

**Der Einfluss einer wildtypischen SOD1 Untereinheit
auf Konformation und Stabilität mutanter SOD1
Heterodimere**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Anna Weichert
geb. in Wiesbaden

Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2012

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
1.1 Sauerstoff und reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	1
1.2 Superoxiddismutasen (SOD).....	3
1.3 Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS).....	5
1.3.1 Histopathologische Merkmale der ALS.....	6
1.3.2 Sporadische und familiäre Formen der ALS.....	7
1.3.3 ALS als Folge einer Mutation im Gen der SOD1.....	8
1.3.3.1 SOD1-vermittelte ALS ist keine zellautonome Erkrankung.....	10
1.3.3.2 SOD1-positive Proteinaggregate in ALS.....	11
1.3.3.3 Fehlgefaltete mutante SOD1 Proteine und Störung des Ubiquitin/Proteasom-systems	12
1.3.3.4 Mitochondriale Defekte.....	13
1.3.3.5 Störung des Endoplasmatischen Retikulums.....	14
1.3.3.6 Exzitotoxizitätshypothese.....	15
1.3.3.7 Aberrante Enzymaktivität mutierter SOD1 Proteine.....	16
1.3.3.8 Beeinträchtigung des axonalen Transports.....	18
1.3.4 Der Einfluss wildtypischer SOD1 auf die Toxizität mutanter SOD1 Proteine.....	19
1.4 Zielsetzung.....	20
2. Material.....	22
2.1 Organismen, Zellen, Bakterien.....	22
2.2 Plasmide, Primer, siRNA.....	22
2.3 Antikörper.....	24
2.4 DNA- und Proteingrößenmarker.....	25
2.5 Enzyme und Restriktionsenzyme.....	25
2.6 Chemikalien und Reagenzien.....	26
2.7 Puffer und Lösungen.....	29
2.7.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	29
2.7.2 Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeitsmethoden.....	30
2.7.3 Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung.....	31
2.7.4 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeitsmethoden.....	31
2.7.5 Puffer und Lösungen für Arbeiten mit <i>C. elegans</i>	35
2.8 Geräte.....	36
2.9 Software.....	37

3. Methoden.....	38
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	38
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
3.1.2 Agarosegelelektrophorese.....	39
3.1.3 Gelextraktion.....	39
3.1.4 Restriktionsverdau.....	40
3.1.5 Ligation.....	41
3.1.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	41
3.1.7 Transformation und Selektion.....	41
3.1.8 Plasmidpräparation.....	42
3.1.9 DNA-Sequenzierung.....	42
3.1.10 Herstellung der <i>sod1</i> Dimerkonstrukte.....	42
3.1.10.1 <i>Sod1</i> Dimerkonstrukte im pET-14b-Vektor.....	43
3.1.10.2 <i>Sod1</i> Dimerkonstrukte im pIRES-Vektor.....	43
3.1.10.3 Fusions-PCR zur Herstellung transgener <i>C. elegans</i>	44
3.1.10.4 TOPO TA-Klonierung.....	45
3.1.10.5 LR-Rekombination.....	46
3.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	46
3.2.1 Kultivierung von Zellen.....	46
3.2.2 Transfektion von Zellen.....	47
3.2.3 Behandlung von HEK-293t Zellen mit siRNA.....	47
3.3 Proteinaufreinigung.....	48
3.3.1 Expression in BL21(DE3)pLysS kompetenten Zellen.....	48
3.3.2 Ermittlung der Löslichkeit der SOD1 Dimere.....	48
3.3.3 <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC).....	49
3.3.4 Abspaltung des Histidin-tags.....	50
3.4 Biochemische Arbeitsmethoden.....	50
3.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test.....	50
3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
3.4.3 Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen.....	51
3.4.4 Western Blot-Analyse.....	52
3.4.4.1 Ponceaufärbung membrangebundener Proteine.....	52
3.4.4.2 Immundetektion membrangebundener Proteine.....	52
3.4.5 Aktivitätsbestimmung der SOD1 Dimere.....	53
3.4.5.1 Qualitative Aktivitätsbestimmung mittels nativer Gelelektrophorese.....	53
3.4.5.2 Qualitative Aktivitätsbestimmung nach Vorbehandlung mit Riboflavin und H ₂ O ₂	53

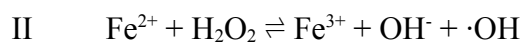
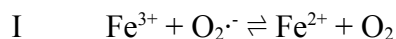
3.4.5.3	Quantitative Aktivitätsbestimmung mittels WST-1.....	53
3.4.6	Metallgehaltsbestimmung.....	54
3.4.7	Proteinase K Verdau.....	55
3.4.8	Immunpräzipitation (IP).....	56
3.5	Biophysikalische Arbeitsmethoden.....	57
3.5.1	Zirkulardichroismus-Spektroskopie (<i>Circular Dichroism Spectroscopy</i> ; CD-Spektroskopie).....	57
3.6	Der Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>) als <i>in vivo</i> -Modell.....	58
3.6.1	Kultivierung von <i>C. elegans</i>	58
3.6.2	Herstellung transgener <i>C. elegans</i>	58
3.6.3	Integration des Zielgens in das Genom von <i>C. elegans</i> mittels UV-Bestrahlung.....	59
3.6.4	Herstellung männlicher <i>C. elegans</i>	60
3.6.5	Überlebenszeitanalyse.....	60
3.6.6	Analyse der Eiablage.....	60
3.6.7	Langzeitlagerung von <i>C. elegans</i>	61
3.7	Statistik.....	61
4.	Ergebnisse.....	62
4.1	Expression der SOD1 Dimere in BL21(DE3)pLysS Bakterien.....	62
4.2	Aufreinigung der Proteine durch <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC).....	64
4.3	Entfernung des Histidin-tags.....	66
4.4	Dismutaseaktivität der aufgereinigten SOD1 Dimere.....	67
4.4.1	Qualitative Bestimmung der Dismutaseaktivität der aufgereinigten SOD1 Dimere mittels nativer Aktivitätsgele.....	68
4.4.2	Quantitative Messung der Dismutaseaktivität der aufgereinigten SOD1 Dimere mittels WST-1.....	70
4.5	Metallgehalt der aufgereinigten SOD1 Dimere.....	73
4.6	Expression der SOD1 Dimere in HEK-293t Zellen.....	74
4.7	Proteinase K Verdau der SOD1 Dimere in HEK-293t Zellen.....	74
4.8	Proteinase K Verdau der aufgereinigten SOD1 Dimere.....	78
4.9	Proteinase K Verdau der SOD1 Dimere in BL21(DE3)pLysS Zellen.....	81
4.10	Proteinase K Verdau der SOD1 Dimere in CCS (<i>Copper Chaperone for SOD1</i>)-depletierten HEK-293t Zellen.....	83
4.11	Konformationsstudien der aufgereinigten SOD1 Dimere.....	85
4.11.1	Untersuchung der SOD1 Dimere auf intermolekulare Disulfidbrückenbildung.....	85
4.11.2	Bestimmung der Sekundärstruktur der SOD1 Dimere mittels CD (<i>Circular Dichroism</i>)-Spektroskopie.....	86

4.11.3	Immunpräzipitation der SOD1 Dimere mit Antikörpern gegen fehlgefaltete SOD1.....	89
4.11.4	Der Einfluss eines Anhangs auf die Struktur der SOD1 Dimere.....	91
4.12	Der Nematode <i>C. elegans</i> als <i>in vivo</i> -Modell für ALS.....	95
4.12.1	Expression von SOD1 ^{85-WT} -EGPF und SOD1 ⁸⁵⁻⁸⁵ -EGPF unter der Kontrolle des <i>sra-6</i> Promotors führt zu Eilegedefekten bei <i>C. elegans</i>	96
4.12.2	Expression von SOD1 ^{85-WT} -EGPF und SOD1 ⁸⁵⁻⁸⁵ -EGPF unter der Kontrolle des <i>sra-6</i> Promotors führt zu einer verringerten Lebensspanne bei <i>C. elegans</i>	97
5.	Diskussion.....	99
5.1	Der Einfluss eines EGFP- oder Histidin-tags auf die Konformation der SOD1 Dimere.....	99
5.2	Die Expression von SOD1 ⁸⁵⁻⁸⁵ -EGFP in sensorischen Neuronen führt zu einer verminderten Lebensspanne des Fadenwurms <i>C. elegans</i>	100
5.3	Niedrige Temperaturen während der Expression mutanter SOD1 Homodimere in den Bakterienzellen BL21(DE3)pLysS verhindern die Einlagerung der Proteine in Einschlusskörperchen.....	102
5.4	Die enzymatische Aktivität von SOD1 ^{G85R} wird durch H ₂ O ₂ inhibiert.....	104
5.5	Erhöhte Stabilität mutanter SOD1 Heterodimere gegenüber Proteinase K Behandlung.....	106
5.5.1	Erhöhte Stabilität mutanter SOD1 Heterodimere gegenüber Proteinase K durch potentielle Interaktion mit einem Ko-Expressionspartner.....	107
5.5.2	Verminderte Stabilität mutanter SOD1 Homodimere gegenüber Proteinase K durch potentielle Interaktion mit einem Ko-Expressionspartner.....	109
5.6	Strukturelle Veränderungen durch die wildtypische Untereinheit vermindern die Interaktion mutanter SOD1 Heterodimere mit Antikörpern gegen fehlgefaltete SOD1.....	112
5.7	Prionen-Hypothese.....	114
5.8	Schlussfolgerung.....	115
6.	Zusammenfassung.....	116
7.	Summary.....	117
8.	Literaturverzeichnis.....	118
9.	Anhang.....	146
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	146
9.2	Vektoren.....	151
9.3	Lebenslauf.....	159
9.4	Eidesstattliche Erklärung	161
9.5	Danksagung.....	162

