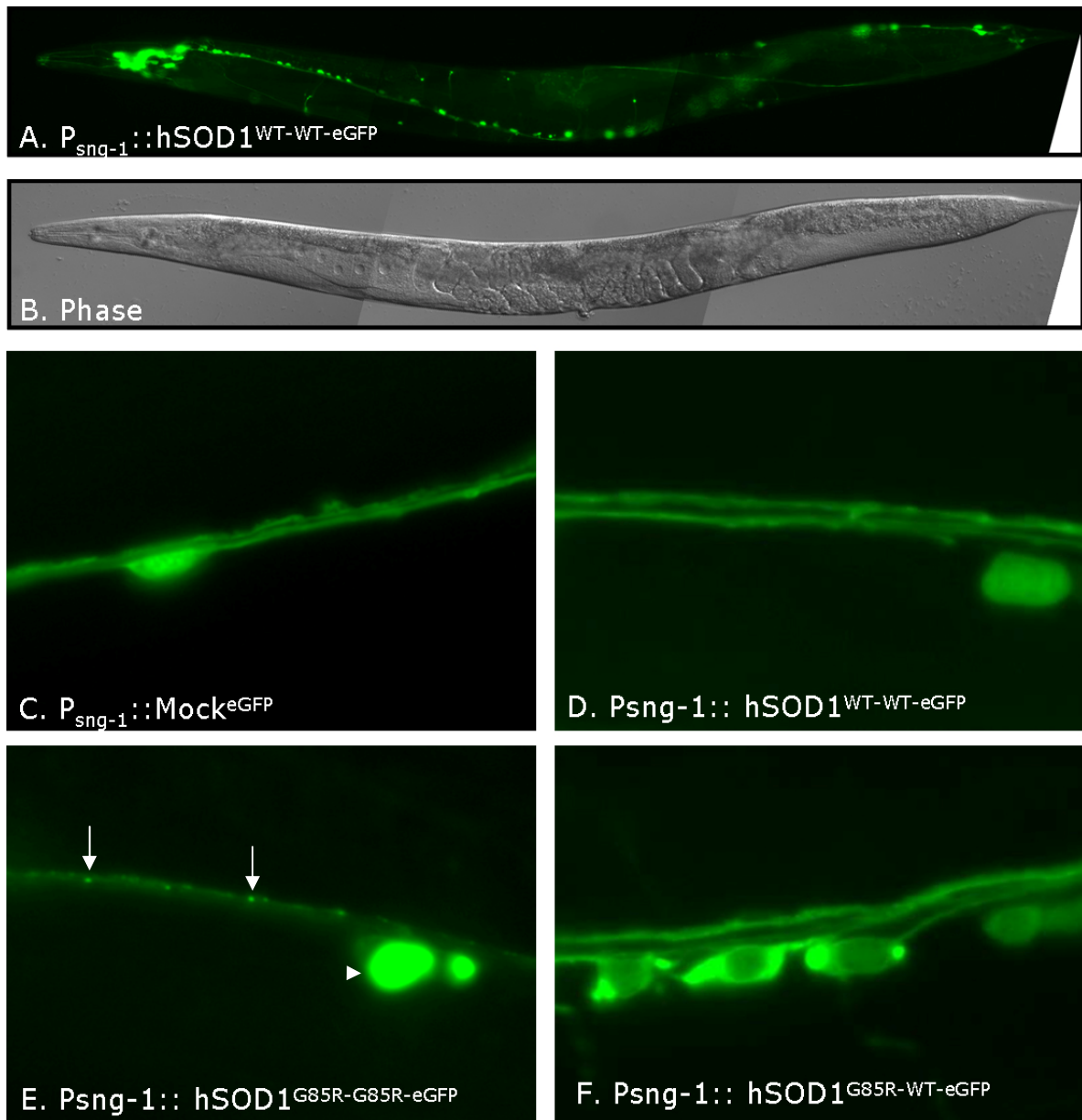


Abbildung 34: Die neuronenspezifische Expression von hSOD1^{G85R-G85R-eGFP} und hSOD1^{G85R-WT-eGFP} führt zu Aggregatbildung in *C. elegans*

Fluoreszenzmikroskopie von stabil in *C. elegans* exprimierten hSOD1^{Dimer-eGFP}-Fusionsproteinen. Die Expression der Konstrukte unter der Kontrolle des *sng-1*-Promoters führte zu einem neuronenspezifischen Expressionsmuster (A). Neben dem Nervenring zeigten die Neuronen der *Chorda dorsalis* und *Chorda ventralis* eine grüne Fluoreszenz. Die Verdrehung der Nematoden kam aufgrund der Expression des *Roller*-Selektionsmarkers zustande (A & B). Fluoreszenzaufnahmen der *Chorda ventralis* zeigten eine homogene Signal von Mock^{eGFP}- (C) und hSOD1^{WT-WT-eGFP}- (D) exprimierenden Motoneuronen, wohingegen die Motoneuronen (Dreieck) und die kleineren Neuronen der *Chorda ventralis* (Pfeile) bei hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-transgenen Nematoden neben einer cytosolischen Expression große aggregatartige Strukturen aufwiesen (E). Ähnliche, jedoch wesentlich kleinere aggregatartige Strukturen wurden in den Motoneuronen hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-transgener Nematoden nachgewiesen (F). Einige Motoneuronen und die kleineren Neuronen entlang der *Chorda ventralis* wiesen keine Aggregate auf; sie zeigten eine homogene Fluoreszenz im Cytosol. (C-F).

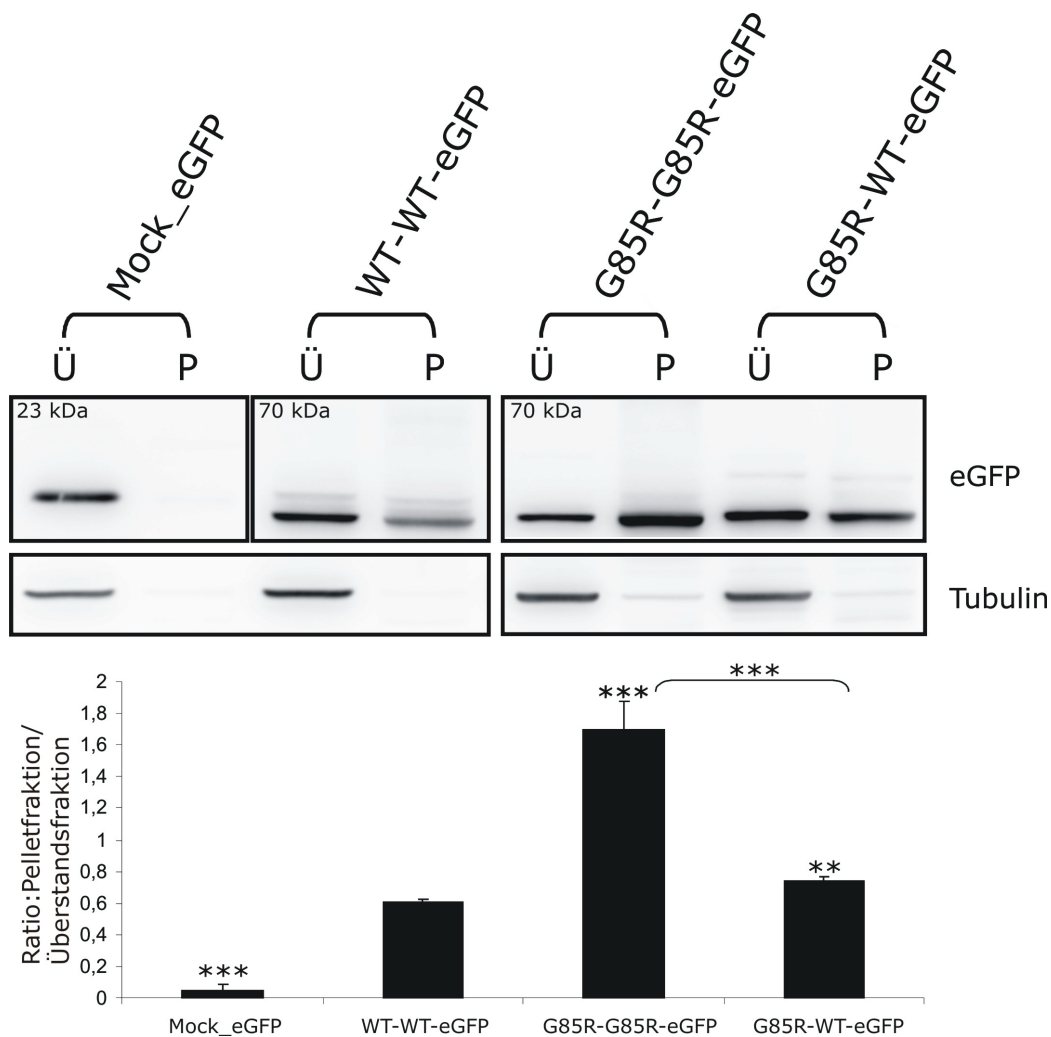


Abbildung 35: hSOD1^{G85R-G85R-eGFP} hat ein erhöhtes Aggregationspotential in *C. elegans*

Differentielle Fraktionierung stabil transfizierter *C. elegans*-Linien. Je 15 µg Überstands- (Ü) bzw. Pelletfraktion (P) wurden auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen. Die Immundetektion der Fusionsproteine erfolgte anhand eines GFP-Antikörpers (oben). Die korrekte Auftrennung in Überstandsfraktion und Pelletfraktion wurde durch eine Immundetektion von Tubulin überprüft. Die gegen die Gesamtproteinmenge normalisierten Proteinbanden wurden densitometrisch vermessen. Der durchschnittliche Quotient aus Pellet- und Überstandsfraktion +SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde in einem Graphen dargestellt (unten). (*) über den Balken repräsentieren die statistische Signifikanz gegenüber hSOD1^{WT-WT-eGFP}, während die (*) über der Klammer die statistische Signifikanz zwischen den beiden mutanten Dimeren darstellen (Zweiseitiger t-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Nematoden sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern (Abbildung 34C). Die hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierende Linie zeigte eine homogene cytoplasmatische Expression des Fusionsproteins. Aggregatähnliche Einschlüsse wurden nicht beobachtet (Abbildung 34D), wohingegen die hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-transgenen Linien zusätzlich zu einem cytoplasmatischen Expressionsmuster sehr große, aggregat-

artige Strukturen aufwiesen. Diese Aggregate wurden sowohl in den Motoneuronen als auch in den kleineren Neuronen entlang der *Chorda dorsalis* detektiert (Abbildung 34E). Auch die hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-transgenen Linien wiesen neben einer cytoplasmatischen Expression aggregatartige Strukturen auf. Allerdings kamen diese Aggregate viel seltener vor und waren kleiner als die der hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-Linien. Zudem waren die Aggregate lediglich in den großen Motoneuronen zu beobachten, nicht jedoch in den kleineren Neuronen entlang der *Chorda dorsalis* (Abbildung 34F). Auch eine differentielle Fraktionierung von Proteinextrakten der *C. elegans*-Linien bestätigte das stark erhöhte Aggregationspotential von hSOD1^{G85R-G85R-eGFP} gegenüber hSOD1^{G85R-WT-eGFP} (Abbildung 35). Überraschenderweise war das Aggregationspotential von hSOD1^{WT-WT-eGFP} nahezu genauso hoch wie das von hSOD1^{G85R-WT-eGFP}, obwohl bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen keine Aggregate detektiert wurden. Das Aggregationspotential der Mock^{eGFP} war erwartungsgemäß sehr niedrig (Abbildung 35).

3.3.2. Funktionelle Analysen

Um zu testen, ob die Expression der unterschiedlichen Fusionsproteine in *C. elegans* eine Neurotoxizität zur Folge hat, wurde das Bewegungsvermögen der transgenen Nematoden untersucht. Der Bewegungsapparat von *C. elegans* wird von über 60 Motoneuronen innerviert, deren funktionelle Beeinträchtigung in einem verminderten Bewegungsvermögen der Nematoden resultiert (WHITE *et al.* 1976). Eine Methode, um das Bewegungsvermögen zu quantifizieren, ist die Bestimmung der Ausschläge des Wurms pro Zeitintervall in einem Tropfen Flüssigkeit. Hierfür wurden die hSOD1^{Dimer-eGFP}-transgenen *C. elegans* in einen isotonischen Puffer überführt. Nach einer einminütigen Regenerationsphase wurden für 30 s alle Ausschläge (von 50 Nematoden pro Linie) gezählt. Der Durchschnittswert der Ausschläge lag bei Mock^{eGFP}- und hSOD1^{WT-WT-eGFP}-transgenen Nematoden bei 68/30 s (100 %; Abbildung 36). Das Bewegungsvermögen von hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-transgenen Nematoden war mit 64/30 s (94 %) nur etwas geringer als bei den Kontrolltieren, wohingegen das Bewegungsvermögen von hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-transgenen Nematoden mit 50/30 s (74 %) deutlich vermindert

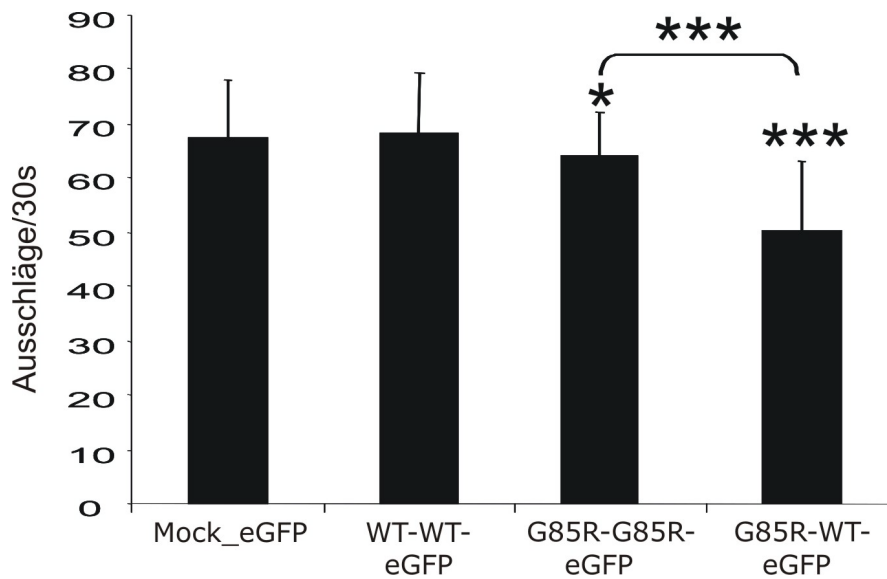


Abbildung 36: Die neuronale Expression von hSOD1^{G85R-WT-eGFP} führt zu einem eingeschränkten Bewegungsvermögen von *C. elegans*

Untersuchung des Bewegungsvermögens von hSOD1^{Dimer-eGFP}-exprimierenden *C. elegans*-Linien in einen Tropfen M9-Puffer. Nach dem Transfer in M9 wurden die Ausschläge der Nematoden innerhalb von 30 s erfasst. Der Durchschnittswert +SEM von 50 L4-Larven pro Linie wurde in einem Graphen dargestellt. (*) über den Balken repräsentieren die statistische Signifikanz mit den hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierenden Nematoden, während die (*) über der Klammer die statistische Signifikanz zwischen den beiden mutante Dimere exprimierenden Nematoden darstellen (Zweiseitiger t-Test * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

war (Abbildung 36). Diese verminderte Bewegungsfähigkeit von hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-transgenen *C. elegans* weist auf eine Schädigung der Motoneurone hin und unterstützt somit die bisher erhobenen Daten über die erhöhte Toxizität von hSOD1^{G85R-WT-eGFP}. Eventuell bedingt durch die geschwächte Motorik war bei den hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-transgenen Nematoden ein Eilegedefekt zu beobachten, an dem innerhalb der reproduktiven Phase etwa 40 % der Würmer starben. Anscheinend war bei diesen Tieren die Innervierung der Eiablagemaschinerie defekt, so dass es zu massiven Eiakkumulationen im Uterus kam und schließlich die Jungtiere im Mutterleib schlüpften ("bag of worms"- Phänotyp). Auch Mock^{eGFP}-, hSOD1^{WT-WT-eGFP}- und hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-transgene Nematoden wiesen einen – jedoch sehr geringen – Eilegedefekt auf, an dem ca. 15 % der Tiere starben (Abbildung 37). Das Auftreten eines derartigen tödlichen Eilegedefekts kann durch Zusatz von FUDR in den NGM-Platten verhindert werden, da FUDR das Schlüpfen von Larven hemmt und somit zu einer Sterilisierung der Nematoden führt (HOSONO 1978; Abbildung 38A). Um zu bestimmen, ob die verschiedenen transgenen Linien unterschiedlich sensitiv gegenüber oxidativem Stress waren,

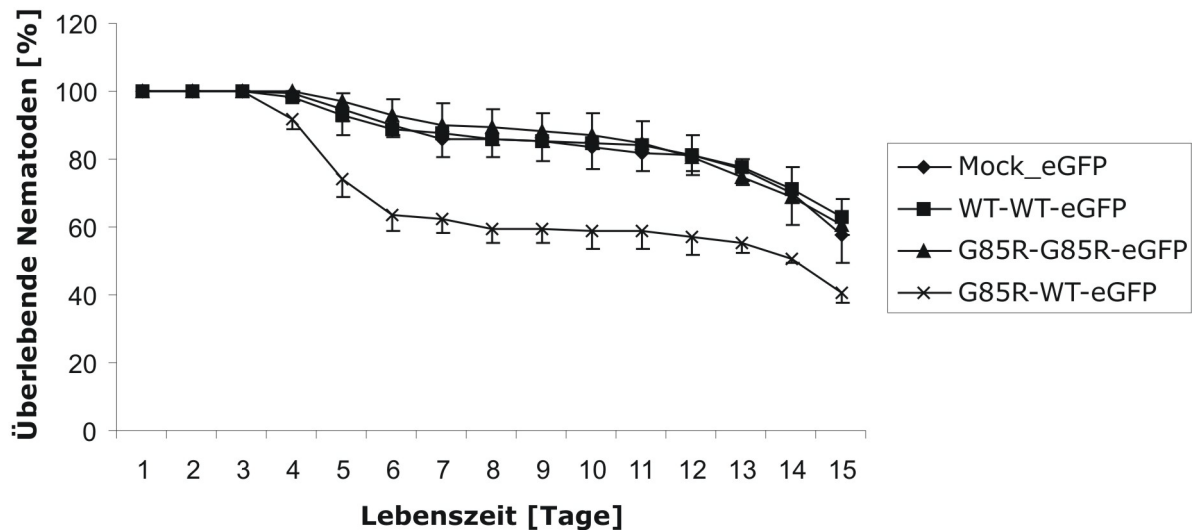


Abbildung 37: hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-transgene Nematoden weisen einen schweren Eilegedefekt auf

Je 30 L4-Larven transgener Nematoden wurden auf NGM-Platten kultiviert. Alle 24 h wurde das Überleben der Nematoden ausgewertet. Mock^{eGFP}-, hSOD1^{WT-WT-eGFP}- und hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-transgene Nematoden wiesen einen leichten Eilegedefekt mit einer Sterblichkeit von 15 % auf, während bei hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-transgenen *C. elegans* ca. 40 % der Tiere an einem Eilegedefekt starben. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

wurde das Überleben von L4-Larven auf FUDR-haltigen Paraquatplatten untersucht. Die Verwendung der FUDR-Platten garantierte, dass ein reduziertes Überleben ausschließlich auf eine Paraquat-abhängige Toxizität zurückzuführen war, und nicht durch die Letalität des Eilegedefekts bedingt wurde. Die Kultivierung von Nematoden auf Paraquat-haltigen NGM-Platten ist eine weit verbreitete Methode, um oxidativen Stress zu untersuchen (OEDA *et al.* 2001; SALINAS *et al.* 2006; VAZQUEZ-MANRIQUE *et al.* 2006). Paraquat ist eine quartäre Ammoniumverbindung, die früher als Kontaktherbizid eingesetzt wurde. Das Paraquatkation nimmt sehr leicht Elektronen der mitochondrialen Elektronentransportkette auf und wird dadurch in das Paraquatradikal umgewandelt, das wiederum sein überschüssiges Elektron unter Bildung von O₂^{•-} auf O₂ überträgt (BUS *et al.* 1974). Da das Paraquatkation durch Aufnahme von Elektronen immer wieder in das Paraquatradikal umgesetzt wird, kommt es zu einer massiven kaskadischen Produktion des zelltoxischen O₂^{•-}. Die Behandlung der verschiedenen transgenen Linien mit Paraquatkonzentrationen von 2,5 mM und 5 mM zeigte eine dosisabhängige

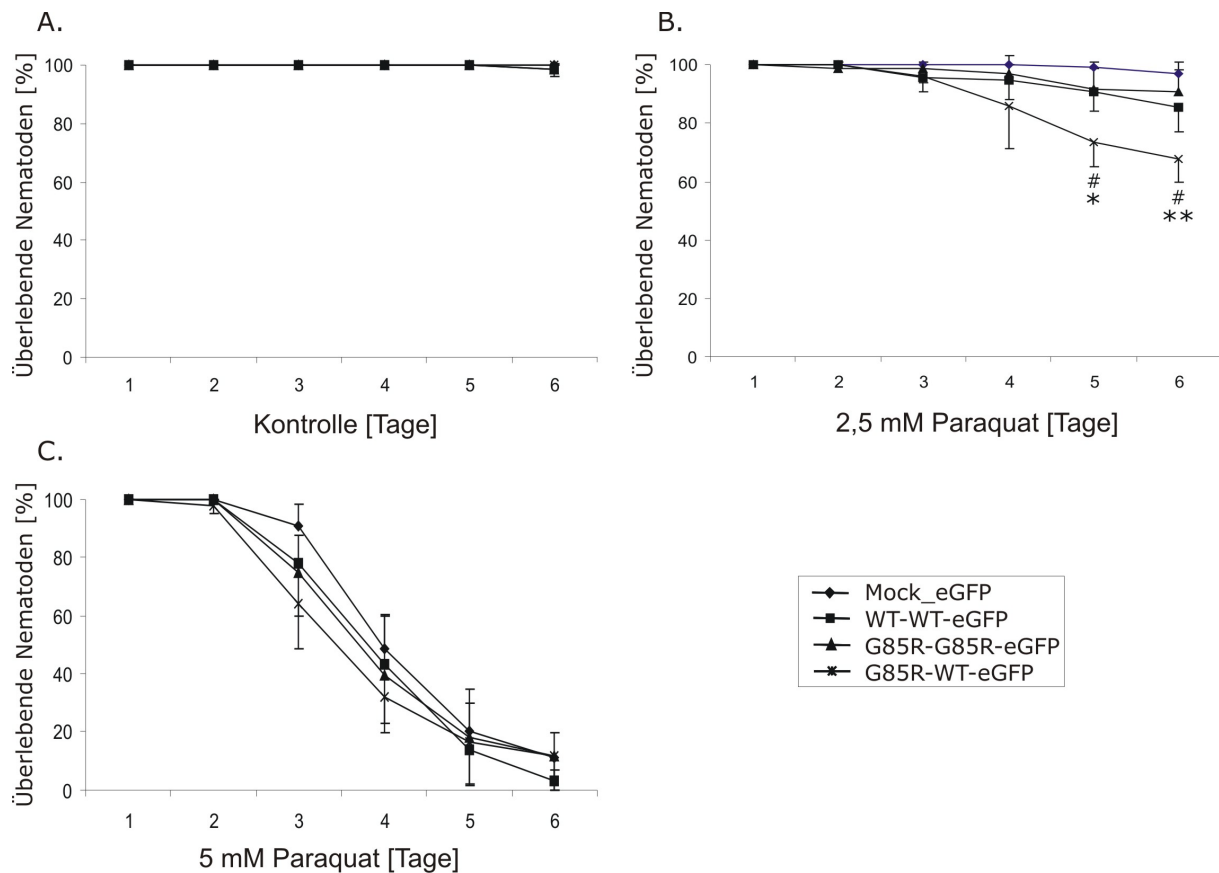


Abbildung 38: $hSOD1^{G85R-WT-eGFP}$ -transgene Nematoden sind sensitiver gegenüber Paraquat-induziertem oxidativen Stress

Je 20 L4-Larven transgener Nematoden wurden auf FUDR-haltige Kontrollplatten (A) und 2,5 mM (B) und 5 mM (C) Paraquatplatten transferiert. Das Überleben der Nematoden wurde sechs Tage lang alle 24 h ausgewertet. Die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten wurden \pm SEM in einem Graphen dargestellt. (#) repräsentiert die statistische Signifikanz gegenüber der $hSOD1^{WT-WT-eGFP}$ -exprimierenden Linie, (*) repräsentiert die statistische Signifikanz gegenüber der $hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}$ -exprimierenden Linie (Zweiseitiger t-Test # p bzw. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Sterblichkeit der Würmer (Abbildung 38B & C). Bei der mit 2,5 mM Paraquat relativ niedrigen Konzentration wurden die Unterschiede der verschiedenen Linien hinsichtlich ihrer Sensitivität am deutlichsten. Am sechsten Behandlungstag waren ca. 33 % der $hSOD1^{G85R-WT-eGFP}$ -transgenen Nematoden gestorben, während die $hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}$ -transgenen Nematoden und die $hSOD1^{WT-WT-eGFP}$ -Linie mit nur 10 % bzw. 15 % Letalität eine signifikant schwächere Sensitivität gegenüber Paraquat aufwiesen (Abbildung 38B). Mit lediglich 3 % Sterblichkeit zeigte die $Mock^{eGFP}$ -exprimierende Linie am sechsten Tag der Behandlung die geringste Sensitivität. Auch bei einer 5 mM Paraquat-Behandlung war die $Mock^{eGFP}$ -exprimierende Linie resistenter gegenüber oxidativem Stress als die $hSOD1^{Dimer-eGFP}$ -transgenen Linien. Die $hSOD1^{G85R-WT-eGFP}$ -transgenen Nematoden

starben tendenziell wieder etwas eher als die $hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}$ -transgenen Nematoden und die $hSOD1^{WT-WT-eGFP}$ -Linie, allerdings waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant (Abbildung 38C). Anscheinend war die 5 mM Paraquatkonzentration zu hoch, um die toxischen Eigenschaften der Transgene unterschiedlich aufzulösen.

Die zuvor in vitro gewonnenen Daten über das Aggregationsverhalten, die Dismutaseaktivität und die Toxizität von mutanter homo- und heterodimerer hSOD1 konnten anhand eines C. elegans-Modellsystems auch in vivo bestätigt werden. Hierfür wurden die Transgene unter der Kontrolle des sng-1-Promoters nahezu pan-neuronal exprimiert. Trotz eines mehr als doppelt so großen Aggregationspotentials der Dismutase-inaktiven $hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}$ -Homodimere im Vergleich zu Dismutase-aktiven $hSOD1^{G85R-WT-eGFP}$ -Heterodimeren konnte anhand eines Verhaltensassays und eines oxidativen Stressassays eine erhöhte Toxizität der $hSOD1^{G85R-WT-eGFP}$ -Heterodimere nachgewiesen werden. Insbesondere eine erhöhte Vulnerabilität der $hSOD1^{G85R-WT-eGFP}$ -transgenen Nematoden gegenüber Paraquat-induziertem oxidativen Stress weist auf eine endogene, oxidativen Stress produzierende Eigenschaft der $hSOD1^{G85R-WT-eGFP}$ -Heterodimere hin.

4. Diskussion

ALS1 ist eine familiäre Form der ALS, bei der die altersabhängige Degeneration von motorischen Neuronen durch unterschiedliche Punktmutationen im Gen der *hsod1* verursacht wird. Da es sich um eine dominant vererbte Erkrankung handelt, besitzen ALS1-Patienten sowohl ein wildtypisches als auch ein mutiertes *hsod1*-Allel. Die *hsod1*-Allele kodieren für die Untereinheiten des Enzyms, die posttranslational zum reifen Enzym dimerisieren (BRIGGS and FEE 1978). Da sich das hSOD1-Enzym aus zwei Untereinheiten zusammensetzt, können bei ALS1-Patienten drei unterschiedliche Varianten des Enzyms gebildet werden (FUKADA *et al.* 2001): Zwei wildtypische Untereinheiten können ein wildtypisches Homodimer ergeben (Abbildung 39A), zwei mutante Untereinheiten können ein mutantes Homodimer bilden (Abbildung 39B) oder eine mutante und eine wildtypische Untereinheit können zu einem mutant-wildtypischen Heterodimer zusammenfinden (Abbildung 39C). Obwohl ein relevanter Anteil der hSOD1-Enzyme von ALS1-Patienten in Form von mutant-wildtypischen Heterodimeren vorliegt (BORCHELT *et al.* 1994), wurde die Involvierung der hSOD1^{WT} in ALS1 bisher nur sehr marginal untersucht. Hinweise, dass hSOD1^{WT} eine wichtige Rolle bei der ALS1-Pathogenese spielen könnte, wurden vor allem anhand der Verpaarung hSOD1^{mut}-überexprimierender Mäuse mit hSOD1^{WT}-überexprimierenden Mäusen gezeigt. Sowohl doppelt-transgene Mäuse, die hSOD1^{G93A} überexprimierten (DENG *et al.* 2006; FUKADA *et al.* 2001; JAARSMA *et al.* 2000) als auch hSOD1^{L126Z}-überexprimierende doppelt-transgene Mäuse zeigten eine signifikante Beschleunigung des Ausbruchs der Krankheit, die mit einer stark verkürzten Lebensspanne einherging (DENG *et al.* 2006). Eine transgene hSOD1^{A4V}-Mauslinie, die keine motoneurodegenerative Krankheit entwickelte (DAL CANTO and GURNEY 1995; GURNEY *et al.* 1994), zeigte erst nach Verpaarung mit den hSOD1^{WT}-exprimierenden Mäusen einen ALS-ähnlichen Phänotyp (DENG *et al.* 2006). Die Verpaarung von Mäusen, die metalldefiziente hSOD1^{G85R} exprimierten, mit hSOD1^{WT}-transgenen Mäusen führte nicht zu einer signifikanten Veränderung im Verlauf der Krankheit (BRUIJN *et al.* 1998). Allerdings ist die hSOD1^{G85R}-transgene Mauslinie sehr variabel hinsichtlich ihrer Lebensspanne (290 bis 480 Tage), so dass eine sehr große Anzahl an Tieren untersucht werden müsste, um signifikante Unterschiede zu zeigen. Trotzdem war zumindest ein Trend ersichtlich, der andeutete, dass die doppelt-

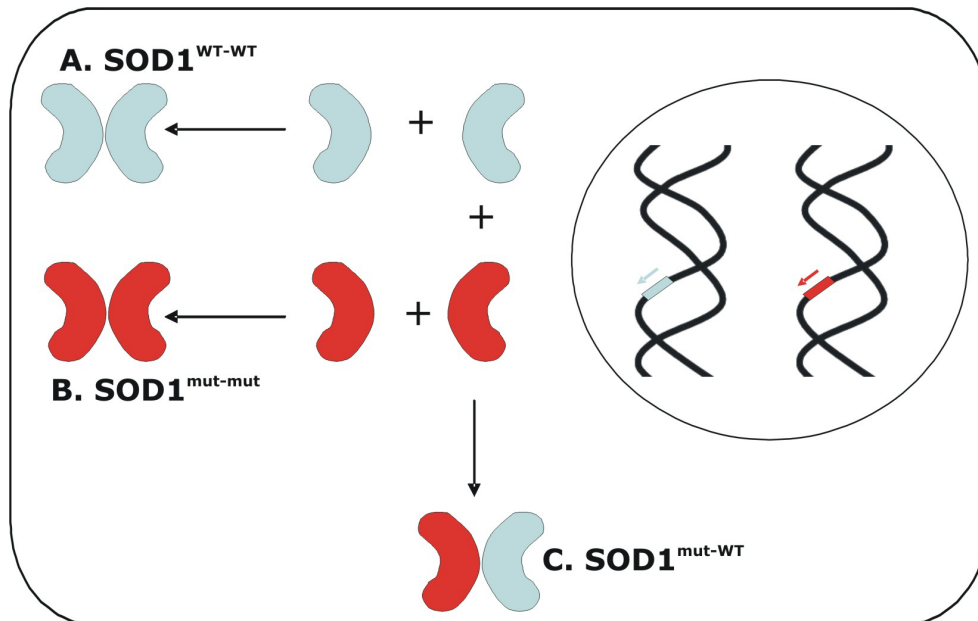


Abbildung 39: In ALS1-Patienten werden drei Varianten dimerer hSOD1 gebildet

Schematische Darstellung der Dimerisierung verschiedener hSOD1-Untereinheiten. Bei ALS1-Patienten wird ein wildtypisches (blau) und ein mutantes (rot) *hsod1*-Allel transkribiert (Pfeile). Wildtypische (blau) und mutante (rot) SOD1-Untereinheiten können, neben wildtypischen (A) oder mutanten (B) Homodimeren, mutant-wildtypische Heterodimere bilden (C).

transgenen Mäuse eine kürzere Lebenszeit aufwiesen als einfach-transgene hSOD1^{G85R}-Mäuse (BRUIJN *et al.* 1998; DENG *et al.* 2006). Eine mögliche Ursache für die beobachtete erhöhte Toxizität in den doppelt-transgenen Mauslinien könnte die verstärkte Bildung mutant-wildtypischer Heterodimere sein. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle von hSOD1^{WT} - vor allem in Heterodimeren mit hSOD1^{mut} - bei der Pathobiochemie von ALS1 zu erforschen.