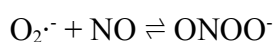
1. EINLEITUNG

1.1 Sauerstoff und reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Mit der Anreicherung molekularen Sauerstoffs (O_2) in unserer Atmosphäre vor etwa 2,5 Milliarden Jahren änderte sich das Leben auf der Erde für die meisten Organismen grundlegend. Sie begannen den Sauerstoff zur Energiegewinnung zu nutzen. Heute, bei einem Anteil von circa 21 % Sauerstoff in der Atmosphäre, ist dieser für fast alle Lebewesen essentiell, gleichzeitig birgt Sauerstoff aber auch ein Gefahrenpotential. Durch verschiedene Reaktionen können sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species; ROS*) entstehen, welche sowohl Proteine, Lipide als auch DNA Moleküle schädigen können (Halliwell and Whiteman, 2004). Eine dieser reaktiven Sauerstoffspezies ist das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$). Dieses entsteht durch die Übertragung eines Elektrons auf ein Sauerstoffmolekül z.B. während der zellulären Atmung oder während der Reaktion einiger Enzyme wie der Xanthinoxidase (McCord and Fridovich, 1969). Da damit im Gegensatz zu Sauerstoff anstatt zwei freien Elektronen nur noch ein freies Elektron zur Reaktion zu Verfügung steht, wäre das Superoxidradikal somit weniger „radikal“ als Sauerstoff. Allerdings ist Sauerstoff nicht sehr reaktionsfreudig, da seine beiden freien Elektronen jeweils den gleichen Spin aufweisen und dementsprechend ebenfalls nur mit Elektronen mit parallelem Spin gepaart werden können. Aus diesem Grund reagiert Sauerstoff am leichtesten mit radikalischen Verbindungen (Halliwell and Gutteridge, 1985; Halliwell, 1992). Auch Superoxid ist wenig reaktiv, kann aber mit Wasserstoffperoxid nach Haber/Weiss hochreaktive Hydroxylradikale ($\cdot OH$) hervorbringen (Beauchamp and Fridovich, 1970; Halliwell, 2006). Hierfür reduziert Superoxid zunächst dreiwertiges Eisen (I), welches anschließend in der Fentonreaktion (II) wieder oxidiert wird, wobei u.a. Hydroxylradikale entstehen.



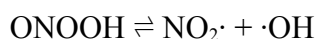
Superoxid kann außerdem mit Stickstoffmonoxid (NO) in einer sehr schnellen Reaktion das stark oxidative Peroxinitrit ($ONOO^-$) bilden (Blough and Zafiriou, 1985; Huie and Padmaja, 1993).



Peroxinitrit selbst kann wiederum weitere reaktive Spezies, wie Karbonat-, Stickstoffdioxid- und

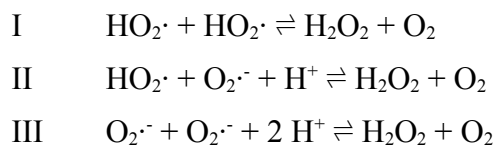
Hydroxylradikale, hervorbringen und somit Proteine, Lipide und DNA durch Nitrierung und Oxidation direkt und indirekt schädigen (Beckman et al., 1990; Alvarez and Radi, 2003; Szabó et al., 2007). Zum Beispiel kann Peroxinitrit die Aminosäure Tyrosin indirekt nitrieren (Beckman et al., 1992; Alvarez et al., 1999; Galiñanes and Matata, 2002; Szabó et al., 2007). Durch die Bildung von 3-Nitrotyrosin, 3,3'-Dityrosin oder 3,4'-Dihydrophenylalanin erfolgt eine Konformationsänderung des Proteins. Handelt es sich hierbei um ein Enzym, kann die Nitrierung zudem zu einer Inhibition oder gar Inaktivierung der enzymatischen Funktion führen (Beckman, 1996; Alvarez and Radi, 2003; Szabó et al., 2007). Die Nitrierung von Tyrosin kann außerdem die Phosphorylierung eines Proteins verhindern, was wiederum viele zelluläre Reaktionen beeinflusst (Martin et al., 1990; Beckman, 1996; Gow et al., 1996; Alvarez and Radi, 2003).

Im Bereich des physiologischen pH-Werts liegt Peroxinitrit als Säure (ONOOH) vor, welche zum einen durch passive Diffusion Membranen durchqueren und zum anderen schnell zu hochreaktiven Stickstoffdioxid- und Hydroxylradikalen zerfallen kann (Beckman et al., 1990; Alvarez and Radi, 2003; Szabó et al., 2007).



Das aus dieser Reaktion und der Reaktion von Superoxid und Wasserstoffperoxid hervorgegangene Hydroxylradikal gehört zu den stärksten natürlich vorkommenden Oxidationsmitteln und reagiert mit nahezu allen Molekülen in der Zelle. Das Radikal bewirkt DNA Strangbrüche, sowie Veränderungen der Zuckerbasen Purin und Pyrimidin und hinterlässt somit schwere DNA Schäden. In Membranen kommt es zu Lipidperoxidation, was in Folge eine Kaskade weiterer radikalischer Reaktionen auslöst, welche die Integrität der Membran stören. Auch Proteine und Kohlenhydratketten werden von $\cdot\text{OH}$ angegriffen (Halliwell and Gutteridge, 1985; Halliwell, 1992). Während unter physiologischen Bedingungen diese reaktiven Spezies eine wichtige Funktion bei der Signalübertragung und auch bei der Abwehr pathogener Organismen ausüben, führt ein Übermaß an ROS zu oxidativem Stress. Obwohl Superoxid selbst wenig reaktiv ist, stellt ein Überschuss an $\text{O}_2^{\cdot-}$ somit eine Gefahr für die Zelle dar. Die Regulation der Spiegel von reaktiven Spezies ist daher lebensnotwendig.

Verglichen mit Sauerstoff ist Superoxid sehr instabil und zerfällt spontan zu H_2O_2 und Sauerstoff. Je nach pH-Wert der Lösung, in der die Reaktion stattfindet, kann Superoxid über seine korrespondierende Säure, das Hydroperoxyl Radikal ($\text{HO}_2\cdot$) oder über das geladene Anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), abgebaut werden. Es ergeben sich hierdurch drei mögliche Formen der Dismutasereaktion (Rabani and Nielsen, 1969; Bielski and Allen, 1977; Fridovich, 1983, 1986).



Die Reaktion der ionisierten Formen miteinander verläuft aufgrund der Abstoßung durch die negative Ladung beider Moleküle allerdings nur sehr langsam (Fridovich, 1983).

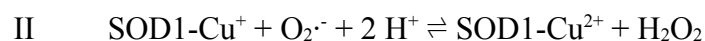
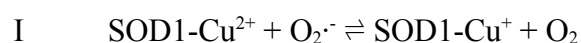
1969 beschrieb die Gruppe um McCord ein Enzym, das bei physiologischem pH von 7,4 diese Reaktion mit weitaus höherer Geschwindigkeit (in der Leber um Faktor 10^9 erhöht) katalysieren kann und nannte es aufgrund seiner katalytischen Fähigkeit Superoxiddismutase (McCord and Fridovich, 1969; Fridovich, 1986).

1.2 Superoxiddismutasen (SOD)

Die Superoxiddismutasen gehören zu den Metalloenzymen, da sie in ihrem aktiven Zentrum jeweils ein Metallion enthalten, das die Umwandlung von Superoxidradikalen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff katalysiert. Drei Formen der SOD lassen sich anhand des Metallions im aktiven Zentrum des Enzyms unterscheiden, wobei zwei dieser SOD Formen eng miteinander verwandt sind und vor allem in Prokaryoten auftreten. Sie tragen in ihrem aktiven Zentrum jeweils ein Mangan- oder ein Eisenion und werden deswegen als MnSOD bzw. FeSOD bezeichnet. Die in allen eukaryotischen Zellen vorkommende CuZnSOD enthält ein katalytisch aktives Kupfer- (Cu^{2+}) sowie ein Zinkion (Zn^{2+}). Obwohl alle Enzyme die gleiche Reaktion katalysieren, besteht keine Verwandtschaft zwischen der eukaryotischen CuZnSOD und den beiden anderen SOD Formen (Steinman and Hill, 1973; Harris et al., 1980).

In Säugern treten drei SOD Isoformen auf, welche als SOD1, SOD2 und SOD3 bezeichnet werden. SOD1 ist eine ubiquitär exprimierte CuZnSOD, die hauptsächlich im Zytosol (Fridovich, 1986; Chang et al., 1988; Crapo et al., 1992), aber auch in Mitochondrien (Chang et al., 1988; Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001), dem endoplasmatischen Retikulum (Kikuchi et al., 2006), den Lysosomen (Geller and Winge, 1982; Chang et al., 1988), Peroxisomen (Keller et al., 1991; Crapo et al., 1992; Wanders and Denis, 1992; Islinger et al., 2009) und dem Nukleus (Chang et al., 1988; Crapo et al., 1992) lokalisiert ist. SOD1 wird als 154 Aminosäuren langes und etwa 16.000 Dalton (Da) schweres Apoenzym exprimiert, dessen erste Aminosäure, Methionin, allerdings nach der Expression entfernt wird (Barra et al., 1980; Jabusch et al., 1980). Die Sekundärstruktur des Proteins wird von einem Zylinder aus acht antiparallelen β -Faltblattstrukturen dominiert. Des

Weiteren weist das Protein kurze α -helikale Abschnitte sowie lange, nicht repetitive Schleifen auf (Thomas et al., 1974; Richardson et al., 1975; Tainer et al., 1982). Jedes SOD1 Protein ist zudem jeweils mit einem Kupfer- und einem Zinkion beladen und bildet eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen Cys⁵⁷ und Cys¹⁴⁶ aus (Banci et al., 2000; Arnesano et al., 2004). Das Kupferion Cu²⁺ wird von vier Histidinresten stabilisiert (His⁴⁴, His⁴⁶, His⁶¹, His¹¹⁸) und ist für seine Umgebung gut zugänglich, während Zn²⁺ an die Histidine His⁶¹, His⁶⁹, His⁷⁸ und den Aspartatrest Asp⁸¹ gebunden und in der Struktur des Proteins vergraben vorliegt (Thomas et al., 1974; Richardson et al., 1975; Tainer et al., 1982). Während Kupfer an der enzymatischen Reaktion beteiligt ist, dient die Beladung mit Zink hauptsächlich der Stabilisierung der Proteinkonformation (Forman and Fridovich, 1973). SOD1 ist ein sehr stabiles Protein, das noch bei etwa 80 °C, 4 % SDS oder bis zu 10 M Harnstoff enzymatisch aktiv ist (Forman and Fridovich, 1973; Roe et al., 1988; Arnesano et al., 2004). Für die enzymatische Reaktion bilden zwei SOD1 Proteine ein aktives Dimer mit einem Molekulargewicht von etwa 32.000 Da. Jede Untereinheit enthält hierbei jeweils ein Kupfer- und ein Zinkion. Während der Dismutasereaktion der Superoxidanionen wird das im aktiven Zentrum eingebundene Kupferion zunächst durch Superoxid reduziert und im zweiten Schritt, in welchem ein weiteres Superoxidanion mit Wasserstoff zu Wasserstoffperoxid reagiert, wieder oxidiert.