4.1. Mutante hSOD1 bilden aktive Heterodimere mit hSOD1^{WT}

Aufschluss über die Bildung aktiver Heterodimere von hSOD1^{WT} mit hSOD1^{mut-eGFP} konnte mittels transients Transfektionen in der endogen hSOD1^{WT}-exprimierenden Zelllinie HEK 293T gewonnen werden. Anhand von SOD1-Aktivitätsgelen transfizierter monomerer hSOD1^{mut-eGFP} konnte gezeigt werden, dass aktive Heterodimere von hSOD1^{WT} mit hSOD1^{mut-eGFP} entstehen. Im Gegensatz zu früher erhobenen Daten (BORCHELT *et al.* 1995) zeigte sogar die Kupfermangelmutante hSOD1^{G85R} in Form eines Heterodimers eine - wenn auch vergleichsweise

schwache – Aktivität. Dass es sich tatsächlich um die Aktivität eines Heterodimers von hSOD1^{G85R-eGFP} mit hSOD1^{WT} handelte, konnte durch eine Verstärkung der Aktivität nach einer Co-Transfektion mit unfusionierter hSOD1^{WT} gezeigt werden. Außerdem waren in Mock^{eGFP}-transfizierten Zellen neben der endogenen HEK 293T-hSOD1^{WT} keine weiteren aktiven Proteinspezies detektierbar. In früheren Co-Transfektionsexperimenten von hSOD1^{WT} mit hSOD1^{G85R} in COS-1 Zellen konnten keine aktiven hSOD1^{G85R}-enthaltenden Dimere nachgewiesen werden (BORCHELT *et al.* 1995). Allerdings wurden für diesen Versuchsansatz unfusionierte hSOD1-Monomere verwendet, da die Autoren vermuteten, dass sich die Laufhöhe von hSOD1^{G85R} wegen einer veränderten Ladung der substituierten Aminosäure im Aktivitätsgel deutlich von der Laufhöhe von hSOD1^{WT} unterscheiden müsste. Aufgrund der Fusionierung der hSOD1^{mut}-Monomere mit eGFP konnte die endogene homodimere HEK 293T hSOD1^{WT}-hSOD1^{WT}-Aktivität in dieser Arbeit deutlich von der Aktivität von hSOD1^{mut-eGFP}-hSOD1^{WT}-Heterodimeren oder von hSOD1^{mut-eGFP}-hSOD1^{mut-eGFP}-Homodimeren unterschieden werden. Es wurde somit demonstriert, dass das aktive hSOD1^{G85R-WT}-Heterodimer die gleiche Laufhöhe im nativen Aktivitätsgel besitzt wie das hSOD1^{WT-WT}-Homodimer, was eine Diskriminierung der verschiedenen Aktivitätsspezies nach einer Co-Transfektion unfusionierter hSOD1 unmöglich macht. Diese Beobachtung wird auch durch Daten von WANG und Kollegen unterstützt, die in einem *Westernblot* eines nativen-PAGE-Gels hSOD1^{G85R}-Dimere auf einer Laufhöhe mit hSOD1^{WT}-Dimeren detektierten (WANG *et al.* 2007). Neben den hSOD1-Heterodimeren konnten anhand des Aktivitätsgels homodimere aktive hSOD1-Spezies bei der Transfektion von hSOD1^{WT-eGFP}, hSOD1^{G37R-eGFP} und hSOD1^{G93A-eGFP} nachgewiesen werden, wohingegen keine aktiven hSOD1^{G85R}-hSOD1^{G85R}- und hSOD1^{A4V}-hSOD1^{A4V}-Homodimere detektiert werden konnten. Da die hSOD1^{G85R}-Untereinheit in ihrem aktiven Zentrum kaum Kupfer bindet, und somit keine Dismutaseaktivität besitzt (HAYWARD *et al.* 2002), war zu erwarten, dass ein aus zwei hSOD1^{G85R}-Untereinheiten bestehendes Dimer keine Aktivität aufweist. Das Fehlen aktiver hSOD1^{A4V}-hSOD1^{A4V}-Homodimere überraschte hingegen, da hSOD1^{A4V} als Dismutase-aktive SOD1-Spezies beschrieben ist (BORCHELT *et al.* 1994). Da bei der hSOD1^{A4V}-Mutation jedoch eine Aminosäure in der Dimerisierungsdomäne ausgetauscht ist, wäre eine mögliche Erklärung, dass die Homodimerisierung von hSOD1^{A4V} aufgrund zweier defekter Dimerisierungsdomänen

erschwert wird, wohingegen die Heterodimerisierung mit hSOD1^{WT}, das eine intakte Dimerisierungsdomäne besitzt, leichter möglich sein könnte.

4.2. hSOD1-Dimerfusionsproteine weisen alle Eigenschaften „natürlicherweise“ dimerisierter hSOD1 auf

Bereits anhand des Nachweises unterschiedlicher Aktivitäten von hSOD1^{mut-eGFP}-Heterodimeren im Vergleich zu hSOD1^{mut-eGFP}-Homodimeren nach der Transfektion in HEK 293T-Zellen konnte demonstriert werden, dass es in einem humanen Hintergrund in der Tat zur Bildung verschiedener mutanter hSOD1-Spezies kommt und dass diese unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Um die Charakteristika heterodimerer hSOD1^{mut-wt} im Vergleich zu homodimerer hSOD1^{mut-mut} und hSOD1^{WT-WT} näher zu untersuchen, wurden Fusionsproteine generiert, die aus zwei durch einen flexiblen Peptidlinker (ROBINSON and SAUER 1998) verbundenen SOD1-Monomeren und eGFP bestanden. Eine erste Charakterisierung der Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Aktivität fand durch transiente Expression in HEK 293T-Zellen statt. Mittels SOD1-Aktivitätsassays konnte eine spezifische Dismutaseaktivität nahezu aller Homo- und Heterodimerfusionsproteine nachgewiesen werden; lediglich hSOD1^{G85R-G85R-eGFP} war inaktiv. Mit Ausnahme der Beobachtung, dass hSOD1^{A4V-A4V-eGFP} eine nachweisbare Aktivität aufwies, spiegelten die Aktivitätsgele der Dimerkonstrukte die Ergebnisse der transfizierten Monomerkonstrukte wider. Die Wahrscheinlichkeit der Dimerisierung der beiden hSOD1-Monomere wurde durch deren Verbindung über den Peptidlinker stark erhöht, was die – trotz einer veränderten Struktur der Dimerisierungsdomäne – beobachtete Aktivität von hSOD1^{A4V-A4V-eGFP} erklären könnte. Neben der Aktivitätsbande der endogenen HEK 293T-hSOD1^{WT} wurde bei der nativen Gelelektrophorese lediglich eine weitere Aktivitätsbande detektiert, die das jeweilige funktionelle Dimer repräsentierte. Diese Beobachtung schloss eine Wechselwirkung der Dimerkonstrukte mit endogener hSOD1^{WT} aus, da diese in einer Trimerbande resultieren würde. Auch eine Interaktion mehrerer Dimerkonstrukte miteinander tritt nicht auf, da keine weiteren Aktivitätsbanden beobachtet wurden.

Um Rückschlüsse auf die physiologische Relevanz von hSOD1-Dimeren während der ALS1-Pathogenese ziehen zu können, war es von außerordentlicher Bedeu-

tung, dass die natürliche Faltung und Metallbeladung der Dimerfusionsproteine nicht durch den Peptidlinker oder das eGFP beeinträchtigt wurden. Dies äußerte sich, abgesehen von dem Nachweis der spezifischen Dismutase-aktivität der Dimerkonstrukte, in einem – sowohl in denaturierenden als auch in nativen PAGE-Gelen – vergleichbaren Laufverhalten der Fusionsproteine. Für hSOD1^{G37R-G37R-eGFP} und hSOD1^{G37R-WT-eGFP} konnte in SOD1-Aktivitätsgelen eine verringerte Laufgeschwindigkeit im Vergleich mit hSOD1^{WT-WT-eGFP} gezeigt werden, die konsistent mit zuvor publizierten Daten ist (BORCHELT *et al.* 1995; BORCHELT *et al.* 1994). Dieses veränderte Laufverhalten hängt wahrscheinlich mit der durch die ausgetauschten Aminosäuren veränderten Nettoladung der Proteine zusammen. Diese These wird dadurch unterstützt, dass hSOD1^{G37R-G37R-eGFP} noch etwas langsamer läuft als hSOD1^{G37R-WT-eGFP} (BORCHELT *et al.* 1995). Auf denaturierenden PAGE-Gelen war kein Unterschied im Laufverhalten der hSOD1^{G37R}-Dimere zu beobachten, wohingegen die hSOD1^{G85R}-Dimere im Vergleich mit hSOD1^{WT-WT-eGFP} schneller liefen. Auch hierbei handelt es sich um ein bereits mehrfach publiziertes Phänomen (BORCHELT *et al.* 1995; BORCHELT *et al.* 1994; BRUIJN *et al.* 1998), das durch eine stärkere Entfaltung von hSOD1^{G85R} und einer dadurch bedingten stärkeren SDS-Bindung erklärt werden kann (HAYWARD *et al.* 2002). SDS bindet an die Aminosäurereste der Proteine, so dass stark mit SDS beladene Proteine im denaturierenden PAGE-Gel schneller zur Anode laufen. Auf das Laufverhalten im nativen PAGE-Gel schien die aberrante Struktur der hSOD1^{G85R}-Dimere jedoch keine Auswirkung zu haben, da die Laufhöhe identisch mit der des hSOD1^{WT}-Dimers war. Diese Resultate sind konsistent mit Ergebnissen von WANG und Kollegen, die in einem *Westernblot* eines mit Rückenmarksextrakten hSOD1-transgener Mäuse beladenen nativen PAGE-Gels hSOD1^{WT}- und hSOD1^{G85R}-Homodimere auf einer identischen Laufhöhe detektierten (WANG *et al.* 2007).

Weitere Evidenz, dass der Peptidlinker aufgrund einer hohen Flexibilität kaum mit den natürlichen Eigenschaften der Dimere interferiert, konnte anhand einer Aggregatbildung der mutanten Fusionsproteine gezeigt werden. Das Auftreten von Aggregaten weist auf einen Zerfall des Dimers in seine Untereinheiten hin, da mutante hSOD1 in einem Monomerisierungs-abhängigen Mechanismus aggregiert (RAKHIT *et al.* 2004; RAKHIT *et al.* 2007). Eine Aggregation mutanter hSOD1-Dimere konnte hingegen durch die Stabilisierung der Dimere anhand einer Verbindung der beiden Monomere mit einer intermolekularen Disulfidbrücke verhin-

dert werden (RAY *et al.* 2004). Folglich demonstriert das vorhandene Aggregationspotential der Dimerfusionsproteine, dass die beiden hSOD1-Untereinheiten durchaus dissoziieren und in ihrer monomeren Form aggregieren können.

4.3. Das Aggregationspotential mutanter hSOD1 korreliert nicht mit der Toxizität

Die Bildung unlöslicher Proteinaggregate ist ein bei allen ALS-Formen beschriebenes Phänomen (LEIGH *et al.* 1991; MIGHELI *et al.* 1990; WATANABE *et al.* 2001). Trotz intensiver Forschung konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei den Aggregaten um eine toxische Proteinspezies handelt, ob sie eine neutrale Begleiterscheinung sind, oder ob es sich bei der Aggregatbildung sogar um einen Schutzmechanismus der Zellen handelt, um dem Zellmetabolismus falsch gefaltete Proteine zu entziehen (CAUGHEY and LANSBURY 2003; ROSS and POIRIER 2005). Als besonders aggregationsträchtig werden von vielen Autoren hSOD1^{G85R} und hSOD1^{A4V} beschrieben (TURNER *et al.* 2005; WANG *et al.* 2003), und auch im Rahmen dieser Arbeit wurden stets die höchsten Aggregationspotentiale bei hSOD1^{G85R}- und hSOD1^{A4V}-enthaltenden Fusionsproteinen beobachtet. Zelltoxizitätsassays mit stabil hSOD1^{mut-mut-eGFP}- und hSOD1^{mut-WT-eGFP}-exprimierenden N2A-Linien ergaben eine gleich bleibende (hSOD1^{G37R}), oder sogar eine geringere Toxizität (hSOD1^{G85R}) der stärker aggregierenden Homodimerfusionsproteine im Vergleich zu den weniger aggregationsträchtigen Heterodimerfusionsproteinen. Auch stabil hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-exprimierende *C. elegans*-Linien wiesen im Vergleich mit hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-exprimierenden Linien ein weniger als halb so großes Aggregationspotential auf, zeigten aber in einem Verhaltensassay eine reduzierte Bewegungsfähigkeit. Dieser Phänotyp ist charakteristisch für motoneuronale Defekte (BRIGNULL *et al.* 2006; WHITE *et al.* 1976; WHITE and RAINBOW 1986), wie sie auch in murinen ALS1-Modellsystemen auftreten (BRUIJN *et al.* 1997b; GURNEY *et al.* 1994; WONG *et al.* 1995). Im Vergleich zur hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierenden *C. elegans*-Linie wiesen auch die hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-exprimierenden Linien einen Motordefekt auf; er war jedoch bei den hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-exprimierenden Linien wesentlich stärker ausgeprägt. Weiterhin konnte anhand eines Paraquat-Überlebensassays gezeigt werden, dass die hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-exprimierenden *C. elegans*-Linien sensitiver auf oxidativen Stress reagierten als die

hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-exprimierenden Linien (siehe 4.4.), obwohl diese eine signifikant erhöhte Menge an Proteinaggregaten aufwiesen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aggregations- und Toxizitätsassays konnten also keine Toxizität demonstrieren, die primär auf die Proteinaggregation zurückgeführt werden kann. Diese Beobachtung stellt zahlreiche Publikationen in Frage, die Proteinaggregate als toxische Komponente der ALS-Erkrankung ansehen (DENG *et al.* 2006; MATSUMOTO *et al.* 2005; TURNER *et al.* 2005; WANG *et al.* 2003). Anhand eines Zellkulturmodells konnte ein selektiver Tod von hSOD1^{mut}-Aggregate enthaltenden Zellen gezeigt werden, wohingegen Zellen, die ausschließlich lösliche hSOD1^{mut} exprimierten, größtenteils überlebten (MATSUMOTO *et al.* 2005). Auch die Tatsache, dass sowohl sporadische als auch familiäre ALS-Patienten (LEIGH *et al.* 1991; MIGHELI *et al.* 1990; WATANABE *et al.* 2001), sowie alle einzeln transgenen ALS-Mausmodelle Aggregate ausbilden (BRUIJN *et al.* 1997b; GURNEY *et al.* 1994; STIEBER *et al.* 2000a; WATANABE *et al.* 2001) unterstützt die Aggregat-Toxizitätshypothese. Bei den Aggregaten handelt es sich um eines der wenigen bisher bekannten pathologischen Merkmale, die fALS- und sALS-Fälle miteinander verbinden, wobei für sporadische Fälle nicht notwendig hSOD1 ursächlich ist (BROOM *et al.* 2004; O'REILLY *et al.* 1995; PUYMIRAT *et al.* 1994; ROBBERECHT *et al.* 1994).

Falls die Proteinaggregation die primäre toxische Komponente von ALS1 wäre, sollte die Überexpression von Chaperonen zu einer verminderten Toxizität führen, da sie Proteinen bei ihrer nativen Faltung helfen und die Konformation falsch gefalteter Proteine korrigieren. In der Tat führte die Überexpression des Chaperons Hsp70, das präferentiell an hSOD1^{mut} bindet (OKADO-MATSUMOTO and FRIDOVICH 2002), in Zellkultursystemen zu einer Reduktion der Aggregate und zu einem besseren Zellüberleben (BRUENING *et al.* 1999). Allerdings konnte in hSOD1^{mut}-transgenen Mäusen, die Hsp70 überexprimierten keine Linderung des motoneuronalen Defekts gezeigt werden (LIU *et al.* 2005). Eine starke Unterstützung der Theorie, dass Aggregate nicht primäre Ursache der hSOD1^{mut}-Toxizität sind, wurde erst kürzlich durch die Verpaarung von hSOD1^{G93A}-transgenen Mäusen mit CCS-überexprimierenden Mäusen erbracht. Es konnte gezeigt werden, dass die doppelt-transgenen Mäuse ohne die Bildung von Aggregaten lediglich ca. 50 Tagen überlebten, wohingegen einzeln-transgene hSOD1^{G93A}-Mäuse

erst nach ca. 250 Tagen starben (SON *et al.* 2007). Auch in ALS1-Patienten korreliert das Aggregationspotential der hSOD1^{mut} nicht zwangsläufig mit dem Verlauf der Krankheit. Patienten, die das äußerst aggregationsträchtige hSOD1^{G85R} exprimieren, leben nach Ausbruch der Krankheit beispielsweise noch ca. 6 Jahre, wohingegen Patienten, die die weniger aggregationsträchtige hSOD1^{G93A} exprimieren, durchschnittlich bereits 2,3 Jahre nach Ausbruch der Krankheit sterben (LINDBERG *et al.* 2005).

4.4. Worin besteht die toxische Eigenschaft von hSOD1^{mut-WT}-Heterodimeren?

Die Beobachtung, dass alle mutanten hSOD1-Spezies, die eine Dismutaseaktivität aufwiesen – unabhängig vom Aggregationspotential – eine erhöhte Toxizität hatten (Tabelle 8), weist möglicherweise auf eine veränderte enzymatische Aktivität als toxische Eigenschaft hin. Diese veränderte enzymatische Aktivität könnte zu einer erhöhten Produktion von ROS oder RNS führen. Eine derartige Generierung erhöhter Mengen freier Radikale konnte bereits in früheren Studien für hSOD1^{G93A} und hSOD1^{A4V} gezeigt werden (YIM *et al.* 1997; YIM *et al.* 1996).

Tabelle 8: Dismutaseaktivität, Aggregationsverhalten und Toxizität verschiedener hSOD1-Homo- und Heterodimerfusionsproteine

Fusionsprotein	Dismutaseaktivität	Aggregation in N2A-Zellen / <i>C. elegans</i>	Toxizität in N2A-Zellen / <i>C. elegans</i>
hSOD1 ^{WT-WT-eGFP}	+	-/-	-/-
hSOD1 ^{G37R-G37R-eGFP}	+	+/n. d.	+++ /n. d.
hSOD1 ^{G37R-WT-eGFP}	+	-/n. d.	+++ /n. d.
hSOD1 ^{G85R-G85R-eGFP}	-	++/++	+/+
hSOD1 ^{G85R-WT-eGFP}	+	-/+	+++ /+++

+: vorhanden (zunehmende Anzahl +: stärker vorhanden); -: nicht vorhanden; n. d.: nicht determiniert

Hinweise auf eine aberrante, oxidativen Stress generierende Enzymaktivität mutanter hSOD1-Dimere konnten im Rahmen dieser Arbeit mittels eines *C. elegans*-Modells gewonnen werden: hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-exprimierende *C. elegans*-Linien reagierten signifikant sensitiver auf anhand des Herbizids Paraquat generierten

oxidativen Stress, als die hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-exprimierenden Linien. Mittels zweier unterschiedlicher Paraquat-Konzentrationen (2,5 mM und 5 mM) konnte eine Dosis-abhängige Letalität der verschiedenen Wurmlinien gezeigt werden. Allerdings konnte bei der Paraquat-Konzentration von 5 mM keine spezifische Toxizität von hSOD1^{G85R-WT-eGFP} aufgelöst werden, so dass die Transgen-spezifischen Effekte nur noch tendenziell sichtbar waren. Im Gegensatz dazu war die Transgen-spezifische Vulnerabilität der hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-exprimierenden Linien bei einer Konzentration von 2,5 mM Paraquat optimal auflösbar. Dies weist darauf hin, dass die Transgen-vermittelte Toxizität auf der Generierung von einem zusätzlichen *endogenen* oxidativen Stress beruht, der durch geringe Spiegel eines sekundären oxidativen Stress intensiviert wird. Sobald die Konzentration des sekundären Stress jedoch zu hoch war, wurden auch weniger vulnerable Nematoden – unabhängig von einem endogenen Stress – getötet.

Ein weiterer Hinweis auf eine Transgen-vermittelte Generierung oxidativen Stress wurde anhand eines Carbonylierungsassays mit stabil transfizierten N2A-Zellen erbracht. Der immunbiochemische Nachweis carbonylierter Aminosäurereste ist eine etablierte Methode, um erhöhten zellulären oxidativen Stress zu detektieren (BARREIRO *et al.* 2005; ENGLAND *et al.* 2004; OEDA *et al.* 2001; SELLARES *et al.* 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die stabil hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-exprimierenden Linien im Vergleich mit den hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-exprimierenden Linien einen signifikant erhöhten endogenen Spiegel carbonylierter Proteine aufwiesen. Diese erhöhten basalen Carbonylierungsspiegel weisen auf eine oxidativen Stress generierende toxische Eigenschaft der hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-Heterodimerfusionsproteine hin, die bei hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-Homodimerfusionsproteinen nicht vorhanden ist. Auch bei hSOD1^{G37R-WT-eGFP}-exprimierenden N2A-Zellen wurden erhöhte Spiegel von endogenem oxidativem Stress detektiert, während die oxidativen Stressspiegel von hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}-Homodimere exprimierenden Zellen verglichen mit hSOD1^{WT-WT-eGFP}-exprimierenden Zellen nicht erhöht waren.

Bei den Dismutase-aktive hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}-Homodimere exprimierenden Zellen waren höhere Stressspiegel erwartet worden, um die anhand von Zellüberlebensassays gezeigte identische Toxizität mit hSOD1^{G37R-WT}-Heterodimeren (siehe Tabelle 8) zu erklären. Möglicherweise könnten hier Unterschiede in der Stabilität der Homo- und Heterodimerfusionsproteine eine Rolle spielen. Ein erhöhtes

Aggregationspotential der hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}-Homodimere weist auf eine verminderte Stabilität dieser Proteinspezies hin, da die Aggregation von hSOD1^{mut} ein SOD1-Monomer-abhängiger Prozess ist (RAKHIT *et al.* 2004). Der Nachweis des oxidativen Stresses anhand der Proteincarbonylierung wurde ohne einen sekundären Stress mit Extrakten sechs Tage differenzierter stabiler N2A-Zelllinien erbracht. Bei den Zellüberlebensassays wurde hingegen ein sekundärer Stressor eingesetzt und die Zellen befanden sich insgesamt nur drei Tage in Differenzierungsmedium. Anscheinend führt die längere Differenzierungsdauer der Zellen zu einer größeren Anzahl stabilerer hSOD1^{G37R-WT-eGFP}-Heterodimere, die anhand ihrer aberranten Aktivität ROS generieren können. hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}-Homodimere liegen wahrscheinlich aufgrund ihres erhöhten Aggregationspotentials teilweise als Monomere vor. Da das SOD1-Enzym nur als Dimer funktionell ist (BRIGGS and FEE 1978), verlieren die instabileren hSOD1^{G37R-G37R-eGFP}-Homodimere durch die Aggregation ihre Aktivität und wirken somit in dem vorgeschlagenen Modell nicht mehr toxisch (Abbildung 40A).

Die Beobachtung hoher oxidativer Stressspiegel in N2A-Zellen, die enzymatisch aktive hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-Heterodimere exprimieren, und die vergleichsweise niedrigen oxidativen Stressspiegel von inaktiven hSOD1^{G85R-G85R-eGFP}-Homodimere exprimierenden Zellen, passt zu der Theorie einer erhöhten oxidativen Stressproduktion durch eine veränderte Enzymaktivität. Da das aktive Zentrum der hSOD1^{G85R}-Untereinheit kaum Kupfer binden kann (HAYWARD *et al.* 2002), muss die aberrante Aktivität der hSOD1^{G85R-WT-eGFP}-Heterodimere auf die hSOD1^{WT}-Untereinheit zurückzuführen sein (Abbildung 40B). Möglicherweise beeinflusst die veränderte Konformation der hSOD1^{G85R}-Untereinheit in einem Dimer mit hSOD1^{WT} die strukturelle Integrität der hSOD1^{WT}-Untereinheit, so dass die Selektivität des Enzyms für sein Substrat O₂^{•-} verloren geht. In diesem Fall könnte sich beispielsweise die Peroxidaseaktivität der hSOD1^{WT}-Untereinheit erhöhen (WIEDAU-PAZOS *et al.* 1996; YIM *et al.* 1996), was in verstärkten Nitrotyrosinspiegeln resultieren könnte (BEAL *et al.* 1997; BRUIJN *et al.* 1997a; FERRANTE *et al.* 1997b; HAYWARD *et al.* 2002). Anhand von Strukturanalysen der wildtyp-ähnlichen hSOD1^{A4V} und hSOD1^{I113T} wurden mutationsbedingte Veränderungen in der die Substratspezifität bestimmenden elektrostatischen Schleife (siehe 1.2.1) und

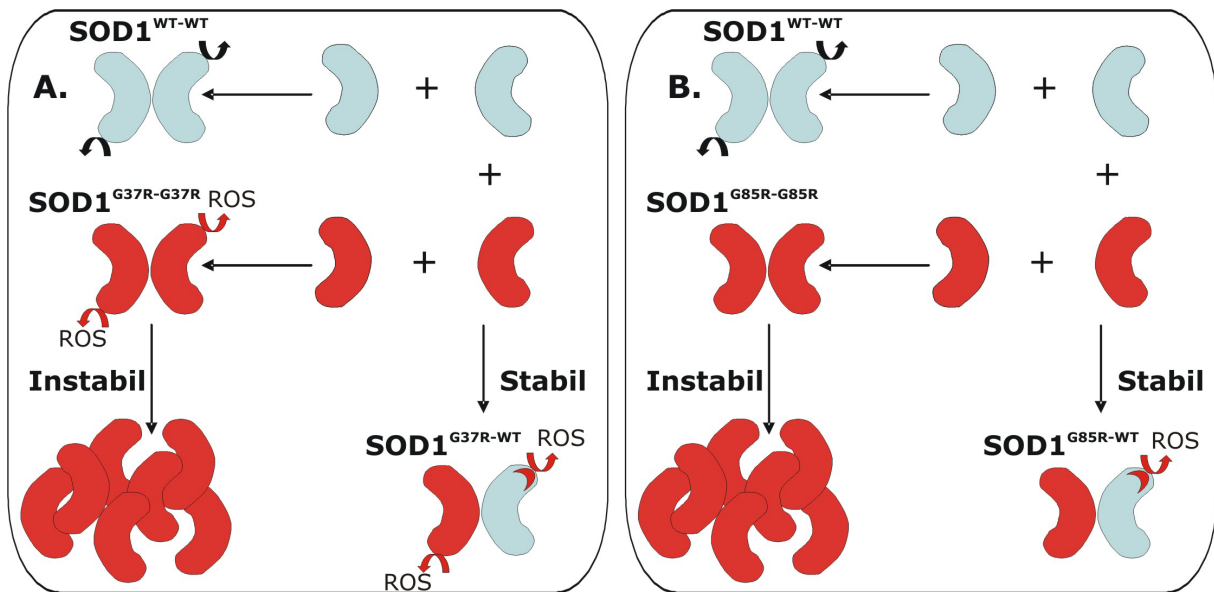


Abbildung 40: Mögliche Beteiligung von hSOD1-Untereinheiten an der ALS-Pathogenese durch eine veränderte enzymatische Aktivität

Die Homodimerisierung von hSOD1^{WT}-Untereinheiten (blau) führt zu einem Dismutase-aktiven (U) SOD1-Enzym. (A) Ein aus zwei aktiven hSOD1^{mut}-Untereinheiten (rot) bestehendes SOD1-Enzym könnte ROS aufgrund einer aberranten Enzymaktivität (U) generieren. Die Aggregation von hSOD1^{G37R-G37R}-Homodimeren führt wahrscheinlich zum Verlust der aberranten Enzymaktivität. Heterodimere aus einer aktiven hSOD1^{G37R}-Untereinheit und hSOD1^{WT} könnten sowohl mit der hSOD1^{G37R}- als auch mit der strukturell veränderten hSOD1^{WT}-Untereinheit ROS generieren. (B) Ein aus zwei inaktiven hSOD1^{G85R}-Untereinheiten bestehendes SOD1-Enzym besitzt keine Enzymaktivität und neigt zur Aggregation. Stabile Heterodimere aus hSOD1^{WT} und einer inaktiven hSOD1^{G85R}-Untereinheit könnten die Struktur der hSOD1^{WT}-Untereinheit verändern, so dass sie aufgrund einer aberranten Enzymaktivität ROS generiert.

der relativen Orientierung der Untereinheit gefunden, wohingegen das aktive Zentrum und die Zinkschleife im Vergleich mit hSOD1^{WT} nicht verändert waren (HOUGH *et al.* 2004).

Ob die Heterodimerisierung von hSOD1^{WT} mit hSOD1^{mut} tatsächlich zu einer derartigen Veränderung der Struktur der hSOD1^{WT}-Untereinheit führt, bleibt vorerst spekulativ. Für andere homodimere Enzyme, wie die Glutathion-S-Transferase A1-1 und die Galacto-1-P-Uridyltransferase, konnte jedoch in mutant-wildtypischen Heterodimeren ein Einfluss der mutanten Untereinheit auf die wildtypische Untereinheit demonstriert werden (CHRISTACOS and FRIDOVICH-KEIL 2002; MISQUITTA and COLMAN 2005). Die Kristallstruktur mutant-wildtypischer Heterodimere der Glutathion-S-Transferase A1-1 zeigte eine strukturelle Interaktion der mutanten mit der wildtypischen Untereinheit, die das aktive Zentrum der wildtypischen Untereinheit veränderte (CHRISTACOS and FRIDOVICH-KEIL 2002).

Somit konnte für dieses Dimer ein dem für hSOD1-Heterodimere vorgeschlagenen Modell sehr ähnlicher Mechanismus nachgewiesen werden.