Das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid wird durch Katalasen und Glutathionperoxidasen weiter zu Wasser und Sauerstoff detoxifiziert (Keilin and Hartree, 1938; Mills, 1957; Maier and Chan, 2002).

An der Beladung des SOD1 Apoenzyms mit Kupfer ist ein Hilfsprotein, das Chaperon CCS (*Copper Chaperone for SOD1*), beteiligt, wobei CCS und SOD1 direkt miteinander interagieren (Culotta et al., 1997; Casareno et al., 1998; Lamb et al., 2001). Die Struktur eines SOD1 Dimers ist in Abb. 1 dargestellt.

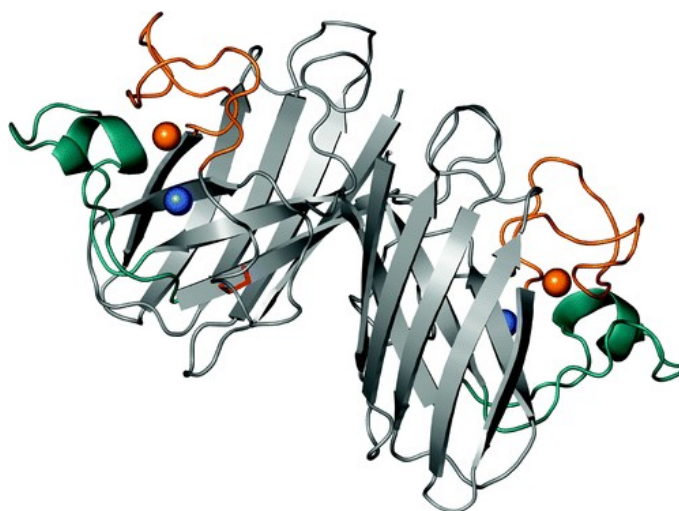


Abb. 1: CuZnSuperoxiddismutase (SOD1)

3D Struktur eines SOD1 Dimers bestehend aus zwei SOD1 Proteinen. Die grauen Pfeile stellen die β -Faltblattstrukturen dar, die orangefarben Kugeln Zink und die blauen Kugeln Kupfer. Die Schleifen des Proteins, welche Zn^{+} fixieren sind ebenfalls in orange dargestellt, die Disulfidbrücke zwischen Cys⁵⁷ und Cys¹⁴⁶ ist rot gefärbt (Valentine et al., 2005).

In den Mitochondrien von Eukaryoten ist eine MnSOD zu finden, die eine hohe Ähnlichkeit zu der MnSOD der Prokaryoten aufweist. Diese MnSOD wird auch als SOD2 bezeichnet und bildet aus vier Untereinheiten ein Tetramer mit einem Molekulargewicht von etwa 80.000 Da. Der hohe Verwandtschaftsgrad zu der MnSOD prokaryotischer Zellen wird mit der Endosymbiontenhypothese erklärt (Steinman and Hill, 1973; Weisiger and Fridovich, 1973).

SOD3 oder EC (extra cellular)-SOD ist ebenfalls eine CuZnSOD, welche im extrazellulären Raum lokalisiert ist und die sich im Gegensatz zur SOD1 aus vier identischen Untereinheiten zu einem 135.000 Da schweren Tetramer zusammensetzt (Marklund, 1982, 1984; Zelko et al., 2002).

Von diesen drei Isoformen rückte 1993 SOD1 in den Fokus der neurowissenschaftlichen Forschung, nachdem entdeckt wurde, dass Mutationen im Gen dieses Enzyms zu einer familiären Form der Amyotrophen Lateralsklerose führen (Rosen et al., 1993).

1.3 Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

Bereits 1869 beschrieben der französische Neurologe Jean-Martin Charcot und sein Kollege Alexis Joffroy eine Erkrankung, die zu einer fortschreitenden Lähmung und schließlich zum Tod zweier Patienten führte. Mit einer weltweiten Inzidenz von 2 pro 100.000 und einer Prävalenz von 3 - 8 pro 100.000 Individuen zählt diese Erkrankung, die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), zu den häufigsten Erkrankungen des motorischen Nervensystems bei Erwachsenen. Die zunehmende Muskelschwäche ist auf eine progressive Degeneration der oberen und unteren Motoneurone

zurückzuführen. Die oberen Motoneurone ziehen vom motorischen Kortex zum Rückenmark und geben Signale vom Gehirn an die unteren Motoneurone weiter, welche anschließend die Skelettmuskeln innervieren. Aufgrund der fehlenden Innervierung der Muskulatur durch die unteren Motoneurone treten hierbei Lähmungserscheinungen mit nachfolgendem Muskelschwund auf. Schäden der oberen Motoneurone äußern sich dagegen in spastischen Lähmungen und einer Hypertonie der Muskeln, da die Kontrolle über den motorischen Kortex unterbrochen ist. Häufig treten zudem unkontrollierbare Muskelzuckungen (Faszikulationen), bis hin zu schmerzhaften Krämpfen auf. Nur ein geringer Prozentsatz der Patienten (20 – 30 %) zeigt einen bulbären Krankheitsbeginn; die ersten Symptome äußern sich hierbei durch Sprach- und Schluckstörungen. In allen anderen Fällen treten die ersten Symptome in den oberen oder unteren Extremitäten auf, die Patienten haben zunächst Probleme mit der Feinmotorik der Hände oder Schwierigkeiten beim Laufen. Im Verlauf der Erkrankung breiten sich die Lähmungserscheinungen auch auf die anderen Extremitäten aus, bis der Patient völlig paralysiert ist. Generell nicht betroffen von der Lähmung ist die vegetative Muskulatur und die Muskeln, welche die Augenbewegungen steuern. Auch die Kontrolle über Blase und Darm bleibt erhalten. Die Krankheitsdauer variiert von wenigen Monaten bis mehreren Jahren, im Schnitt beträgt sie jedoch 3 – 5 Jahre und endet mit dem Tod des Patienten. Durch häufiges Verschlucken von Nahrung oder Speichel im fortgeschrittenen Stadium der ALS können Atemwegsinfektionen auftreten. Zusätzlich ist im späteren Stadium auch die Atemmuskulatur mehr und mehr von der Lähmung betroffen. Aus diesem Grund versterben die Patienten oft an respiratorischer Insuffizienz. In der Regel bricht die Krankheit zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr aus. Sehr viel seltener zeigen sich Symptome vor dem 40. Lebensjahr. Männer erkranken geringfügig häufiger als Frauen (1,5:1). Während das motorische Nervensystem stark von der Krankheit betroffen ist, ist die sensorische Wahrnehmung und die kognitiven Fähigkeiten der Patienten häufig ungestört. In seltenen Fällen kann die ALS mit einer Demenz einhergehen. Auch wenn Krankheitsbeginn und -verlauf von Patient zu Patient sehr stark variieren, gibt es histopathologische Merkmale, die charakteristisch für ALS sind.

1.3.1 Histopathologische Merkmale der ALS

Wichtigstes histopathologisches Kennzeichen der ALS ist die Degeneration von Motoneuronen, die letztendlich die Symptomatik der Krankheit bestimmt. Histologische Schnitte des Rückenmarks von ALS Patienten zeigen vor allem einen starken Rückgang der Motoneurone im ventralen Horn. Noch lebende Motoneuronen weisen häufig histopathologische Veränderungen, wie einen verkleinerten Zellkörper auf. Axonale Schwellungen von 25 µm und mehr werden ebenfalls in den unteren Motoneuronen vor der Degeneration des Zellkörpers beobachtet (Delisle and Carpenter, 1984; Chou

and Norris, 1993). Intrazelluläre Einschlüsse und Aggregate in Neuronen und Gliazellen (Bunina Körperchen [Bunina, 1962; Tomonaga et al., 1978], ubiquitinierte strangartige Einschlüsse [*skein-like inclusions*] [Mizusawa et al., 1991] und Lewy Körper-ähnliche Hyalineinschlüsse [Murayama et al., 1989; Sasaki and Maruyama, 1991] sowie Neurofilamentaggregate [Carpenter, 1968; Hirano et al., 1984; Munoz et al., 1988]) sind ebenfalls histopathologische Kennzeichen der Krankheit. Akkumulation von Neurofilamenten werden hierbei auch mit proximalen Schwellungen der neuronalen Fortsätze assoziiert (Sasaki et al., 1988, 1990). Ein weiteres Merkmal der Erkrankung ist die Gliose, die in diesem Fall die neuroinflammatorische Reaktion des ZNS auf die Degeneration der Motoneurone und die Anreicherung von Gliazellen in beschädigten Bereichen des Nervensystems darstellt (Kawamata et al., 1992; Sargsyan et al., 2005; Neusch et al., 2007). Mitochondrien von ALS Patienten weisen ebenfalls pathologische Veränderungen auf. Elektromikroskopische Untersuchungen ergaben, dass Mitochondrien in Motoneuronen des Vorderhorns von Patienten stark aggregierten und verdichtete Cristae aufwiesen (Sasaki and Iwata, 1996, 1999).

Welche Faktoren diese pathologischen Veränderungen auslösen, ist immer noch weitestgehend unbekannt. Eine Kombination aus Umwelt- und genetischen Faktoren wird vermutet. Schon früh wurde beobachtet, dass innerhalb einer Familie mehrere Individuen von der Erkrankung betroffen sein können, während in anderen Fällen kein familiärer Hintergrund nachgewiesen werden konnte. Man unterscheidet heute deswegen familiäre Formen der ALS (fALS) von sporadisch auftretenden Fällen der Erkrankung (sALS). Klinisch ist die sporadische von der familiären Form jedoch nicht zu unterscheiden. ALS ist bis heute unheilbar. Einzig für den Glutamat-Antagonisten Riluzol (Rilutek®) konnte eine lebensverlängernde Wirkung von etwa drei Monaten nachgewiesen werden (Bensimon et al., 1994; Miller et al., 2007). Die Wirksamkeit weiterer Substanzen wurden von Zoccolella und Kollegen ausführlich zusammengefasst (Zoccolella et al., 2009). Krankengymnastik, Ergotherapie und Logopädie sowie Massagen, aber auch die Gabe krampflösender Mittel können zudem die Lebensqualität der Patienten stark verbessern.

1.3.2 Sporadische und familiäre Formen der ALS

Etwa 90 % aller ALS Fälle treten sporadisch auf. Die Angehörigen der Betroffenen zeigen kein erhöhtes Risiko ebenfalls an ALS zu erkranken. Bei der familiären Form der ALS dagegen leiden neben dem Patienten weitere Familienmitglieder an der Krankheit, weswegen hier von einer genetischen Ursache für die Erkrankung ausgegangen werden kann. Tatsächlich wurden inzwischen zahlreiche Gene identifiziert, die mit fALS, aber auch mit sALS assoziiert werden (Tabelle 19 – Anhang). Weitere mit ALS assoziierte Gene sind unter <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/index.aspx>

aufgelistet.

Viele der hier beschriebenen Mutationen werden zwar autosomal dominant, jedoch häufig mit unvollständiger Penetranz vererbt. Mutationen in einem der mit ALS assoziierten Gene führen somit nicht zwangsläufig zum Ausbruch der Krankheit. Durch die frühe Entdeckung des Zusammenhangs zwischen mutanter SOD1 (SOD1^{mut}) und ALS rückte das Enzym in den Mittelpunkt der Forschung. Zahlreiche Studien sowohl in Patienten als auch in Tiermodellen befassen sich derzeit mit der Pathologie SOD1-vermittelter ALS. Neben der Grundlagenforschung bietet die Arbeit mit Tiermodellen auch eine Möglichkeit Therapien zu entwickeln, die auch bei sporadischer ALS angewendet werden können.

1.3.3 ALS als Folge einer Mutation im Gen der SOD1

Etwa 20 % aller familiären ALS Fälle werden von Mutationen im Gen der SOD1 verursacht. Inzwischen sind mehr als 160 Mutationen in über 80 Aminosäuren der SOD1 bekannt, die zu einer Form der ALS führen können. Die meisten dieser Mutationen sind Punktmutationen, bei denen eine Base gegen eine andere ausgetauscht wird. Die Darstellung dieser Mutationen erfolgt über den Einbuchstabencode der ursprünglichen Aminosäure, die Nummer der Position dieser Aminosäure im Protein und der sie aufgrund der Mutation ersetzenden Aminosäure. Ein Beispiel wäre der Austausch der 90. Aminosäure Aspartat gegen Alanin (D90A). Es handelt sich hierbei um die einzige Mutation, die sowohl autosomal dominant als auch rezessiv vererbt werden kann, während alle anderen SOD1 Mutationen ausschließlich dominant vererbt werden. (Andersen et al., 1995; Khoris et al., 2000; Jonsson et al., 2002). Die einzelnen Mutationen im *sod1* Gen prägen sich stark unterschiedlich auf Krankheitsausbruch und -verlauf aus. Je nach Mutation können die ersten Symptome zwischen dem 30. und 70 Lebensjahr auftreten, der Krankheitsverlauf kann zwischen wenigen Monaten bis zu mehr als 15 Jahren betragen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Durchschnittlicher Krankheitsausbruch und -verlauf in SOD1^{mut}-vermittelter ALS (nach Wang et al., 2008)

Mutation	Krankheitsausbruch [Jahre]	Krankheitsverlauf [Jahre]
A4V	47,7	1,2
G37R	36,9	17,0
G41D	45,2	14,1
G41S	47,9	1,0
G85R	55,5	6,0
G93A	46,0	3,1
G93C	45,8	12,1
sALS	58,4	2,5

Die Mechanismen, die zu der Motoneuronendegeneration durch mutierte SOD1 führen, sind immer noch weitestgehend unbekannt. Transgene Mäuse, die mutante humane oder murine SOD1 exprimieren, zeigen im fortschreitenden Alter einen ALS ähnlichen Phänotyp (Gurney et al., 1994; Dal Canto and Gurney, 1995; Ripps et al., 1995; Bruijn et al., 1997b). Da SOD1 ein wichtiges Enzym der antioxidativen Abwehr darstellt, wurde zunächst angenommen, dass Mutationen im Gen zu einem Verlust der Dismutaseaktivität führen könnten und reaktive Sauerstoffspezies den Untergang der Motoneurone herbeiführen. In Patienten wurde für verschiedene Mutationen eine verringerte SOD1 Aktivität (Bowling et al., 1993; Deng et al., 1993) und erhöhte ROS Mengen nachgewiesen (Said Ahmed et al., 2000). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass einige der mutanten SOD1 Formen, die eine mit dem wildtypischen Protein vergleichbare enzymatische Aktivität aufwiesen, in transgenen Mäusen dennoch eine progressive Motoneuronendegeneration bedingten (Dal Canto and Gurney, 1994; Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995). Mäuse, deren *sod1* Gen inaktiviert worden war, entwickelten sich zudem normal und zeigten keine Symptome einer Motoneuronenerkrankung, wiesen jedoch eine verkürzte Lebensspanne auf (Reaume et al., 1996; Elchuri et al., 2005). Hohe Expressionsspiegel wildtypischer SOD1 lösten ebenfalls keine Degeneration der Motoneurone bei transgenen Mäusen aus (Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995). In Mäusen, die neben einer mutanten SOD1 gleichzeitig hohe Mengen an wildtypischer SOD1 exprimierten, verlief die Erkrankung entgegen aller Erwartungen wesentlich schwerwiegender als in Mäusen, die nur die mutante Form exprimierten (Jaarsma et al., 2000; Fukada et al., 2001; Deng et al., 2006; Wang et al., 2009b). Die Hypothese, dass der Ausfall der enzymatischen Aktivität von

SOD1 das Absterben der Motoneurone bedingt, konnte somit nicht bestätigt werden. Es wird vermutet, dass Mutationen im Gen der SOD1 vielmehr zu einer neu erworbenen toxischen Eigenschaft des Proteins führen. Diese Eigenschaft ist bisher nicht bekannt, es werden jedoch mehrere Mechanismen diskutiert, die den SOD1-vermittelten Neuronenverlust herbeiführen könnten. So ist bekannt, dass die meisten SOD1 Mutationen zu einer Fehlfaltung des Proteins führen. Diese fehlgefalteten Proteine bilden in der Zelle unlösliche, ubiquitinierte Aggregate, die in Mäusen bereits präsymptomatisch nachgewiesen werden konnten und sich im Laufe der Erkrankung weiter ausbreiteten (Bruijn et al., 1998; Stieber et al., 2000a, 2000b). Es ist nicht klar, ob die Bildung dieser Aggregate Ursache oder Folge der Neurodegeneration ist, es wird jedoch angenommen, dass bei ALS fehlgefaltete SOD1 Proteine und intrazelluläre Aggregate die Faltungsmaschinerie der Chaperone blockieren, den proteasomalen Abbau anderer fehlgefalteter Proteine stören, Organellen, wie Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum (ER), schädigen und den axonalen Transport beeinträchtigen. Essentielle Proteine, die mit mutanter SOD1 ko-aggregieren, werden hierdurch aus dem Metabolismus der Zelle entfernt und können somit beträchtlich zur Schädigung der Zelle beitragen. Die Fehlfaltung mutanter SOD1 könnte die im Protein vergrabenen Schwermetalle Kupfer und Zink freilegen sowie die Affinität des Enzyms zu aberranten Substraten erhöhen und somit oxidativen Stress induzieren. Des Weiteren wird Exzitotoxizität stark mit dem Untergang von Neuronen assoziiert. Diese Theorien werden gestützt durch Beobachtungen sowohl in *in vitro*- und *in vivo*-Studien als auch an betroffenen Patienten (Boillée et al., 2006a; Ilieva et al., 2009; Rothstein, 2009).

1.3.3.1 SOD1-vermittelte ALS ist keine zellautonome Erkrankung

SOD1 Proteine werden nicht nur in Motoneuronen, sondern ubiquitär exprimiert. Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass mutante SOD1 nicht nur durch Expression in Motoneuronen, sondern auch in anderen Zelltypen zu der Erkrankung beiträgt. Tatsächlich wurde beobachtet, dass die Expression mutanter SOD1 allein in Motoneuronen zu keiner (Pramatarova et al., 2001; Lino et al., 2002) bzw. zu einem sehr späten Ausbruch der Krankheit mit einem langsamen Verlauf führt (Jaarsma et al., 2008). Die gezielte Expression der murinen Mutation SOD1^{G86R} in Astrozyten führte ebenfalls zu keiner Motoneuronendegeneration (Gong et al., 2000).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression mutanter SOD1 in Motoneuronen den Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs bestimmt, während die Expression mutanter SOD1 in den umliegenden, nicht neuronalen Zellen einen Einfluss auf die Dauer des Krankheitsverlaufs hat (Clement et al., 2003; Ralph et al., 2005; Boillée et al., 2006b; Jaarsma et al., 2008; Yamanaka et al., 2008a, 2008b; Wang et al., 2009c). So wurde gezeigt, dass eine verminderte