4.5. Die Rolle von SOD1^{WT} in ALS1-Mausmodellen

Mäuse, die unterschiedliche ALS1-auslösende hSOD1^{mut} überexprimieren sind zurzeit das beste Modell für die Untersuchung der Pathomechanismen von ALS. Die meisten hSOD1^{mut}-transgenen Mauslinien entwickeln eine ALS-ähnliche Pathologie, die mit einer selektiven Degeneration der Motoneuronen des ventralen Horns und einer dadurch verursachten zunehmenden Muskelschwäche einhergeht (BRUIJN *et al.* 1997b; GURNEY *et al.* 1994; WONG *et al.* 1995). Auch histologisch zeigen die transgenen Mäuse klassische ALS-Merkmale, wie die Bildung von Proteinaggregaten (BRUIJN *et al.* 1997b) und eine Vakuolisierung der Mitochondrien (WONG *et al.* 1995). Der Schweregrad der Erkrankung der Mäuse hängt allerdings maßgeblich mit dem Expressionsspiegel der hSOD1^{mut} zusammen. Erst bei einem vierfach höheren Proteinspiegel von hSOD1^{G93A} im Vergleich zu msSOD1^{WT} wurde ein ALS-Phänotyp beschrieben. Mauslinien mit einem niedrigeren hSOD1^{G93A}-Proteinspiegel entwickeln keine oder eine später auftretende Motoneuronenerkrankung (GURNEY *et al.* 1994). Eine derartige Überexpression von mutantern Protein kann natürlich zu Effekten führen, die beim ALS1-Patienten, der meistens eine einzige mutante Genkopie aufweist, nicht vorkommen. Zudem wird die Wahrscheinlichkeit der Aggregatbildung durch eine Überexpressions-bedingte Verstärkung der Proteinkonzentration erhöht (ROSS and POIRIER 2004). Im Menschen sind Krankheitsausbruch und Krankheitsdauer für jede einzelne Mutation relativ konstant; lediglich zwischen den verschiedenen Mutationen gibt es immense Unterschiede hinsichtlich ihrer Krankheitsdauer (LINDBERG *et al.* 2005). Aufgrund der oben erwähnten Abhängigkeit der Schwere des Phänotyps transgener Mäuse von dem Expressionsspiegel des Transgens, spiegelt sich möglicherweise die Schwere der Mutation im Menschen selten in der Schwere der Mutation in der Maus wider. Beispielsweise zeigt hSOD1^{A4V}, eine der im Menschen aggressivsten Mutationen (JUNEJA *et al.* 1997; LINDBERG *et al.* 2005; RATOVITSKI *et al.* 1999; ROSEN *et al.* 1994), in transgenen Mauslinien – eventuell aufgrund zu niedriger Expressionsspiegel – keinen ALS-ähnlichen Phänotyp (DAL CANTO and GURNEY 1995; GURNEY *et al.* 1994).

Anhand mehrerer Versuchsansätze konnte im Rahmen dieser Arbeit demonstriert werden, dass hSOD1^{mut} mit endogen exprimierter hSOD1^{WT} funktionell aktive Dimere bilden kann. Sogar eine inaktive hSOD1^{G85R}-Untereinheit kann durch Dimerisierung mit hSOD1^{WT} in eine aktive hSOD1-Spezies konvertiert werden. Obwohl nachgewiesen wurde, dass die Dimerisierung muriner mit humaner SOD1 möglich ist (ELROY-STEIN *et al.* 1986), bleibt fraglich, wie effizient diese beiden SOD1-Spezies miteinander dimerisieren. Im Fall einer schlechten Dimerisierungseffizienz bzw. der Bildung relativ instabiler murin-humaner SOD1-Dimere würden für einen signifikanten Spiegel heterodimerer SOD1-Spezies in transgenen Mäuse hohe Niveaus der hSOD1^{mut} benötigt. Unter der Prämisse, dass Heterodimere maßgeblich zur Toxizität mutanter hSOD1 beitragen, könnte dies erklären, weshalb bei den herkömmlichen ALS1-Mausmodellen eine vielfache Überexpression des hSOD1^{mut} nötig ist, um den ALS-Phänotyp auszulösen (BRUIJN *et al.* 1997b; WANG *et al.* 2003; WONG *et al.* 1995).

Eine verminderte Heterodimerbildung könnte – neben den oben erwähnten zu niedrigen Proteinspiegeln – auch erklären, warum hSOD1^{A4V}-überexprimierende Mäuse keinen ALS-ähnlichen Phänotyp entwickeln (DAL CANTO and GURNEY 1995; GURNEY *et al.* 1994). Erst nach einer Verpaarung mit hSOD1^{WT}-überexprimierenden Mäusen konnte ein ALS-ähnliches Krankheitsbild gezeigt werden (DENG *et al.* 2006). Die Autoren begründen dies mit einer Oxidation der hSOD1^{WT}, die im Folgenden als toxische Komponente am Aggregationsprozess beteiligt sein könnte. Unter der Annahme, dass aktive, eine aberrante Reaktion katalysierende Dimere die toxische Spezies der ALS1 sind, könnte die gesteigerte Toxizität allerdings auch durch eine erhöhte Heterodimerisierungsfrequenz zwischen hSOD1^{A4V} und hSOD1^{WT} verursacht werden. hSOD1^{A4V} ist aufgrund des an der Dimerisierungsdomäne gelegenen Aminosäureaustausches sehr instabil (HOUGH *et al.* 2004). Es tendiert zu einer Monomerisierung, was sich auch in seinem sehr hohen Aggregationspotential zeigt. Möglicherweise dimerisieren zwei hSOD1^{A4V}-Untereinheiten nur sehr ineffizient miteinander, da bei beiden Untereinheiten die Dimerisierungsdomäne beschädigt ist. Sollte nun die Dimerisierung einer hSOD1^{A4V}-Untereinheit mit beschädigter Dimerisierungsdomäne mit einer völlig intakten hSOD1^{WT}-Untereinheit zu einem stabileren Enzym führen, so würden wahrscheinlich in den doppelt-transgenen Mäusen viel mehr dimere – und folglich enzymatisch aktive – SOD1-Enzyme vorliegen als in den einzeln-transgenen hSOD1^{A4V}-

Mäusen. Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass nach Transfektion von hSOD1^{A4V-eGFP} in einer humanen Zelllinie keine Aktivitätsbande auf Höhe des Homodimers detektiert wurde, wohingegen eine Heterodimer-Aktivitätsbande gezeigt werden konnte. Höchstwahrscheinlich ist das Fehlen einer Homodimer-Aktivitätsbande damit zu erklären, dass keine stabilen hSOD1^{A4V}-hSOD1^{A4V}-Homodimere gebildet wurden. In Aktivitätsgelen der künstlich generierten hSOD1^{A4V-A4V-eGFP}-Dimerkonstrukte wurde eine potentielle SOD1-Aktivität eines hSOD1^{A4V}-Homodimers anhand einer Aktivitätsbande gezeigt. Diese Aktivität kam möglicherweise durch eine, aufgrund des Protein-Linkers bedingte, erhöhte räumliche Nähe der beiden Untereinheiten zustande, die die Wahrscheinlichkeit der Dimerisierung beider Untereinheiten verstärkt. Zumindest für hSOD1^{mut}, die eine verringerte Aktivität besitzen (z. B. hSOD1^{G85R}) oder deren Dimerisierung eingeschränkt ist (z. B. hSOD1^{A4V}), stellen die einfach-transgenen Mäuse folglich kein optimales Modell dar. Des Weiteren ist – nicht nur bei sALS-, sondern auch bei fALS-Patienten – fraglich, inwiefern Umweltfaktoren bei der Krankheitsentwicklung im Menschen eine Rolle spielen. Auch die Physiologie von Mensch und Maus ist, obwohl diese beiden Spezies relativ nah miteinander verwandt sind, nicht einfach aufeinander übertragbar. Vor allem einige klinische Studien mit Substanzen, die in der Maus vielversprechende therapeutische Resultate erbrachten, zeigten im Menschen keinerlei Wirkung (z. B. Nimodipin; TRAYNOR *et al.* 2006).

4.6. Die Beteiligung von hSOD1^{WT} an der Aggregation

Anhand von doppelt-transgenen, hSOD1^{mut}- und hSOD1^{WT}-überexprimierenden Mäusen wurde eine Involvierung von hSOD1^{WT} in die ALS1-Pathogenese demonstriert (DENG *et al.* 2006; FUKADA *et al.* 2001; JAARSMA *et al.* 2000). Neben einer durch die Heterodimerisierung mit mutanten hSOD1-Formen gewonnenen Toxizität von hSOD1^{WT} könnte mit hSOD1^{mut} co-exprimierte hSOD1^{WT} auch als Bestandteil von Aggregaten eine toxische Eigenschaft erlangen (DENG *et al.* 2006). Um eine mögliche Beteiligung von hSOD1^{WT} an der hSOD1^{mut}-abhängigen Aggregation zu untersuchen, wurden Co-Lokalisationsstudien fluoreszenzgekoppelter hSOD1^{mut} und hSOD1^{WT} nach transienter Transfektion in HEK 293T-Zellen durchgeführt. Die gewonnenen Daten zeigten, dass hSOD1^{WT} nicht mit

hSOD1^{mut} co-lokalisierte, wodurch ausgeschlossen wurde, dass hSOD1^{WT} in hSOD1^{mut}-Aggregaten angereichert wird.

Ein vorgeschlagener Mechanismus, wie hSOD1^{WT} zu einer ALS auslösenden Toxizität beitragen könnte, ist dessen oxidationsbedingte Umwandlung in eine aggregationsträchtige Proteinspezies (DENG *et al.* 2006; Ezzi *et al.* 2007). Eine derartige oxidative Modifikation von hSOD1^{WT} wird möglicherweise nicht in unserem Zellkulturmodell repräsentiert, da es sich um transiente Transfektionen handelte und das Zeitintervall nach der Transfektion mit 48 h wahrscheinlich zu kurz war, als dass es zu einer Anreicherung oxidierter hSOD1^{WT} kommen konnte.

Die Aggregationsstudien der Homo- und Heterodimerfusionsproteine wiesen, konsistent mit den Ergebnissen der Co-Transfektion der hSOD1-Monomere, nicht auf eine Aggregationstendenz von hSOD1^{WT} hin. Vielmehr schien die in mutanten hSOD1-Heterodimeren enthaltene hSOD1^{WT} das mutante Protein zu stabilisieren, was sich in signifikant verringerten Aggregationspotentialen der mutanten hSOD1-Heterodimere im Vergleich mit mutanten hSOD1-Homodimeren äußerte. Auch in neuronalen Zellen, die mutante hSOD1-Dimerfusionsproteine stabil exprimierten, konnte anhand eines differentiellen Fraktionierungsassays ein geringeres Aggregationspotential der mutanten Heterodimere gezeigt werden. Diese Beobachtung unterstreicht, dass hSOD1^{WT} auch nach stabiler Expression kein erhöhtes Aggregationspotential aufweist, obwohl oxidative Modifikationen der hSOD1^{WT} durch die stabile Expression möglich sein sollten.

4.7. Relevanz der Ergebnisse

Sowohl die Bildung toxischer Proteinaggregate, als auch eine aberrante Enzymaktivität von hSOD1^{mut} könnte zu den neurotoxischen Pathomechanismen der ALS1 beitragen. Beide Möglichkeiten der Akquirierung toxischer Eigenschaften von hSOD1^{mut} werden kontrovers diskutiert, obwohl sie sich nicht notwendigerweise ausschließen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass zunächst eine veränderte enzymatische Aktivität mutanter hSOD1 zu einer erhöhten ROS-Produktion führt. Ein erhöhter zellulärer ROS-Spiegel könnte anschließend zur

oxidativen Schädigung essentieller Proteine und letztendlich zu deren Aggregation führen.

Die meisten Autoren gehen allerdings von einer primären Aggregattoxizität als Ursache für ALS1 aus. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass es sich bei der Missfaltung von Proteinen um ein Phänomen handelt, das bei allen ALS-Formen, inklusive sALS, vorkommt (BOILLEE *et al.* 2006). Sie stellt somit eine generelle Verbindung zwischen den verschiedenen ALS-Formen dar, ohne dass zwangsläufig ähnliche Genorte mutiert sind. Weiterhin konnte für viele ALS1-auslösenden hSOD1^{mut} gezeigt werden, dass sie aufgrund struktureller Veränderungen eine verstärkte intrinsische Aggregationstendenz besitzen (SHAW and VALENTINE 2007) und dass SOD1-Aggregate bereits vor Beginn der Neurodegeneration vorhanden sind und mit deren Fortschreiten in hSOD1^{mut}-transgenen Mäusen zunehmen (WANG *et al.* 2002).

Ein möglicher Mechanismus, um Aggregation zu initiieren oder zu verstärken wird jedoch auch durch die oxidative Modifikation von Proteinen durch ROS dargestellt. Eine Quelle für ROS bei ALS1 könnte in einer aberranten Enzymaktivität von hSOD1^{mut} bestehen. Bereits mehrfach konnte gezeigt werden, dass hSOD1^{mut} ROS generieren (SAID AHMED *et al.* 2000; YIM *et al.* 1997; YIM *et al.* 1996). Auch erhöhte oxidative Stressspiegel in ALS1-Mausmodellen, sowie im Rückenmark und Motorkortex sporadischer und familiärer ALS-Patienten konnten von unterschiedlichen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (ABE *et al.* 1995; ABE *et al.* 1997; BEAL *et al.* 1997; FERRANTE *et al.* 1997a; FERRANTE *et al.* 1997b; SHAW *et al.* 1995b). Die Hypothese einer aberranten, ROS-generierenden Enzymaktivität von hSOD1^{mut} wurde jedoch durch zwei Versuchsansätze mit transgenen Mausmodellen geschwächt: (1) hSOD1^{G93A}-überexprimierende Mäuse, die defizient für das SOD1-Kupferbeladungsenzym CCS sind, entwickeln einen „normalen“ ALS-Phänotyp (SUBRAMANIAM *et al.* 2002) und (2) hSOD1^{QUAD}-überexprimierende Mäuse, bei denen alle Kupfer koordinierenden Histidinreste der transgenen hSOD1 substituiert sind, weisen trotz einer fehlenden Kupferbindung im aktiven Zentrum einen ALS-Phänotyp auf (WANG *et al.* 2003). Beide Versuchsansätze stellen eine kupferabhängige aberrante SOD1^{mut}-Enzymaktivität in Frage, sie können sie aber auch nicht gänzlich ausschließen: (1) Die Kupferbeladung von hSOD1^{mut} konnte auch durch eine Deletion des *ccs*-Gens nicht komplett verhindert werden.

Immerhin 20 % der normalen Dismutaseaktivität konnte in dem untersuchten Gewebe nachgewiesen werden (BECKMAN *et al.* 1993; SUBRAMANIAM *et al.* 2002). (2) Die hSOD1^{QUAD} wies tatsächlich keine Dismutaseaktivität in den transgenen Mäusen auf. Allerdings kann hier eine Heterodimerisierung des hSOD1^{QUAD}-Monomers mit einem msSOD1^{WT}-Monomer nicht ausgeschlossen werden, was eine enzymatisch aktive SOD1-Spezies zur Folge haben könnte. Ein derartiges Heterodimer aus einer Dismutase-inaktiven mutanten Untereinheit und einer hSOD1^{WT}-Untereinheit konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand eines enzymatisch aktiven hSOD1^{G85R-WT}-Heterodimers gezeigt werden. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Dismutase-aktiven hSOD1^{G85R-WT}-Heterodimere im Vergleich mit Dismutase-inaktiven hSOD1^{G85R-G85R}-Homodimeren eine signifikant höhere Toxizität - trotz einer stark verringerten Aggregationsträchtigkeit - aufwiesen. Möglicherweise übt nur ein sehr geringer Anteil des zellulären hSOD1^{mut}-Spiegels eine neurotoxische Eigenschaft aus (JONSSON *et al.* 2004; WATANABE *et al.* 2007). Gerade dieser geringe Anteil könnte im Fall der hSOD1^{QUAD}-transgenen Mäuse aus enzymatisch aktiven, ROS-generierenden hSOD1^{QUAD}-msSOD1^{WT}-Heterodimeren bestehen und zur Toxizität bzw. zum ALS-Phänotyp beitragen.

Auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson und Huntington wurde anfangs angenommen, dass die toxische Komponente in den histologisch beobachteten hochmolekularen Aggregaten bestehen würde. In letzter Zeit sind jedoch zunehmend Hinweise erbracht worden, dass die tatsächlich toxischen Proteinspezies in der Zelle als lösliche Oligomere vorliegen könnten (HAASS and SELKOE 2007). Diese Beobachtungen deuten eher darauf hin, dass es sich bei der Bildung von Proteinaggregaten um einen Schutzmechanismus der Zelle handelt, um die toxischen Formen unschädlich zu machen (COHEN *et al.* 2006). Auch die in dieser Arbeit erhobenen Daten bezüglich der Toxizität und des Aggregationsverhaltens homo- und heterodimerer hSOD1^{mut} deuten nicht auf eine primäre Toxizität hochmolekularer Proteinaggregate hin. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* war die Toxizität der unterschiedlichen mutanten Dimerfusionsproteine stets mit der Enzymaktivität und nicht mit einem erhöhten Aggregationspotential korreliert. Die hier gewonnenen Daten unterstützen also eindeutig die Hypothese, dass die toxische Eigenschaft mutanter hSOD1 in der Akquirierung einer aberranten Enzymaktivität besteht, die beispielsweise durch eine erhöhte ROS-Produktion die Zelle schädigen und zu neuronaler Degeneration führen könnte.