Expression von SOD1^{G37R} (Boillée et al., 2006b) und SOD1^{G85R} (Wang et al., 2009c) in den Mikrogliazellen den Krankheitsverlauf bei transgenen Mäusen stark verlangsamte. Auch eine Knochenmarkstransplantation, durch welche wildtypische Mikroglia in Mikroglia-defiziente SOD1^{G93A} Mäuse eingebracht wurden, führte zu einer verlängerten Krankheitsdauer (Beers et al., 2006). Der Ausbruchszeitpunkt der Symptome konnte in allen Studien jedoch nicht verändert werden. Umgekehrt konnten SOD1^{G93A} mutante Mikrogliazellen in Mikroglia-defizienten Mäusen keine Muskelkrankheit auslösen (Beers et al., 2006). Mikrogliazellen sind somit nicht allein verantwortlich für den Ausbruch der Krankheit. Auch die Reduktion von SOD1^{G37R} Proteinen in Astrozyten führte zu einem langsameren Verlauf ohne Einfluss auf den Ausbruchszeitpunkt zu nehmen (Yamanaka et al., 2008b). Möglicherweise spielt hier die verminderte Expression des astrozytären Glutamattransporters EAAT2 (Bruijn et al., 1997b) und die veränderte Regulation der GluR2 Untereinheit in AMPA-Rezeptoren der Neurone durch Astrozyten eine entscheidende Rolle (Van Damme et al., 2005, 2007). Schwannzellen myelinisieren die unteren Motoneurone des peripheren Nervensystem. Die gezielte Reduktion von SOD1^{G37R} Proteinen verkürzte die Lebenszeit von transgenen Mäusen drastisch, ohne sich wiederum auf den Zeitpunkt der ersten Symptome auszuwirken (Lobsiger et al., 2009). Eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufs nach Verminderung mutanter SOD1 in Schwannzellen könnte von der Entfernung einer dismutaseaktiven SOD1 herrühren, da der Verlauf hierdurch vergleichbar wurde mit dem Verlauf von dismutaseinaktiven Mutationen (Jonsson et al., 2004; Lobsiger et al., 2007, 2009). In SOD1^{G93A} transgenen Mäusen konnte die Reduktion mutanter SOD1 in den Muskeln den Phänotyp der Krankheit nicht verändern (Miller et al., 2006).

1.3.3.2 SOD1-positive Proteinaggregate in ALS

Sowohl in fALS und sALS Patienten als auch in SOD1 transgenen Mäusen und Ratten treten Detergenz unlösliche Proteinaggregate auf (Bruijn et al., 1997b, 1998; Watanabe et al., 2001; Howland et al., 2002). In SOD1 transgenen Tieren und bei SOD1-vermittelter fALS ist mutierte fehlgefaltete SOD1 stark in diesen Aggregaten vertreten. Es ist umstritten, ob wildtypische SOD1 ebenfalls in den Aggregaten angereichert ist (Deng et al., 2006; Witan et al., 2009), es konnten allerdings andere Proteine in den unlöslichen Einschlüssen nachgewiesen werden (Watanabe et al., 2001; Pasinelli et al., 2004; Basso et al., 2009; Bergemalm et al., 2010). In sporadischer und familiärer ALS sowie in Tiermodellen ist Ubiquitin häufig in den Aggregaten vertreten (Sasaki and Maruyama, 1991; Bruijn et al., 1997b; Stieber et al., 2000b; Watanabe et al., 2001; Howland et al., 2002). Da Proteinaggregate bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet werden wurde bisher angenommen, dass sie zur Pathologie der Krankheiten beitragen. Für obligatorische SOD1

Dimere konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Aggregationspotential und Toxizität jedoch nicht gezeigt werden (Witan et al., 2008).

1.3.3.3 Fehlgefaltete mutante SOD1 Proteine und Störung des Ubiquitin/Proteasomsystems

Chaperone, wie die Hitzeschockproteine (HSP), sorgen für die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine und können ferner Fehlfaltungen beschädigter Proteine korrigieren. Ist die Faltungsmaschinerie der Chaperone blockiert, kann dies zu einer erhöhten Akkumulation missgefalteter Proteine in der Zelle führen. In SOD1^{G93A} und SOD1^{G85R} transgenen Mäusen zeigte sich im Rückenmark, nicht jedoch in anderen Geweben, bereits präsymptomatisch eine stark verringerte Chaperonenaktivität (Bruening et al., 1999; Tummala et al., 2005). Im Rückenmark transgener Mäusen (SOD1^{G37R}, SOD1^{G85R} und SOD1^{G93A}) wurden erhöhte Chaperonmengen beschrieben (Vleminckx et al., 2002; Wang et al., 2003). Erhöhte Chaperonspiegel dienen möglicherweise der Kompensation einer verminderten Aktivität. Chaperone interagieren mit fehlgefalteten, löslichen SOD1 Proteinen (Zetterstrom et al., 2011) und wurden auch in SOD1 positiven Aggregaten entdeckt (Howland et al., 2002; Basso et al., 2009; Bergemalm et al., 2010). Eine verringerte Chaperonenaktivität in den Motoneuronen könnte sehr schnell zum Tod der Nervenzellen führen. Die Bereitstellung großer Mengen Chaperone wirkte sich neuroprotektiv in kultivierten Motoneuronen aus (Bruening et al., 1999; Batulan et al., 2006), die Überexpression des Hitzeschockproteins HSP70 hatte dagegen keinen positiven Effekt in SOD1 transgenen Mäusen (Liu et al., 2005).

Das Ubiquitin/Proteasomsystem dient dem Abbau irreversibel fehlgefalteter und beschädigter Proteine. Um den proteasomalen Abbau zugeführt werden zu können, werden fehlgefaltete Proteine mit einer Polyubiquitinkette markiert und anschließend im Proteasomapparat degradiert (Schwartz and Ciechanover, 1992; Weissman et al., 2011). Ubiquitinierte Proteine, die in Aggregaten akkumulieren, stören den proteasomalen Abbau und können somit die gesamte Zelle schädigen (Bence et al., 2001). Die Degradation fehlgefalteter SOD1 Proteine erfolgt u. a. ebenfalls über das Proteasom (Hoffman et al., 1996; Niwa et al., 2002; Urushitani et al., 2004). Durch die Aggregation dieser fehlgefalteten, mutanten SOD1 Proteine, nicht jedoch durch wildtypische SOD1, wird der Proteasomapparat gehemmt und der Tod der Zelle eingeleitet (Hyun et al., 2002, 2003; Urushitani et al., 2002; Kabashi et al., 2004; Cheroni et al., 2009). Die Inhibition des Proteasoms führt wiederum zu einer gesteigerten Aggregationstendenz der mutanten SOD1 Proteine (Urushitani et al., 2002; Hyun et al., 2003; Puttaparthi et al., 2003) Hierdurch entsteht ein Teufelskreis, der maßgeblich am Untergang von Motoneuronen beteiligt sein könnte.

1.3.3.4 Mitochondriale Defekte

Pathologische Veränderungen der Mitochondrien treten in vielen neurodegenerativen Erkrankungen auf. Strukturelle Veränderungen der Mitochondrien sind auch ein charakteristisches histopathologisches Merkmal bei ALS (Wong et al., 1995; Sasaki and Iwata, 1996, 1999). Obwohl SOD1 hauptsächlich im Zytosol lokalisiert ist, findet sich ein geringer Teil der Proteine in den Mitochondrien (Chang et al., 1988; Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001). Das Apoenzym wird hierbei über das Transportprotein TOM (*Translocator of the Outer Membrane*) in den Intermembranraum der Mitochondrien eingeschleust, wo CCS es mit Kupfer belädt und die intramolekulare Disulfidbrücke bildet (Sturtz et al., 2001; Field et al., 2003; Kawamata and Manfredi, 2010). Das während der Atmungskette anfallende Superoxid wird in der Mitochondrienmatrix von der Mangan-haltigen SOD2 detoxifiziert (Weisiger and Fridovich, 1973; Fridovich, 1989). Superoxidradikale, die in den Intermembranraum der Organellen vordringen, können von SOD2 aber nicht erreicht werden (Han et al., 2001). Die Lokalisation von SOD1 im Intermembranraum der Mitochondrien stellt somit einen potentiellen Schutz gegen oxidative Schäden dar. Mutante SOD1 Proteine akkumulieren ebenfalls in Mitochondrien (Higgins et al., 2002; Sasaki et al., 2004; Deng et al., 2006) und führten im Rückenmark transgener Mäusen zu vakuolisierten und degenerierten Mitochondrien (Dal Canto and Gurney, 1994; Wong et al., 1995; Jaarsma et al., 2000; Liu et al., 2004). In Zellkulturexperimenten schädigte mutante SOD1 ebenfalls die Mitochondrien neuronaler Zellen (Carri et al., 1997; Liu et al., 2002; Menzies et al., 2002). Durch die Akkumulation und Aggregation mutanter SOD1 Proteine im oder auf dem Mitochondrium (Liu et al., 2004; Deng et al., 2006) könnten die Transportproteine TIM (*Translocator of the Inner Membrane*) und TOM behindert werden, die u.a. nukleär exprimierte Mitochondrienproteine vom Zytosol in den Intermembranraum und die Matrix transportieren. Eine Vermehrung der Mitochondrien wäre somit gestört. Ob mutante SOD1 Proteine eine funktionelle Störung der Mitochondrien hervorrufen, ist umstritten. Während in SOD1^{G93A} transgenen Mäusen die Menge des bei der zellulären Atmung produzierte Adenosintriphosphat (ATP) verringert war (Mattiuzzi et al., 2002; Browne et al., 2006), wiesen SOD1^{G85R} Mäuse keine veränderten ATP Spiegel auf (Damiano et al., 2006). Auch die Auswirkung mutanter SOD1 auf die Aktivität der Atmungskettenkomplexe wurde in verschiedenen Studien unterschiedlich beschrieben (Bowling et al., 1993; Browne et al., 1998; Jung et al., 2002; Mattiuzzi et al., 2002; Damiano et al., 2006). Eine in der Skelettmuskulatur bei sALS Patienten gemessene Beeinträchtigung der zellulären Atmung wurde ausschließlich nach Ausbruch der Symptome beobachtet (Vielhaber et al., 1999; Chung and Suh, 2002; Dupuis et al., 2003). Es lässt sich somit nicht ausschließen, dass es sich hierbei um eine Folge der Muskelatrophie handelt (Boillée et al., 2006a). Mitochondrien erfüllen neben der

zellulären Atmung und Produktion von ATP noch eine wichtige Aufgabe als Kalziumspeicher und zur Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase in der Zelle. Ist die Kalzium Aufnahmefähigkeit der Mitochondrien gestört und untypisch hohe Mengen Kalzium im Zytosol der Zelle, kann dies zu einer verstärkten ROS Produktion führen und den Untergang des Neurons herbeiführen (Dykens, 1994). Die Pufferkapazität der Mitochondrien für Kalzium ist in SOD1^{G93A} exprimierenden Motoneuronen stark beeinträchtigt (Kruman et al., 1999; Damiano et al., 2006). Somit besteht eine direkte Verbindung zur Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität, bei der ein erhöhter zytosolischer Kalziumspiegel als Teil einer ganzen Kaskade letztendlich die Degeneration des postsynaptischen Neurons herbeiführt.