Die Bildung enzymatisch aktiver, toxischer hSOD1^{mut}-hSOD1^{WT}-Heterodimere könnte in diesem Modell die ROS-produzierende Komponente enzymatisch inaktiver hSOD1^{mut} darstellen. Da erhöhte oxidative Stressspiegel ein gemeinsames Merkmal familiärer und sporadischer ALS-Fälle sind (ABE *et al.* 1995; ABE *et al.* 1997; BEAL *et al.* 1997; FERRANTE *et al.* 1997a; SHAW *et al.* 1995b), könnte auch bei sALS eine ROS-generierende Komponente an den Pathomechanismen der Krankheit beteiligt sein.

4.8. Ausblick

Trotz massiver Anstrengungen konnte bisher keine erfolgreiche Therapie für ALS entwickelt werden, was vor allem auf ein schlechtes Verständnis der komplexen Pathomechanismen der ALS zurückzuführen ist. Folglich ist eine intensive Grundlagenforschung für eine gezielte und erfolgreiche Therapie der Krankheit unerlässlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass vor allem enzymatisch aktive mutante hSOD1-Enzyme eine hohe Toxizität ausüben. Die Korrelation der enzymatischen Aktivität mit der Toxizität der hSOD1-Spezies weist auf eine aberrante, oxidativen Stress produzierende, Aktivität der hSOD1^{mut} hin. Ein möglicher Weg, um oxidativen Schädigungen in ALS-Patienten entgegenzuwirken, wäre eine Behandlung mit hochdosierten Antioxidantien. In der Tat wurde anhand von Antioxidantien wie Vitamin E und AEOL 10150 (ein Manganoporpyrin-Antioxidanz, das O₂⁻, H₂O₂ und Peroxynitrit katalytisch neutralisiert und Lipidperoxidation inhibiert) in hSOD1^{mut}-transgenen Mäusen ein lebensverlängernder Effekt gezeigt (TRAYNOR *et al.* 2006). Bisher wurde im ALS-Patienten von diesen Substanzen lediglich Vitamin E getestet, es konnten jedoch keine therapeutische Wirkung erzielt werden (DESNUELLE *et al.* 2001).

In zukünftigen Studien könnten anhand des in dieser Arbeit etablierten *C. elegans*-Modells weitere, eventuell wirksamere antioxidative Substanzen im Hochdurchsatzverfahren getestet werden. Die vielversprechendsten Substanzen könnten anschließend in transgenen Mäusen in Hinblick auf ihre Wirksamkeit, Verträglichkeit und die Passierbarkeit der Blut-Hirn-Schranke untersucht werden. Die zwischen den etablierten ALS-Mausmodellen und den ALS-Patienten bestehende Diskrepanz hinsichtlich der Effektivität der getesteten Medikamente

könnte eventuell durch neuartige Mausmodelle minimiert werden. Denkbar wäre beispielsweise, dass doppelt-transgene, hSOD1^{mut}- und hSOD1^{WT}-exprimierende Mäuse die Situation im Menschen besser reflektieren als die herkömmlichen einfach transgenen Mausmodelle. Für die detailliertere Untersuchung der Auswirkung homo- und heterodimerer mutanter hSOD1 im Säugersystem könnten transgene, hSOD1^{mut-mut} und hSOD1^{mut-WT}-überexprimierende Mäuse generiert werden. Die strukturellen Unterschiede zwischen homo- und heterodimerer mutanter hSOD1 könnten mittels kristallographischer Analyse nach einer Expression in Insektenzellen näher charakterisiert werden. Weiterhin könnten mögliche aberrante Enzymaktivitäten und die Substratspezifität anhand aufgereinigter Dimerisationsproteine untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Bei der amyotrophen Lateralsklerose 1 (ALS1) handelt es sich um eine altersabhängige Motoneuronenerkrankung, die durch Mutationen im Gen der Cu/Zn-Superoxid Dismutase (hSOD1^{mut}) ausgelöst wird. Die toxischen Eigenschaften von hSOD1^{mut} (z. B. Aggregations- oder oxidative Stress-Hypothese) und der Einfluss wildtypischer hSOD1 (hSOD1^{WT}) auf den Krankheitsverlauf sind weithin ungeklärt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von hSOD1^{mut}-hSOD1^{WT}-Heterodimeren im Vergleich zu mutanten Homodimeren auf die Pathogenese der ALS1 zu untersuchen. Nachdem gezeigt werden konnte, dass es in humanen Zellen in der Tat zu einer Bildung hetero- und homodimerer mutanter hSOD1-Spezies kommt, wurden Dimerfusionsproteine aus zwei hSOD1-Monomeren generiert, die durch einen flexiblen Peptidlinker verbunden und C-terminal mit eGFP markiert waren. Neben hSOD1^{WT-WT} wurden hSOD1^{mut-mut}- und hSOD1^{mut-WT}-Dimere mit vier verschiedenen hSOD1-Mutanten untersucht. Die biochemische Charakterisierung zeigte, dass alle Dimere, die wildtyp-ähnliche hSOD1^{mut} enthielten, eine Dismutaseaktivität aufwiesen. Im Gegensatz dazu war das Homodimer aus zwei metalldefizienten hSOD1^{G85R} inaktiv, wobei interessanterweise hSOD1^{G85R} mit hSOD1^{WT} ein Dismutase-aktives Dimer bilden konnte. Sowohl in Zellkultursystemen als auch in einem *C. elegans*-Modell bildeten alle mutanten Homodimere vermehrt Aggregate im Vergleich zu den dazugehörigen Heterodimeren. Dieses Aggregationsverhalten korrelierte aber nicht mit der Toxizität der Dimerproteine in Überlebensassays und einer *C. elegans* Bewegungsanalyse. In diesen funktionellen Studien assoziierte die Toxizität der dimeren Fusionsproteine mit der enzymatischen Aktivität. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass hSOD1^{WT} nicht in hSOD1^{mut}-abhängigen Aggregaten vorkommt.

Die Ergebnisse dieser Studie sprechen gegen die Aggregation als primäre toxische Eigenschaft der hSOD1^{mut} und unterstützen die oxidative Stress-Hypothese. Dismutase-inaktive hSOD1^{mut} können eine untypische Enzymaktivität durch die Heterodimerisierung mit hSOD1^{WT} erlangen, die auf diese Weise maßgeblich an der Pathogenese der ALS1 beteiligt sein könnte.

6. Literaturverzeichnis

- ABALKHAIL, H., J. MITCHELL, J. HABGOOD, R. ORRELL and J. DE BELLEROCHE, 2003 A new familial amyotrophic lateral sclerosis locus on chromosome 16q12.1-16q12.2. *Am J Hum Genet* **73**: 383-389.
- ABE, K., L. H. PAN, M. WATANABE, T. KATO and Y. ITOYAMA, 1995 Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* **199**: 152-154.
- ABE, K., L. H. PAN, M. WATANABE, H. KONNO, T. KATO *et al.*, 1997 Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* **19**: 124-128.
- AFIFI, A. K., F. P. ALEU, J. GOODGOLD and B. MACKAY, 1966 Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **16**: 475-481.
- ALEXIANU, M. E., B. K. HO, A. H. MOHAMED, V. LA BELLA, R. G. SMITH *et al.*, 1994 The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **36**: 846-858.
- ANDERSEN, P. M., 2000 Genetic factors in the early diagnosis of ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **1 Suppl 1**: S31-42.
- ANKENY, R. A., 2001 The natural history of *Caenorhabditis elegans* research. *Nat Rev Genet* **2**: 474-479.
- AZZOUZ, M., A. HOTTINGER, J. C. PATERNA, A. D. ZURN, P. AEBISCHER *et al.*, 2000 Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum Mol Genet* **9**: 803-811.
- BANNISTER, W. H., J. V. BANNISTER, D. BARRA, J. BOND and F. BOSSA, 1991 Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radic Res Commun* **12-13 Pt 1**: 349-361.
- BARBER, S. C., R. J. MEAD and P. J. SHAW, 2006 Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* **1762**: 1051-1067.
- BARREIRO, E., J. GEA, G. MATAR and S. N. HUSSAIN, 2005 Expression and carbonylation of creatine kinase in the quadriceps femoris muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**: 636-642.
- BEAL, M. F., R. J. FERRANTE, S. E. BROWNE, R. T. MATTHEWS, N. W. KOWALL *et al.*, 1997 Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **42**: 644-654.
- BECKMAN, J. S., M. CARSON, C. D. SMITH and W. H. KOPPENOL, 1993 ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* **364**: 584.

- BECKMAN, J. S., A. G. ESETVEZ, L. BARBEITO and J. P. CROW, 2002 CCS knockout mice establish an alternative source of copper for SOD in ALS. *Free Radic Biol Med* **33**: 1433-1435.
- BEHL, C., J. B. DAVIS, R. LESLEY and D. SCHUBERT, 1994 Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **77**: 817-827.
- BENDOTTI, C., M. TORTAROLO, S. K. SUCHAK, N. CALVARESI, L. CARVELLI *et al.*, 2001 Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J Neurochem* **79**: 737-746.
- BERGEMALM, D., P. A. JONSSON, K. S. GRAFFMO, P. M. ANDERSEN, T. BRANNSTROM *et al.*, 2006 Overloading of stable and exclusion of unstable human superoxide dismutase-1 variants in mitochondria of murine amyotrophic lateral sclerosis models. *J Neurosci* **26**: 4147-4154.
- BEVIS, B. J., and B. S. GLICK, 2002 Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* **20**: 83-87.
- BEZZI, P., M. DOMERCQ, L. BRAMBILLA, R. GALLI, D. SCHOLS *et al.*, 2001 CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* **4**: 702-710.
- BIRNBOIM, H. C., and J. DOLY, 1979 A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- BOILLEE, S., C. VANDE VELDE and D. W. CLEVELAND, 2006 ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* **52**: 39-59.
- BORCHELT, D. R., M. GUARNIERI, P. C. WONG, M. K. LEE, H. S. SLUNT *et al.*, 1995 Superoxide dismutase 1 subunits with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis do not affect wild-type subunit function. *J Biol Chem* **270**: 3234-3238.
- BORCHELT, D. R., M. K. LEE, H. S. SLUNT, M. GUARNIERI, Z. S. XU *et al.*, 1994 Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8292-8296.
- BORDO, D., K. DJINOVIC and M. BOLOGNESI, 1994 Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase family. *J Mol Biol* **238**: 366-386.
- BOWLING, A. C., E. E. BARKOWSKI, D. MCKENNA-YASEK, P. SAPP, H. R. HORVITZ *et al.*, 1995 Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **64**: 2366-2369.
- BRENNER, S., 1974 The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- BRIGGS, R. G., and J. A. FEE, 1978 Further characterization of human erythrocyte superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* **537**: 86-99.

- BRIGNULL, H. R., F. E. MOORE, S. J. TANG and R. I. MORIMOTO, 2006 Polyglutamine proteins at the pathogenic threshold display neuron-specific aggregation in a pan-neuronal *Caenorhabditis elegans* model. *J Neurosci* **26**: 7597-7606.
- BROOKS, B. R., 1994 El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci* **124 Suppl**: 96-107.
- BROOM, W. J., M. J. PARTON, C. A. VANCE, C. RUSS, P. M. ANDERSEN *et al.*, 2004 No association of the SOD1 locus and disease susceptibility or phenotype in sporadic ALS. *Neurology* **63**: 2419-2422.
- BRUENING, W., J. ROY, B. GIASSON, D. A. FIGLEWICZ, W. E. MUSHYNSKI *et al.*, 1999 Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **72**: 693-699.
- BRUIJN, L. I., M. F. BEAL, M. W. BECHER, J. B. SCHULZ, P. C. WONG *et al.*, 1997a Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7606-7611.
- BRUIJN, L. I., M. W. BECHER, M. K. LEE, K. L. ANDERSON, N. A. JENKINS *et al.*, 1997b ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* **18**: 327-338.
- BRUIJN, L. I., M. K. HOUSEWEART, S. KATO, K. L. ANDERSON, S. D. ANDERSON *et al.*, 1998 Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* **281**: 1851-1854.
- BUS, J. S., S. D. AUST and J. E. GIBSON, 1974 Superoxide- and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **58**: 749-755.
- CARRIEDO, S. G., H. Z. YIN and J. H. WEISS, 1996 Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci* **16**: 4069-4079.
- CASARENO, R. L., D. WAGGONER and J. D. GITLIN, 1998 The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* **273**: 23625-23628.
- CAUGHEY, B., and P. T. LANSBURY, 2003 Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* **26**: 267-298.

- CELIO, M. R., 1990 Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* **35**: 375-475.
- CHANG, L. Y., J. W. SLOT, H. J. GEUZE and J. D. CRAPO, 1988 Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol* **107**: 2169-2179.
- CHOI, D. W., 1987 Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* **7**: 369-379.
- CHRISTACOS, N. C., and J. L. FRIDOVICH-KEIL, 2002 Impact of patient mutations on heterodimer formation and function in human galactose-1-P uridylyltransferase. *Mol Genet Metab* **76**: 319-326.
- CHUNG, M. J., and Y. L. SUH, 2002 Ultrastructural changes of mitochondria in the skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastruct Pathol* **26**: 3-7.
- CLARK, L. N., P. POORKAJ, Z. WSZOLEK, D. H. GESCHWIND, Z. S. NASREDDINE *et al.*, 1998 Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13103-13107.
- CLEVELAND, D. W., and J. D. ROTHSTEIN, 2001 From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* **2**: 806-819.
- COHEN, E., J. BIESCHKE, R. M. PERCIAVALLE, J. W. KELLY and A. DILLIN, 2006 Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* **313**: 1604-1610.
- CRAPO, J. D., J. M. MCCORD and I. FRIDOVICH, 1978 Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods Enzymol* **53**: 382-393.
- CRAPO, J. D., T. OURY, C. RABOUILLE, J. W. SLOT and L. Y. CHANG, 1992 Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10405-10409.
- CROW, J. P., J. B. SAMPSON, Y. ZHUANG, J. A. THOMPSON and J. S. BECKMAN, 1997 Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J Neurochem* **69**: 1936-1944.
- CUDD, A., and I. FRIDOVICH, 1982 Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem* **257**: 11443-11447.
- CULOTTA, V. C., L. W. KLOMP, J. STRAIN, R. L. CASARENO, B. KREMS *et al.*, 1997 The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **272**: 23469-23472.

- CURTIS, D. R., and R. MALIK, 1985 A neurophysiological analysis of the effect of kainic acid on nerve fibres and terminals in the cat spinal cord. *J Physiol* **368**: 99-108.
- DAL CANTO, M. C., and M. E. GURNEY, 1995 Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res* **676**: 25-40.
- DAMIANO, M., A. A. STARKOV, S. PETRI, K. KIPIANI, M. KIAEI *et al.*, 2006 Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem* **96**: 1349-1361.
- DENG, H. X., Y. SHI, Y. FURUKAWA, H. ZHAI, R. FU *et al.*, 2006 Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7142-7147.
- DESNUELLE, C., M. DIB, C. GARREL and A. FAVIER, 2001 A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **2**: 9-18.
- DHAUNSI, G. S., S. GULATI, A. K. SINGH, J. K. ORAK, K. ASAYAMA *et al.*, 1992 Demonstration of Cu-Zn superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. Biochemical and immunochemical evidence. *J Biol Chem* **267**: 6870-6873.
- DOUCETTE, P. A., L. J. WHITSON, X. CAO, V. SCHIRF, B. DEMELER *et al.*, 2004 Dissociation of human copper-zinc superoxide dismutase dimers using chaotrope and reductant. Insights into the molecular basis for dimer stability. *J Biol Chem* **279**: 54558-54566.
- DUPUIS, L., F. DI SCALA, F. RENE, M. DE TAPIA, H. OUDART *et al.*, 2003 Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *Faseb J* **17**: 2091-2093.
- DURHAM, H. D., J. ROY, L. DONG and D. A. FIGLEWICZ, 1997 Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**: 523-530.
- ECHANIZ-LAGUNA, A., J. ZOLL, F. RIBERA, C. TRANCHANT, J. M. WARTER *et al.*, 2002 Mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of ALS patients. *Ann Neurol* **52**: 623-627.
- ELROY-STEIN, O., Y. BERNSTEIN and Y. GRONER, 1986 Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *Embo J* **5**: 615-622.
- ENGLAND, K., C. O'DRISCOLL and T. G. COTTER, 2004 Carbonylation of glycolytic proteins is a key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Death Differ* **11**: 252-260.