1.3.3.5 Störung des Endoplasmatischen Retikulums

Neben den Mitochondrien dient auch das Endoplasmatische Retikulum (ER) als intrazellulärer Kalziumspeicher und so wie in Mitochondrien akkumulieren mutante SOD1 Proteine auch im ER des betroffenen Gewebes (Kikuchi et al., 2006). Neben seiner Pufferkapazität für Kalzium ist das ER auch ein Ort der Proteinbiosynthese. Dort werden Proteine translatiert, posttranslational modifiziert und korrekt gefaltet. Bei der Ausbildung der Sekundärstruktur der neu synthetisierten Proteine helfen Chaperone, wie das *Binding immunoglobulin Protein* (BiP) oder die Proteindisulfid-isomerase (PDI), die im Lumen des ERs lokalisiert sind (Schröder and Kaufman, 2005; Määttä et al., 2010). BiP wird bei ER Stress induziert, um die Akkumulation missgefalteter Proteine zu verhindern (Kozutsumi et al., 1988; Hurlley and Helenius, 1989). Können fehlgefaltete Proteine nicht repariert werden, wird die *Unfolded Protein Response* (UPR) eingeleitet, die zum einen die gesamte Translationsmaschinerie stoppt, die Aktivität der ER Chaperone erhöht, ER assoziierte Degradation (ERAD) einleitet und als letzten Schritt den Zelltod herbeiführt (Kanekura et al., 2009). Eine Interaktion mutanter SOD1 mit den Chaperonen BiP und PDI konnte im Rückenmark von SOD1^{G85R} transgenen Mäusen und SOD1^{G93A} transgenen Mäusen und Ratten sowie für PDI auch in Zellkulturexperimenten gezeigt werden (Atkin et al., 2006; Kikuchi et al., 2006). In SOD1^{mut} transgenen Mäusen und Ratten sowie in SOD1^{mut} transient exprimierenden Zellen wurden des Weiteren erhöhte Spiegel sowohl von BiP als auch von PDI beschrieben (Tobisawa et al., 2003; Atkin et al., 2006). In murinen NSC-34 Zellen interagierte allerdings auch wildtypische SOD1 zu einem geringeren Anteil mit PDI und induzierte das Chaperon (Atkin et al., 2006). In einem weiteren SOD1^{G93A} Mausmodell konnte keine Erhöhung des ER Stressmarkers BiP gezeigt werden, hier lag allerdings Caspase-12 im Rückenmark präsymptomatischer Tiere in ihrer aktivierten Form vor (Wootz et al., 2004). Durch ER Stress aktivierte Caspase-12 steht am Anfang einer Reaktionskaskade, die den Zelltod einleitet (Nakagawa et al., 2000; Rao et al., 2001). Mutante

SOD1 bindet nicht nur an Chaperone des ERs, sondern stört zusätzlich die ER assoziierte Degradation fehlgefalteter Proteine durch Interaktion mit dem Transmembranprotein Derlin-1. Derlin-1 führt missgefaltete Proteine aus dem ER ins Zytosol, wo diese Proteine anschließend durch das Proteasom abgebaut werden können. Mutante SOD1 Proteine führten so zu ER-Stress-vermitteltem Zelltod über die Apoptose Signal-regulierende Kinase 1 (ASK1) (Nishitoh et al., 2008).

Nicht nur ER-Stress-vermittelte Apoptose stellt eine Gefahr für die Zelle dar. Die Störung des ERs durch mutante SOD1 könnte die Synthese wichtiger Proteine, wie des exzitatorischen Aminosäuretransporter 2 (EAAT2) behindern (Ilieva et al., 2009). Dieses Transportsystem entfernt Glutamat aus dem synaptischen Spalt und spielt damit eine entscheidende Rolle bei der Regulation Glutamat-vermittelter Exzitotoxizität.

1.3.3.6 Exzitotoxizitätshypothese

Neurone werden durch den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat aktiviert. Erhöhte Glutamatspiegel im synaptischen Spalt können jedoch zu einer Dauererregung des postsynaptischen Neurons führen, indem der Transmitter an die in die postsynaptische Membran eingelagerten Glutamatrezeptoren α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptor und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor bindet. Bindet Glutamat an einen dieser Rezeptoren, erhöht sich dessen Permeabilität für Kalzium, welches verstärkt in die Zelle einströmt und sich im Zytosol anreichert. Um die Kalziumhomöostase in der Zelle aufrecht zu erhalten, werden in der Zelle frei liegende Kalziumionen in die Mitochondrien und in das Endoplasmatische Retikulum aufgenommen. Ist die Speicherkapazität der Organellen überschritten oder durch andere Faktoren gestört, löst Kalzium eine Kaskade toxischer Reaktionen aus, die den Tod der Zelle herbeiführen. Man spricht hierbei von Glutamat-vermittelter Exzitotoxizität. Dieser Mechanismus könnte zum Absterben der Motoneurone beim Krankheitsverlauf der ALS beitragen, da in der zerebrospinalen Flüssigkeit von ALS Patienten erhöhte Glutamatspiegel gemessen wurden (Rothstein et al., 1990; Spreux-Varoquaux et al., 2002). AMPA-Rezeptor Antagonisten verlängerten zudem die Lebensspanne SOD1^{G93A} transgener Mäuse (Canton et al., 2001; Van Damme et al., 2003).

Extrazelluläre Glutamatspiegel werden durch den astrozytären Glutamattransporter, EAAT2 (GLT-1 in Nagetieren) reguliert, der den Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt entfernt (Rothstein et al., 1996). Dieser Transport ist im Rückenmark, im motorischen und im somatosensorischen Kortex von ALS Patienten jedoch stark eingeschränkt (Rothstein et al., 1992). Tatsächlich konnte ein starker Rückgang des Glutamattransporters im Rückenmark und im Motorkortex von ALS Patienten nachgewiesen werden (Rothstein et al., 1995), ohne dass die

Transkription des *eaat2* Gens verändert war (Bristol and Rothstein, 1996). Auch SOD1^{G85R} transgene Mäuse und SOD1^{G93A} transgene Ratten zeigten präsymptomatisch und nach Ausbruch der Symptome verminderte Spiegel des Transporters EAAT2 (Bruijn et al., 1997b; Howland et al., 2002). Ebenso inhibierten mutante SOD1 Proteine die Funktion des Transporters unter Einwirkung von H₂O₂ (Trotti et al., 1999), vermutlich durch die aberrante Reaktion der mutanten SOD1 mit H₂O₂ und die hierdurch entstehenden reaktiven Spezies (Trotti et al., 1998). Eine erhöhte Expression von EAAT2 verzögerte den Ausbruch der Krankheit (Guo et al., 2003) und verlängerte in weiteren Studien auch die Lebensspanne SOD1^{G93A} transgener Mäuse (Rothstein et al., 2005; Ganel et al., 2006). Astrozyten schützen ihre benachbarten Nervenzellen zusätzlich, indem sie die Expression der AMPA-Rezeptor Untereinheit GluR2 anregen. Diese Untereinheit bewirkt eine Impermeabilität des Glutamatrezeptors für Kalzium (Hollmann et al., 1991) und schützt das Neuron somit vor Exzitotoxizität. Die Expression mutanter SOD1 Proteine in den Astrozyten verhinderte diese Regulation (Van Damme et al., 2007).

Mutante SOD1 Proteine tragen somit auf verschiedene Weise zu einer Anreicherung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat im synaptischen Spalt bei. Durch gleichzeitige Schädigung der Mitochondrien und des ERs durch mutante SOD1, die ebenfalls zu einer verminderten Kalziumaufnahme und gesteigerter ROS Produktion führt, wird die toxische Wirkung der mutierten Proteine weiter potenziert.

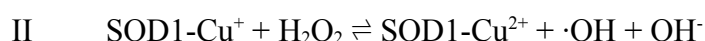
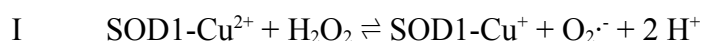
1.3.3.7 Aberrante Enzymaktivität mutierter SOD1 Proteine

Der Austausch einer Aminosäure gegen eine andere kann zu einer Konformationsänderung des mutierten Proteins führen. Röntgenstrukturanalysen von mutanten SOD1 Proteinen zeigten, dass Mutationen im *sod1* Gen hauptsächlich die zylindrische β -Faltblattstruktur und die Dimerisierung zweier SOD1 Proteine stören (Deng et al., 1993; Hough et al., 2004). Weiterhin ist es mithilfe spezifischer Antikörper, die an Epitope binden, welche normalerweise innerhalb der dreidimensionalen Struktur verborgen liegen, möglich, die Fehlfaltung eines mutierten Proteins zu untersuchen. Auch für mutante SOD1 Proteine wurde mit solchen Antikörpern eine Missfaltung des Proteins nachgewiesen (Rakhit et al., 2007; Kerman et al., 2010; Prudencio and Borchelt, 2011).

Vermutlich führen solche Konformationsänderungen zu neuen toxischen Eigenschaften des mutierten SOD1 Proteins. So wurde gezeigt, dass viele Mutationen im *sod1* Gen zu einer verminderten Zink-Affinität und gleichzeitig zu einer verringerten Stabilität des mutierten Proteins führten (Crow et al., 1997a). Da Zink und Kupfer gemeinsam an das Histidin His⁶¹ binden, könnte sich ein Fehlen von Zink auch auf das katalytische Potential des Kupferions auswirken. Eine Konformationsänderung könnte die Schwermetalle Kupfer und Zink der Umgebung zugänglich

machen und es dem katalytischen Kupferion dadurch ermöglichen mit aberranten Substraten zu interagieren (Estévez et al., 1999).