- ESTEVEZ, A. G., J. P. CROW, J. B. SAMPSON, C. REITER, Y. ZHUANG *et al.*, 1999 Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* **286**: 2498-2500.
- EZZI, S. A., M. URUSHITANI and J. P. JULIEN, 2007 Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J Neurochem*.
- FABER, P. W., C. VOISINE, D. C. KING, E. A. BATES and A. C. HART, 2002 Glutamine/proline-rich PQE-1 proteins protect *Caenorhabditis elegans* neurons from huntingtin polyglutamine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 17131-17136.
- FERRANTE, R. J., S. E. BROWNE, L. A. SHINOBU, A. C. BOWLING, M. J. BAIK *et al.*, 1997a Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **69**: 2064-2074.
- FERRANTE, R. J., L. A. SHINOBU, J. B. SCHULZ, R. T. MATTHEWS, C. E. THOMAS *et al.*, 1997b Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Ann Neurol* **42**: 326-334.
- FIRE, A., 1986 Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* **5**: 2673-2680.
- FRAY, A. E., P. G. INCE, S. J. BANNER, I. D. MILTON, P. A. USHER *et al.*, 1998 The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* **10**: 2481-2489.
- FRIDOVICH, I., 1986 Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **58**: 61-97.
- FRIDOVICH, I., 1989 Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* **264**: 7761-7764.
- FUKADA, K., S. NAGANO, M. SATOH, C. TOHYAMA, T. NAKANISHI *et al.*, 2001 Stabilization of mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) protein by coexpressed wild SOD1 protein accelerates the disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis mice. *Eur J Neurosci* **14**: 2032-2036.
- GAUDETTE, M., M. HIRANO and T. SIDDIQUE, 2000 Current status of SOD1 mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **1**: 83-89.
- GRAHAM, F. L., and A. J. VAN DER EB, 1973 A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467.
- GURNEY, M. E., H. PU, A. Y. CHIU, M. C. DAL CANTO, C. Y. POLCHOW *et al.*, 1994 Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**: 1772-1775.

- HAASS, C., and D. J. SELKOE, 2007 Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 101-112.
- HALLIWELL, B., 1992 Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* **59**: 1609-1623.
- HAND, C. K., J. KHORIS, F. SALACHAS, F. GROS-LOUIS, A. A. LOPES *et al.*, 2002 A novel locus for familial amyotrophic lateral sclerosis, on chromosome 18q. *Am J Hum Genet* **70**: 251-256.
- HAYWARD, L. J., J. A. RODRIGUEZ, J. W. KIM, A. TIWARI, J. J. GOTO *et al.*, 2002 Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* **277**: 15923-15931.
- HEATH, V. L., S. L. SHAW, S. ROY and M. S. CYERT, 2004 Hph1p and Hph2p, novel components of calcineurin-mediated stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **3**: 695-704.
- HIGGINS, C. M., C. JUNG, H. DING and Z. XU, 2002 Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci* **22**: RC215.
- HIGGINS, C. M., C. JUNG and Z. XU, 2003 ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* **4**: 16.
- HIRANO, A., H. DONNENFELD, S. SASAKI and I. NAKANO, 1984a Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **43**: 461-470.
- HIRANO, A., I. NAKANO, L. T. KURLAND, D. W. MULDER, P. W. HOLLEY *et al.*, 1984b Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **43**: 471-480.
- HODGKIN, J., 1988 Sexual Dimorphism and Sex Determination. In: Wood, W.B. *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- HODGSON, E. K., and I. FRIDOVICH, 1975 The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry* **14**: 5299-5303.
- HOLLMANN, M., M. HARTLEY and S. HEINEMANN, 1991 Ca²⁺ permeability of KA-AMPA--gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* **252**: 851-853.
- HOSLER, B. A., T. SIDDIQUE, P. C. SAPP, W. SAILOR, M. C. HUANG *et al.*, 2000 Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *Jama* **284**: 1664-1669.

- HOSONO, R., 1978 Sterilization and growth inhibition of *Caenorhabditis elegans* by 5-fluorodeoxyuridine. *Exp Gerontol* **13**: 369-374.
- HOUGH, M. A., J. G. GROSSMANN, S. V. ANTONYUK, R. W. STRANGE, P. A. DOUCETTE *et al.*, 2004 Dimer destabilization in superoxide dismutase may result in disease-causing properties: structures of motor neuron disease mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 5976-5981.
- HOWLAND, D. S., J. LIU, Y. SHE, B. GOAD, N. J. MARAGAKIS *et al.*, 2002 Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1604-1609.
- HUBNER, K., R. WINDOFFER, H. HUTTER and R. E. LEUBE, 2002 Tetraspan vesicle membrane proteins: synthesis, subcellular localization, and functional properties. *Int Rev Cytol* **214**: 103-159.
- HUGON, J., J. M. VALLAT, P. S. SPENCER, M. J. LEBOUTET and D. BARTHE, 1989 Kainic acid induces early and delayed degenerative neuronal changes in rat spinal cord. *Neurosci Lett* **104**: 258-262.
- HUTTON, M., C. L. LENDON, P. RIZZU, M. BAKER, S. FROELICH *et al.*, 1998 Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**: 702-705.
- IKONOMIDOU, C., Y. QIN QIN, J. LABRUYERE and J. W. OLNEY, 1996 Motor neuron degeneration induced by excitotoxin agonists has features in common with those seen in the SOD-1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**: 211-224.
- INCE, P., N. STOUT, P. SHAW, J. SLADE, W. HUNZIKER *et al.*, 1993 Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **19**: 291-299.
- INCE, P. G., J. TOMKINS, J. Y. SLADE, N. M. THATCHER and P. J. SHAW, 1998 Amyotrophic lateral sclerosis associated with genetic abnormalities in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase: molecular pathology of five new cases, and comparison with previous reports and 73 sporadic cases of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**: 895-904.
- JAARSMa, D., E. D. HAASDIJK, J. A. GRASHORN, R. HAWKINS, W. VAN DUIJN *et al.*, 2000 Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis* **7**: 623-643.
- JENSEN, L. T., and V. C. CULOTTA, 2005 Activation of CuZn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. *J Biol Chem* **280**: 41373-41379.

- JOHNSON, G. D., and G. M. NOGUEIRA ARAUJO, 1981 A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J Immunol Methods* **43**: 349-350.
- JOHNSTON, J. A., M. J. DALTON, M. E. GURNEY and R. R. KOPITO, 2000 Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12571-12576.
- JONSSON, P. A., K. ERNHILL, P. M. ANDERSEN, D. BERGEMALM, T. BRANNSTROM *et al.*, 2004 Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **127**: 73-88.
- JORGENSEN, E. M., and S. E. MANGO, 2002 The art and design of genetic screens: *caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Genet* **3**: 356-369.
- JULIEN, J. P., 2001 Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* **104**: 581-591.
- JUNEJA, T., M. A. PERICAK-VANCE, N. G. LAING, S. DAVE and T. SIDDIQUE, 1997 Prognosis in familial amyotrophic lateral sclerosis: progression and survival in patients with glu100gly and ala4val mutations in Cu,Zn superoxide dismutase. *Neurology* **48**: 55-57.
- KATO, S., M. TAKIKAWA, K. NAKASHIMA, A. HIRANO, D. W. CLEVELAND *et al.*, 2000 New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 (SOD1) gene mutations: inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **1**: 163-184.
- KOSTIC, V., V. JACKSON-LEWIS, F. DE BILBAO, M. DUBOIS-DAUPHIN and S. PRZEDBORSKI, 1997 Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **277**: 559-562.
- KRISHNAN, J., R. LEMMENS, W. ROBBERECHT and L. VAN DEN BOSCH, 2006 Role of heat shock response and Hsp27 in mutant SOD1-dependent cell death. *Exp Neurol* **200**: 301-310.
- KRUMAN, II, W. A. PEDERSEN, J. E. SPRINGER and M. P. MATTSON, 1999 ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp Neurol* **160**: 28-39.
- KUWAHARA, T., A. KOYAMA, K. GENGYO-ANDO, M. MASUDA, H. KOWA *et al.*, 2006 Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **281**: 334-340.
- LAKSO, M., S. VARTIAINEN, A. M. MOILANEN, J. SIRVIO, J. H. THOMAS *et al.*, 2003 Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurochem* **86**: 165-172.

- LEIGH, P. N., H. WHITWELL, O. GAROFALO, J. BULLER, M. SWASH *et al.*, 1991 Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain* **114 (Pt 2)**: 775-788.
- LEVINE, R. L., J. A. WILLIAMS, E. R. STADTMAN and E. SHACTER, 1994 Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **233**: 346-357.
- LINDBERG, M. J., R. BYSTROM, N. BOKNAS, P. M. ANDERSEN and M. OLIVEBERG, 2005 Systematically perturbed folding patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated SOD1 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9754-9759.
- LINK, C. D., 1995 Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9368-9372.
- LINK, C. D., 2001 Transgenic invertebrate models of age-associated neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev* **122**: 1639-1649.
- LINK, C. D., 2005 Invertebrate models of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* **4**: 147-156.
- LINK, C. D., 2006 *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* **41**: 1007-1013.
- LIU, H., H. ZHU, D. K. EGGERS, A. M. NERISSIAN, K. F. FAULL *et al.*, 2000 Copper(2+) binding to the surface residue cysteine 111 of His46Arg human copper-zinc superoxide dismutase, a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant. *Biochemistry* **39**: 8125-8132.
- LIU, J., C. LILLO, P. A. JONSSON, C. VANDE VELDE, C. M. WARD *et al.*, 2004 Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* **43**: 5-17.
- LIU, J., L. A. SHINOBU, C. M. WARD, D. YOUNG and D. W. CLEVELAND, 2005 Elevation of the Hsp70 chaperone does not effect toxicity in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **93**: 875-882.
- MATSUMOTO, G., A. STOJANOVIC, C. I. HOLMBERG, S. KIM and R. I. MORIMOTO, 2005 Structural properties and neuronal toxicity of amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu/Zn superoxide dismutase 1 aggregates. *J Cell Biol* **171**: 75-85.
- MATTIAZZI, M., M. D'AURELIO, C. D. GAJEWSKI, K. MARTUSHOVA, M. KIAEI *et al.*, 2002 Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* **277**: 29626-29633.
- MELLO, C., and A. FIRE, 1995 DNA transformation. *Methods Cell Biol* **48**: 451-482.

- MIGHELI, A., L. AUTILIO-GAMBETTI, P. GAMBETTI, C. MOCELLINI, M. C. VIGLIANI *et al.*, 1990 Ubiquitinated filamentous inclusions in spinal cord of patients with motor neuron disease. *Neurosci Lett* **114**: 5-10.
- MISQUITTA, S. A., and R. F. COLMAN, 2005 Communication between the two active sites of glutathione S-transferase A1-1, probed using wild-type-mutant heterodimers. *Biochemistry* **44**: 8608-8619.
- MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN *et al.*, 1986 Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- NAGAI, M., M. AOKI, I. MIYOSHI, M. KATO, P. PASINELLI *et al.*, 2001 Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci* **21**: 9246-9254.
- NAKAMURA, R., K. KAMAKURA and S. KWAK, 1994 Late-onset selective neuronal damage in the rat spinal cord induced by continuous intrathecal administration of AMPA. *Brain Res* **654**: 279-285.
- NISHIMURA, A. L., M. MITNE-NETO, H. C. SILVA, J. R. OLIVEIRA, M. VAINZOF *et al.*, 2004a A novel locus for late onset amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease variant at 20q13. *J Med Genet* **41**: 315-320.
- NISHIMURA, A. L., M. MITNE-NETO, H. C. SILVA, A. RICHERI-COSTA, S. MIDDLETON *et al.*, 2004b A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* **75**: 822-831.
- O'REILLY, S. A., J. ROEDICA, D. NAGY, R. A. HALLEWELL, K. ALDERSON *et al.*, 1995 Motor neuron-astrocyte interactions and levels of Cu,Zn superoxide dismutase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* **131**: 203-210.
- OEDA, T., S. SHIMOHAMA, N. KITAGAWA, R. KOHNO, T. IMURA *et al.*, 2001 Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet* **10**: 2013-2023.
- OKADO-MATSUMOTO, A., and I. FRIDOVICH, 2002 Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9010-9014.
- OLNEY, J. W., 1978 Neurotoxicity of excitatory amino acids. in: E. G. McGeer, J. W. Olney; P.L. McGeer (Eds.), *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*, Raven Press, New York: 95-121.
- ORRELL, R. W., 2000 Amyotrophic lateral sclerosis: copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene mutations. *Neuromuscul Disord* **10**: 63-68.
- OSTOJIC, J., K. AXELMAN, L. LANNFELT and S. FROELICH-FABRE, 2003 No evidence of linkage to chromosome 9q21-22 in a Swedish family with frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* **340**: 245-247.

- PASINELLI, P., M. E. BELFORD, N. LENNON, B. J. BACSKAI, B. T. HYMAN *et al.*, 2004 Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* **43**: 19-30.
- PASINELLI, P., D. R. BORCHELT, M. K. HOUSEWEART, D. W. CLEVELAND and R. H. BROWN, JR., 1998 Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15763-15768.
- PERRY, T. L., C. KRIEGER, S. HANSEN and A. EISEN, 1990 Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* **28**: 12-17.
- PISHARODI, M., and H. J. NAUTA, 1985 An animal model for neuron-specific spinal cord lesions by the microinjection of N-methylaspartate, kainic acid, and quisqualic acid. *Appl Neurophysiol* **48**: 226-233.
- PUYMIRAT, J., L. COSSETTE, F. GOSSELIN and J. P. BOUCHARD, 1994 Red blood cell Cu/Zn superoxide dismutase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **127**: 121-123.
- RAKHIT, R., J. P. CROW, J. R. LEPOCK, L. H. KONDEJEWSKI, N. R. CASHMAN *et al.*, 2004 Monomeric Cu,Zn-superoxide dismutase is a common misfolding intermediate in the oxidation models of sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* **279**: 15499-15504.
- RAKHIT, R., J. ROBERTSON, C. V. VELDE, P. HORNE, D. M. RUTH *et al.*, 2007 An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. *Nat Med* **13**: 754-759.
- RATOVITSKI, T., L. B. CORSON, J. STRAIN, P. WONG, D. W. CLEVELAND *et al.*, 1999 Variation in the biochemical/biophysical properties of mutant superoxide dismutase 1 enzymes and the rate of disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis kindreds. *Hum Mol Genet* **8**: 1451-1460.
- RAY, S. S., R. J. NOWAK, K. STROKOVICH, R. H. BROWN, JR., T. WALZ *et al.*, 2004 An intersubunit disulfide bond prevents in vitro aggregation of a superoxide dismutase-1 mutant linked to familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemistry* **43**: 4899-4905.
- REAUME, A. G., J. L. ELLIOTT, E. K. HOFFMAN, N. W. KOWALL, R. J. FERRANTE *et al.*, 1996 Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* **13**: 43-47.
- RIDDEL, D. L., 1988 The Dauer Larva. In: Wood, W.B. *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.: 393-412.