Unter bestimmten Bedingungen kann die katalytische Reaktion der SOD1 auch rückwärts ablaufen und das Enzym aus Wasserstoffperoxid wieder Superoxidanionen und Wasserstoff hervorbringen (I). Über die Fenton-Reaktion reagiert das reduzierte Kupferion erneut mit Wasserstoffperoxid zu Hydroxidionen (OH^-) und hochreaktiven Hydroxylradikalen (II) (Hodgson and Fridovich, 1973; Yim et al., 1990; Zhang et al., 2002; Liochev and Fridovich, 2010).



Mutante SOD1 Proteine besitzen eine erhöhte Peroxidaseaktivität und setzen H_2O_2 als Substrat um (Wiedau-Pazos et al., 1996). Zudem zeigten SOD1^{G93A} Proteine eine erhöhte ROS Produktion (Yim et al., 1996). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies generiert oxidativen Stress in der Zelle. Zusätzlich können Superoxidanionen mit Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit reagieren. Dieses Radikal kann wiederum mit wildtypischer (Ischiropoulos et al., 1992), vor allem aber auch mit mutanter oder Zink-defizienter SOD1 (Crow et al., 1997a; Estévez et al., 1999) reagieren, wobei das entstehende Nitronium-ähnliche Zwischenprodukt die Tyrosinreste von Proteinen nitrieren kann (Beckman et al., 1992, 1993).



Erhöhte Nitrotyrosinspiegel wurden sowohl bei familiären und sporadischen ALS Patienten (Beal et al., 1997; Tohgi et al., 1999) als auch in SOD1^{mut} transgenen Mäusen (Bruijn et al., 1997a; Ferrante et al., 1997) beobachtet. Nitrierung kann zu einer Veränderung der Konformation eines Proteins und zu seiner Inaktivierung führen (Beckman, 1996; Alvarez and Radi, 2003; Radi, 2004; Szabó et al., 2007). Es wurde beobachtet, dass selbst wildtypische SOD1 Neurofilamentproteine nitrieren kann (Beckman, 1996; Crow et al., 1997b). Sollte die Nitrierungsrate von Proteinen durch mutante SOD1 Proteine gesteigert sein, könnte dies ebenfalls eine verstärkte Nitrierung und damit einhergehend Akkumulation der Neurofilamente bedeuten. Dies wiederum könnte sich auf den axonalen Transport auswirken. Auch die Phosphorylierung eines Proteins kann durch eine vorausgegangene Tyrosinnitrierung behindert werden. Dies kann einen enormen Einfluss auf weitere zelluläre Reaktionen nehmen (Martin et al., 1990; Gow et al., 1996; Alvarez and Radi, 2003). Zusätzlich

stellen die in der Reaktion produzierten Radikale eine weitere, direkte Gefahr für die Zelle dar. Während unter physiologischen Bedingungen diese reaktiven Spezies eine wichtige Funktion bei der Signalübertragung und auch bei der Abwehr pathogener Organismen ausüben, führt ein Übermaß an ROS zu oxidativem Stress und dem Untergang der Zelle.

1.3.3.8 Beeinträchtigung des axonalen Transports

Motoneurone können eine Axonlänge von bis zu einem Meter erlangen (z.B. der Nervus ischiadicus). Die Synapsen eines solchen Neurons sind somit weit vom Soma der Zelle entfernt. Dort findet allerdings die Proteinneusynthese statt. Die an der Synapse benötigten Proteine und weitere Komponenten, wie Mitochondrien müssen somit zunächst entlang des Axons bis zur Synapse transportiert werden. Umgekehrt werden Abbauprodukte von der Synapse entlang des Axons zurück zum Zellkörper geführt. Man spricht hierbei von anterogradem und retrogradem axonalen Transport. Zusätzlich muss zwischen einem langsamen und einem schnellen Transport unterschieden werden. Der langsame axonale Transport findet nur vom Zellkörper zu den Synapsen statt, während der schnelle axonale Transport in beide Richtungen verlaufen kann. Axonale Schwellungen und Akkumulation von Neurofilamenten sind histopathologische Charakteristika bei sporadischer und SOD1-vermittelter ALS (Delisle and Carpenter, 1984; Sasaki et al., 1988, 1990; Chou and Norris, 1993; Rouleau et al., 1996). Auch in SOD1^{mut} transgenen Mäusen führt die Expression des mutierten Proteins zu einer Axondegeneration der Motoneurone (Wong et al., 1995; Bruijn et al., 1998). Gleichzeitig beeinträchtigen mutante SOD1 Proteine sowohl den langsamen (Zhang et al., 1997; Williamson and Cleveland, 1999) als auch den schnellen axonalen Transport (Zhang et al., 1997; De Vos et al., 2007; Perlson et al., 2009) in transgenen Mäusen. Neben einer Behinderung des axonalen Transports wurde in SOD1^{G93A} transgenen Mäusen auch eine veränderte Zusammensetzung der retrograden Fracht beobachtet. In den Mäusen wurden vermehrt Stress- und Zelltod-assoziierte Proteine über den retrograden Transport von der Synapse zum Zellkörper befördert (Perlson et al., 2009). Inzwischen ist auch bekannt, dass Mutationen der schweren Neurofilamentuntereinheit sowie der p150^{Glued} Untereinheit des retrograden Motorproteins Dynactin Ursache für einen kleinen Teil der familiären ALS Fälle sind (Figlewicz et al., 1994; Meyer and Potter, 1995; Vechio et al., 1996; Al-Chalabi et al., 1999; Puls et al., 2003; Münch et al., 2004, 2005).

1.3.4 Der Einfluss wildtypischer SOD1 auf die Toxizität mutanter SOD1 Proteine

Dismutaseaktive SOD1 setzt sich aus zwei SOD1 Proteinen zu einem Dimer zusammen. Die meisten SOD1 Mutationen werden autosomal dominant vererbt, wobei der Patient somit neben einem mutanten auch ein wildtypisches *sod1* Allel besitzt. Werden mutante und wildtypische SOD1 Proteine im Patienten exprimiert, so können sowohl zwei wildtypische (wildtypisches Homodimer) als auch zwei mutierte Proteine (mutantes Homodimer) sowie eine wildtypische und eine mutierte Untereinheit (Heterodimer) das Dimer bilden (Deng et al., 1993). Die Frage, ob die Expression eines wildtypischen SOD1 Proteins hierbei schützend wirken könnte, konnte in mehreren Studien widerlegt werden. Entweder hatte die zusätzliche Überexpression wildtypischer SOD1 in SOD1^{mut} transgenen Mäusen keinen Effekt (Bruijn et al., 1998) oder führte zu einem früheren Ausbruch und einer schnelleren Progression der Krankheit (Jaarsma et al., 2000; Fukada et al., 2001; Deng et al., 2006; Wang et al., 2009b).

Wie kann wildtypische SOD1 den Verlauf von ALS nun derart beeinflussen? Um diese Fragen zu klären, wurden am Institut für Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz humane SOD1 Dimere hergestellt, deren Untereinheiten durch einen Peptidlinker verbunden sind (Abb. 2). Heidrun Witan konnte zeigen, dass diese obligatorischen Dimere, bis auf das SOD1^{G85R} Homodimer, eine enzymatische Aktivität aufwiesen. Weiter konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass eine wildtypische Untereinheit die Aggregationstendenz der Dimere deutlich verringerte, dabei aber gleichzeitig die toxischen Eigenschaften der mutanten Untereinheit auf murine N2A Zellen unverändert blieb (SOD1^{G37R}) oder verstärkt wurde (SOD1^{G85R}) (Witan et al., 2008, 2009).

1.4 Zielsetzung

Es konnte gezeigt werden, dass wildtypische SOD1 einen starken Einfluss auf die Krankheitsentwicklung bei SOD1^{mut} transgenen Mäusen hatte (Jaarsma et al., 2000; Fukada et al., 2001; Deng et al., 2006; Wang et al., 2009b). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die direkte Interaktion von wildtypischer und mutanter SOD1 mit veränderten Eigenschaften des resultierenden Dimers einhergingen (Witan et al., 2008, 2009). Ziel dieser Arbeit war es nun, die unterschiedlichen Eigenschaften mutanter Homo- und ihrer korrespondierenden Heterodimere (Abb. 2) sowohl biochemisch als auch biophysikalisch zu analysieren. Hierfür wurden die von Witan et al. generierten obligatorischen humanen SOD1 Dimere aus einem bakteriellen Expressionssystem aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Struktur, ihrer Stabilität gegenüber Proteasen und ihrer Dismutaseaktivität untersucht. Des Weiteren wurden die Dimere für vergleichende Stabilitäts- und Strukturanalysen in HEK-293t Zellen exprimiert.

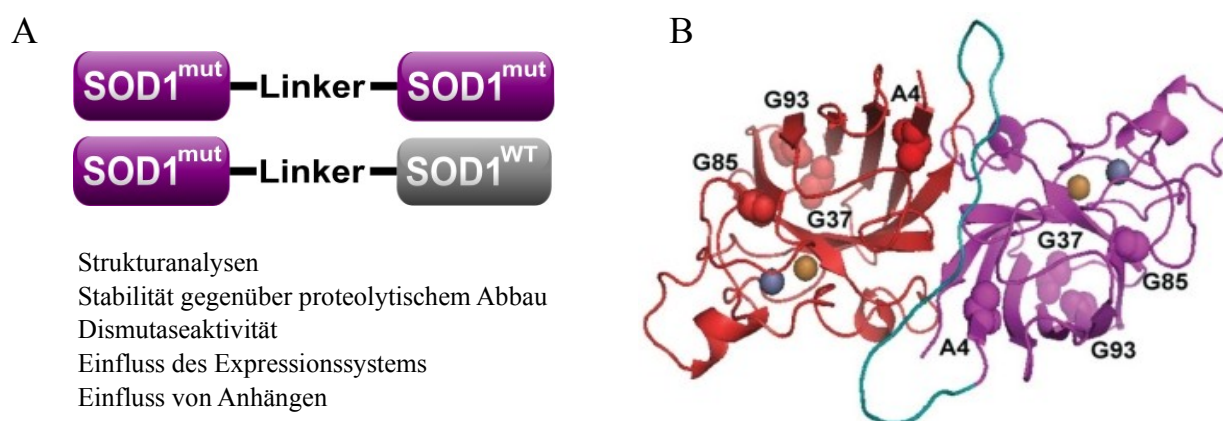


Abb. 2: Biochemische und biophysikalische Charakterisierung mutanter SOD1 Homo- und Heterodimere

A Die cDNA mutanter und/oder wildtypischer SOD1 wurde über einen molekularen Linker miteinander verbunden. Auf diese Weise wurden mutante Homodimere (SOD1^{mut-mut}) und deren korrespondierenden Heterodimere (SOD1^{mut-WT}) hergestellt. Somit lässt sich eine Mutation bezüglich ihrer Homo-, bzw. Heterodimerisierung untersuchen.