- RIPPS, M. E., G. W. HUNTLEY, P. R. HOF, J. H. MORRISON and J. W. GORDON, 1995 Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 689-693.
- ROBBERECHT, W., P. SAPP, M. K. VIAENE, D. ROSEN, D. MCKENNA-YASEK *et al.*, 1994 Cu/Zn superoxide dismutase activity in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **62**: 384-387.
- ROBINSON, C. R., and R. T. SAUER, 1998 Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5929-5934.
- ROSEN, D. R., A. C. BOWLING, D. PATTERSON, T. B. USDIN, P. SAPP *et al.*, 1994 A frequent ala 4 to val superoxide dismutase-1 mutation is associated with a rapidly progressive familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* **3**: 981-987.
- ROSEN, D. R., T. SIDDIQUE, D. PATTERSON, D. A. FIGLEWICZ, P. SAPP *et al.*, 1993 Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**: 59-62.
- ROSS, C. A., and M. A. POIRIER, 2004 Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* **10 Suppl**: S10-17.
- ROSS, C. A., and M. A. POIRIER, 2005 Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 891-898.
- ROTHSTEIN, J. D., L. J. MARTIN and R. W. KUNCL, 1992 Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* **326**: 1464-1468.
- ROTHSTEIN, J. D., G. TSAI, R. W. KUNCL, L. CLAWSON, D. R. CORNBLATH *et al.*, 1990 Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **28**: 18-25.
- ROTHSTEIN, J. D., M. VAN KAMMEN, A. I. LEVEY, L. J. MARTIN and R. W. KUNCL, 1995 Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **38**: 73-84.
- RUDDY, D. M., M. J. PARTON, A. AL-CHALABI, C. M. LEWIS, C. VANCE *et al.*, 2003 Two families with familial amyotrophic lateral sclerosis are linked to a novel locus on chromosome 16q. *Am J Hum Genet* **73**: 390-396.
- SAID AHMED, M., W. Y. HUNG, J. S. ZU, P. HOCKBERGER and T. SIDDIQUE, 2000 Increased reactive oxygen species in familial amyotrophic lateral sclerosis with mutations in SOD1. *J Neurol Sci* **176**: 88-94.
- SALINAS, L. S., E. MALDONADO and R. E. NAVARRO, 2006 Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ* **13**: 2129-2139.

- SAPP, P. C., B. A. HOSLER, D. MCKENNA-YASEK, W. CHIN, A. GANN *et al.*, 2003 Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* **73**: 397-403.
- SASAKI, S., and M. IWATA, 2007 Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**: 10-16.
- SASAKI, S., T. KOMORI and M. IWATA, 2000 Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* **100**: 138-144.
- SATYAL, S. H., E. SCHMIDT, K. KITAGAWA, N. SONDHEIMER, S. LINDQUIST *et al.*, 2000 Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5750-5755.
- SEARCY, D. G., J. P. WHITEHEAD and M. J. MARONEY, 1995 Interaction of Cu,Zn superoxide dismutase with hydrogen sulfide. *Arch Biochem Biophys* **318**: 251-263.
- SELKOE, D. J., 2001 Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis* **3**: 75-80.
- SELLARES, J., S. MAS, E. MELO, F. SANCHEZ, J. MARIN *et al.*, 2007 Oxidative stress time course in the rat diaphragm after freezing-thawing cycles. *Respir Physiol Neurobiol* **155**: 156-166.
- SHAW, B. F., and J. S. VALENTINE, 2007 How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends Biochem Sci* **32**: 78-85.
- SHAW, I. C., P. S. FITZMAURICE, J. D. MITCHELL and P. G. LYNCH, 1995a Studies on cellular free radical protection mechanisms in the anterior horn from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegeneration* **4**: 391-396.
- SHAW, P. J., P. G. INCE, G. FALKOUS and D. MANTLE, 1995b Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol* **38**: 691-695.
- SON, M., K. PUTTAPARTHI, H. KAWAMATA, B. RAJENDRAN, P. J. BOYER *et al.*, 2007 Overexpression of CCS in G93A-SOD1 mice leads to accelerated neurological deficits with severe mitochondrial pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 6072-6077.
- STEFFAN, J. S., L. BODAI, J. PALLOS, M. POELMAN, A. MCCAMPBELL *et al.*, 2001 Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* **413**: 739-743.

- STIEBER, A., J. O. GONATAS and N. K. GONATAS, 2000a Aggregates of mutant protein appear progressively in dendrites, in periaxonal processes of oligodendrocytes, and in neuronal and astrocytic perikarya of mice expressing the SOD1(G93A) mutation of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **177**: 114-123.
- STIEBER, A., J. O. GONATAS and N. K. GONATAS, 2000b Aggregation of ubiquitin and a mutant ALS-linked SOD1 protein correlate with disease progression and fragmentation of the Golgi apparatus. *J Neurol Sci* **173**: 53-62.
- SUBRAMANIAM, J. R., W. E. LYONS, J. LIU, T. B. BARTNIKAS, J. ROTHSTEIN *et al.*, 2002 Mutant SOD1 causes motor neuron disease independent of copper chaperone-mediated copper loading. *Nat Neurosci* **5**: 301-307.
- SULSTON, J., and J. HODGKIN, 1988 Methods. In: *The Nematode Caenorhabditis elegans*, ed. W.B. Wood, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 587 -606.
- TAGAWA, A., C. F. TAN, K. KIKUGAWA, M. FUKASE, R. NAKANO *et al.*, 2006 Familial amyotrophic lateral sclerosis: a SOD1-unrelated Japanese family of bulbar type with Bunina bodies and ubiquitin-positive skein-like inclusions in lower motor neurons. *Acta Neuropathol (Berl)*.
- TAKEUCHI, H., Y. KOBAYASHI, S. ISHIGAKI, M. DOYU and G. SOBUE, 2002 Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* **277**: 50966-50972.
- THE C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM, 1998 Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**: 2012-2018.
- TRAYNOR, B. J., L. BRUIJN, R. CONWIT, F. BEAL, G. O'NEILL *et al.*, 2006 Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology* **67**: 20-27.
- TROTTI, D., A. ROLFS, N. C. DANBOLT, R. H. BROWN, JR. and M. A. HEDIGER, 1999 SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* **2**: 848.
- TUMMALA, H., C. JUNG, A. TIWARI, C. M. HIGGINS, L. J. HAYWARD *et al.*, 2005 Inhibition of chaperone activity is a shared property of several Cu,Zn-superoxide dismutase mutants that cause amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* **280**: 17725-17731.
- TURNER, B. J., J. D. ATKIN, M. A. FARG, D. W. ZANG, A. REMBACH *et al.*, 2005 Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **25**: 108-117.
- VALENTINE, J. S., P. J. HART and E. B. GRALLA, 1999 Copper-zinc superoxide dismutase and ALS. *Adv Exp Med Biol* **448**: 193-203.

- VAN DEN BOSCH, L., P. VAN DAMME, E. BOGAERT and W. ROBBERECHT, 2006 The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* **1762**: 1068-1082.
- VAN DEN BOSCH, L., W. VANDENBERGHE, H. KLAASSEN, E. VAN HOUTTE and W. ROBBERECHT, 2000 Ca(2+)-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci* **180**: 29-34.
- VAZQUEZ-MANRIQUE, R. P., P. GONZALEZ-CABO, S. ROS, H. AZIZ, H. A. BAYLIS *et al.*, 2006 Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *Faseb J* **20**: 172-174.
- VED, R., S. SAHA, B. WESTLUND, C. PERIER, L. BURNAM *et al.*, 2005 Similar patterns of mitochondrial vulnerability and rescue induced by genetic modification of alpha-synuclein, parkin, and DJ-1 in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **280**: 42655-42668.
- VIELHABER, S., K. WINKLER, E. KIRCHES, D. KUNZ, M. BUCHNER *et al.*, 1999 Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **169**: 133-139.
- VIJAYVERGIYA, C., M. F. BEAL, J. BUCK and G. MANFREDI, 2005 Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci* **25**: 2463-2470.
- WANDERS, R. J., and S. DENIS, 1992 Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* **1115**: 259-262.
- WANG, J., A. CARUANO-YZERMANS, A. RODRIGUEZ, J. P. SCHEURMANN, H. H. SLUNT *et al.*, 2007 Disease-associated mutations at copper ligand histidine residues of superoxide dismutase 1 diminish the binding of copper and compromise dimer stability. *J Biol Chem* **282**: 345-352.
- WANG, J., H. SLUNT, V. GONZALES, D. FROMHOLT, M. COONFIELD *et al.*, 2003 Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature. *Hum Mol Genet* **12**: 2753-2764.
- WANG, J., G. XU and D. R. BORCHELT, 2002 High molecular weight complexes of mutant superoxide dismutase 1: age-dependent and tissue-specific accumulation. *Neurobiol Dis* **9**: 139-148.
- WANG, J., G. XU, H. LI, V. GONZALES, D. FROMHOLT *et al.*, 2005 Somatodendritic accumulation of misfolded SOD1-L126Z in motor neurons mediates degeneration: alphaB-crystallin modulates aggregation. *Hum Mol Genet* **14**: 2335-2347.
- WATANABE, M., M. DYKES-HOBERG, V. C. CULOTTA, D. L. PRICE, P. C. WONG *et al.*, 2001 Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* **8**: 933-941.

- WATANABE, S., S. NAGANO, J. DUCE, M. KIAEI, Q. X. LI *et al.*, 2007 Increased affinity for copper mediated by cysteine 111 in forms of mutant superoxide dismutase 1 linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* **42**: 1534-1542.
- WHITE, J. G., E. SOUTHGATE, J. N. THOMSON and S. BRENNER, 1976 The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **275**: 327-348.
- WHITE, S. L., and P. S. RAINBOW, 1986 A preliminary study of Cu-, Cd- and Zn-binding components in the hepatopancreas of *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *Comp Biochem Physiol C* **83**: 111-116.
- WIEDAU-PAZOS, M., J. J. GOTO, S. RABIZADEH, E. B. GRALLA, J. A. ROE *et al.*, 1996 Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **271**: 515-518.
- WIEDEMANN, F. R., G. MANFREDI, C. MAWRIN, M. F. BEAL and E. A. SCHON, 2002 Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem* **80**: 616-625.
- WONG, P. C., C. A. PARDO, D. R. BORCHELT, M. K. LEE, N. G. COPELAND *et al.*, 1995 An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* **14**: 1105-1116.
- YIM, H. S., J. H. KANG, P. B. CHOCK, E. R. STADTMAN and M. B. YIM, 1997 A familial amyotrophic lateral sclerosis-associated A4V Cu, Zn-superoxide dismutase mutant has a lower Km for hydrogen peroxide. Correlation between clinical severity and the Km value. *J Biol Chem* **272**: 8861-8863.
- YIM, M. B., P. B. CHOCK and E. R. STADTMAN, 1990 Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5006-5010.
- YIM, M. B., J. H. KANG, H. S. YIM, H. S. KWAK, P. B. CHOCK *et al.*, 1996 A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5709-5714.
- ZELKO, I. N., T. J. MARIANI and R. J. FOLZ, 2002 Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* **33**: 337-349.
- ZHAO, H., and M. L. NONET, 2001 A conserved mechanism of synaptogyrin localization. *Mol Biol Cell* **12**: 2275-2289.

ZU, J. S., H. X. DENG, T. P. LO, H. MITSUMOTO, M. S. AHMED *et al.*, 1997 Exon 5 encoded domain is not required for the toxic function of mutant SOD1 but essential for the dismutase activity: identification and characterization of two new SOD1 mutations associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics* **1**: 65-71.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad.	Latein: bis
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
ALS1	Superoxid Dismutase 1-vermittelte amyotrophe Lateral- sklerose
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cm	Zentimeter
DMEM	Dulbecco 's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DsRed2	<i>Discosoma sp.</i> Rot fluoreszierendes Protein 2
EAAT2/GLT1	Glutamattransporter 1
<i>E. coli</i> DH5a	<i>Escherichia coli</i> , Stamm DH5a
<i>E. coli</i> HB101	<i>Escherichia coli</i> , Stamm HB101
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
et al.	et alteres (Latein: und andere)
F1-Generation	erste Filialgeneration
F2-Generation	zweite Filialgeneration

FBS	fötales bovines Serum
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hSOD1	Menschliche Superoxid Dismutase 1
hSOD1 ^{Dimer-eGFP}	Menschliche dimere, eGFP-fusionierte Superoxid Dismutase 1
hSOD1 ^{Dimer-DsRed2}	Menschliche dimere, DsRed2-fusionierte Superoxid Dismutase 1
hSOD1 ^{mut}	Menschliche mutante Superoxid Dismutase 1
hSOD1 ^{mut-mut-eGFP}	Menschliche homodimere mutante, eGFP-fusionierte Superoxid Dismutase 1
hSOD1 ^{mut-mut-DsRed2}	Menschliche homodimere mutante, DsRed2-fusionierte Superoxid Dismutase 1
hSOD1 ^{mut-WT-eGFP}	Menschliche heterodimere mutant-wildtypische, eGFP-fusionierte Superoxid Dismutase 1
hSOD1 ^{mut-WT-DsRed2}	Menschliche heterodimere mutant-wildtypische, DsRed2-fusionierte Superoxid Dismutase 1
hSOD1 ^{A4V}	Menschliche mutante Superoxid Dismutase 1, deren 4. Aminosäure Alanin durch Valin ersetzt wurde
hSOD1 ^{G37R}	Menschliche mutante Superoxid Dismutase 1, deren 37. Aminosäure Glycin durch Arginin ersetzt wurde
hSOD1 ^{G41D}	Menschliche mutante Superoxid Dismutase 1, deren 41. Aminosäure Glycin durch Aspartat ersetzt wurde
hSOD1 ^{G85R}	Menschliche mutante Superoxid Dismutase 1, deren 85. Aminosäure Glycin durch Arginin ersetzt wurde
hSOD1 ^{G93A}	Menschliche mutante Superoxid Dismutase 1, deren 93. Aminosäure Glycin durch Alanin ersetzt wurde
hSOD1 ^{WT}	Menschliche wildtypische Superoxid Dismutase 1
Hz	Hertz
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
KPO ₄	Kaliumphosphat
l	Liter
L	Lysat
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar (mol/l)
mb	Megabasen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar (mmol/l)
mm	Millimeter
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
ddH ₂ O	ultrareines Wasser (Elektrischer Widerstand >18.2 MW cm, bei 25 °C; Organischer Kohlenstoff <5 ppb)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
msSOD1	Murine Superoxid Dismutase 1
msSOD1 ^{WT}	Murine wildtypische Superoxid Dismutase 1
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-2H- tetrazoliumbromid
N2	<i>C. elegans</i> Wildtypstamm Variation Bristol
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NBT	Nitroblau-Terzolium-Chlorid
n. d.	nicht determiniert
ng	Nanogramm
NGM	Nematode Growth Medium
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid

O ₂	Molekularer Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxid
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit TWEEN
P _{sng-1}	Promoter für Synaptogyrin-1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SEM	standard error of the mean (engl: Standardabweichung)
Sng-1	Synaptogyrin-1
s. o.	siehe oben
SOD1	Superoxid Dismutase 1
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-Na ₂ EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
Ü	Überstand
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
[v/v]	Volumen pro Volumen
[w/v]	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

7.2. Publikationen der Autorin

Publikationen:

WITAN, H., KERN, A., KOZIOLLEK-DRECHSLER, I., WADE, R., BEHL, C. and A. M. CLEMENT 2007 Heterodimerization of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces neuronal toxicity independent of protein aggregation. Zur Publikation eingereicht.

ZSCHOCKE, J., BAYATTI, N., CLEMENT, A.M., WITAN, H., FIGIEL, M., ENGELE, J. and C. BEHL 2005 Differential promotion of glutamate transporter expression and function by glucocorticoids in astrocytes from various brain regions. J. Biol. Chem. 2005 Oct 14;280(41):34924-32

Abstracts:

WITAN, H., KOZIOLLEK-DRECHSLER, I., WADE, R., BEHL, C., and A. M. CLEMENT 2007 Dismutase-inactive mutant SOD1 has different functional properties when heterodimerized with wild type SOD1. SOD1-Meeting in Mailand from 13-16.09.2007: Mutant SOD1 and familial ALS: from the molecule to man. (selected for oral presentation)

CLEMENT, A. M., WITAN, H., KOZIOLLEK-DRECHSLER, I., WADE, R. and C. BEHL 2007 Homo- and heterodimers of wild type and amyotrophic lateral sclerosis causing mutant forms of Cu/Zn superoxide dismutase display different functional properties and aggregation behaviour. Neuroscience Meeting 2007 from 3.-7.11.2007 in San Diego

LAUFS, T., WITAN, H., REUSS, S., WYSTUB, S., BURMESTER, T., SAALER-REINHARD, S. and T. HANKELN 2003 Expression of neuroglobin in primary hippocampal cell cultures, glioblastoma cell lines and in the developing mouse brain. 3rd annual meeting of the interdisciplinary science network "molecular and cellular neurobiology". Abstract F3

7.3. Lebenslauf

7.4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz, den

Heidrun Witan

7.5. Danksagung