B Die berechnete Struktur des obligatorischen SOD1 Dimers weist eine Untereinheit in Rot, die zweite in Violett aus. Der Peptidlinker ist in Blau dargestellt, die gelben und blauen Kugeln repräsentieren die Zink- und Kupferionen jeder Untereinheit. Des Weiteren sind die Positionen der Mutationen A4V, G37R, G85R und G93C markiert. (Witan et al., 2008)

Für die Charakterisierung wurden von den Mutationen A4V, G37R, G41D, G41S, G85R und G93C jeweils das mutante Homodimer (z.B. SOD1⁴⁻⁴) und das entsprechende Heterodimer (SOD1^{4-WT}) miteinander verglichen. Als Kontrolle wurde zusätzlich das wildtypische Heterodimer SOD1^{WT-WT} untersucht. Es wurde gezeigt, dass mutante SOD1 Proteine in den extrazellulären Raum abgegeben und von benachbarten Neuronen aufgenommen werden können. Die Aggregation mutanter SOD1 Proteine in diesen Zellen wird hieraufhin, möglicherweise über einen Prionen-ähnlichen Effekt, induziert (Münch et al., 2011). Hier sollte der Einfluss einer wildtypischen Untereinheit auf die Eigenschaften mutanter SOD1 Heterodimere analysiert und die Mechanismen der Toxizität mutanter SOD1 Proteine untersucht werden.

2. MATERIAL

2.1 Organismen, Zellen, Bakterien

In dieser Doktorarbeit wurde mit der Zelllinie *Human embryonic kidney-293t* (HEK-293t) als *in vitro*- und mit dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*; N2-Linie) als *in vivo*-Modell für die Motoneuronenerkrankung ALS gearbeitet.

Zur Amplifikation der generierten Plasmide, zur Expression der SOD1-Dimerkonstrukte oder als Nahrungsquelle für den Fadenwurm *C. elegans* wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Bakterienstämme verwendet.

Tabelle 2: Bakterienstämme

Bakterienstämme	Hersteller
BL21(DE3)pLysS kompetente Zellen	Promega
E. coli-Dh5α kompetente Zellen	Invitrogen
One Shot TOP10 kompetente Zellen	Invitrogen
HB101	Caenorhabditis Genetics Center (CGC); University of Minnesota

2.2 Plasmide, Primer, siRNA

Die in der Doktorarbeit verwendeten Plasmide und Primer sind in Tabelle 3, 4 und 5 aufgelistet.

Tabelle 3: Plasmide

Vektor	Besonderheiten	Resistenzgen	Hersteller
pCR8/GW/TOPO	TOPO Erkennungssequenz	Spectinomycin	Invitrogen
pEF-BOS	Vektor mit hoher Expressionseffizienz	Ampicillin	Mit freundlicher Unterstützung von Shigekazu Nagata, Kyoto, Japan
pEGFP-N1	Enhanced green fluorescent protein (EGFP) Sequenz	Ampicillin	Clontech

Tabelle 3: Plasmide - Fortsetzung

Vektor	Besonderheiten	Resistenzgen	Hersteller
pET-14b	His-tag kodierende Sequenz (N-terminal) Thrombin Spaltungssequenz	Ampicillin	Novagen
pIRES	Zwei <i>multiple cloning sites</i> (MCS)	Ampicillin, Neomycin	Clontech
pRL1899	Ziel-Vektor zur Injektion von cDNA in <i>C. elegans</i>	Ampicillin	Mit freundlicher Unterstützung von Rueyling Lin, UTSW, Dallas, USA

Tabelle 4: Klonierungsprimer

DNA	Primer	Sequenz
<i>sod1</i> Dimerkonstrukte aus pEGFP-N1 in pFastBac	<i>Kon_pEGFP for</i>	5'-GTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC-3'
	<i>Kon_pEGFP rev2</i>	5'-GTCGACTGCAGAATTCCAGGAGTTATTGGGCG-3'
<i>sod1</i> Dimerkonstrukte aus pFastBac in pET-14b	<i>pFB/NdeI for</i>	5'-GGGCGCGGATCTTATATTCATATGGCC-3'
	<i>pFB/XhoI rev</i>	5'-TGGTACCGCATGCCTCGAGACTG-3'
<i>sod1</i> Dimerkonstrukte aus pFastBac in pIRES (MCS A)	<i>NehI-Dimer for</i>	5'-CTGCTAGCTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG-3'
	<i>Kon_pFB Test rev</i>	5'-TGAATTCCAGGAGTTATTGGGCGATC-3'
<i>sra-6</i> Promotor aus genomischer DNA von <i>C. elegans</i> zur Fusion	<i>sra-6 for</i>	5'-TTAGCAAARGTGGGACGTTG-3'
	<i>sra-6 rev</i>	5'-GGCAAATCTGAATAATAAATA-3'
<i>sod1</i> Dimerkonstrukt-EGFP aus pEGFP zur Fusion	<i>SOD1 for (sra-6)</i>	5'-TATTTATTATTTCAGATTTTGCCCTCAGATCTATG GCCACGAAGG-3'
	<i>SOD1-Dimer rev</i>	5'-TTCAGGGGGAGGTGTGGGA-3'
Fusionsprimer zur Fusion von <i>sra-6</i> und <i>sod1</i> -Dimer-EGFP	<i>sra-6/SOD1 for</i>	5'-GTTGGAAAAAGAATATTAACCTTTTAG-3'
	<i>sra-6/SOD1 rev</i>	5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3'

Tabelle 5: Sequenzierungsprimer

DNA	Primer	Sequenz
pFastBac + <i>sodI</i> Dimer	<i>pFastBac for</i>	5'-GTATTTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG-3'
	<i>Test rev</i>	5'-CCCACACCTCCCCCTGA-3'
pET-14b + <i>sodI</i> Dimer	<i>pet for</i>	5'-GAAATTAATACGACTCACTA-3'
	<i>pet rev</i>	5'-CAAAAAACCCCTCAAGAC-3'
pIRES MCS A + <i>sodI</i> Dimer	<i>T7 for</i>	5'-TAATACGACTCACTATAGGC-3'
	<i>Linker for</i>	5'-ATCTAGAGGTGGCGGCAGT-3'
pIRES MCS B + EGFP	<i>pIRES MCS B_for</i>	5'-GCTGAAGGATGCCCAGAA-3'
	<i>pIRES MCS B_rev</i>	5'-CCAAACTCATCAATGTATCTTAT-3'
TOPO + <i>sodI</i> Dimer	<i>Linker rev</i>	5'-ACTGCCGCCACCTCTAGATT-3'
	<i>SeqSOD1_Mon2_rev</i>	5'-TCGCCCTTGCTCACCAT-3'

Tabelle 6: siRNA für CCS knock down

siRNA	Sequenz
CCS_1	sense: 5'-GGAAUCACUUAACCCUGA-3'
	antisense: 5'-UCAGGGUAAAAGUGAUUCC-3'
CCS_2	sense: 5'-UGGAGGAUGAGCAGCUGAA-3'
	antisense: 5'-UUCAGCUGCUCAUCCUCCA-3'
non sense	sense: 5'-AUUCUCCGAACGUGUCACG-3'
	antisense: 5'-CGUGACACGUUCGGAGAAU-3'

2.3 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper für Immunpräzipitationen

Primäre Antikörper	Spezies	Hersteller
SEDI	Kaninchen	Mit freundlicher Unterstützung von Janice Robertson, University of Toronto, Toronto, Kanada
USOD	Kaninchen	Mit freundlicher Unterstützung von Avijit Chakrabartty, MaRS Discovery District, Toronto, Kanada

Tabelle 8: Primäre Antikörper für Western Blot-Analysen

Primäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-SOD1	Kaninchen (monoklonal)	1:4000	<i>Epitomics</i>
anti- α -Tubulin	Maus (monoklonal)	1:5000	<i>Sigma</i>
anti-His	Maus (monoklonal)	1:1000	<i>Dianova</i>
anti-CCS	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	<i>Santa Cruz</i>

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper für Western Blot-Analysen

Sekundäre Antikörper	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
anti-Maus	Esel	HRP	1:10000	<i>Jackson Immuno Research</i>
anti-Kaninchen	Esel	HRP	1:10000	<i>Jackson Immuno Research</i>

2.4 DNA- und Proteingrößenmarker

Tabelle 10: DNA-Marker

DNA-Marker	Hersteller
<i>MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-us</i>	<i>Fermentas</i>

Tabelle 11: Protein-Marker

Protein-Marker	Hersteller
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	<i>Fermentas</i>

2.5 Enzyme und Restriktionsenzyme

Tabelle 12: Proteasen

Puffer	Hersteller
Thrombin	<i>Novagen</i>
Proteinase K	<i>Roche</i>

Tabelle 13: Restriktionsenzyme

Enzym	Schnittstelle	Restriktionspuffer	Hersteller
<i>Bam</i> HI	G/GATCC	NEBuffer 3 + BSA	<i>New England Biolabs</i>
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	NEBuffer 3	<i>New England Biolabs</i>
<i>Eco</i> RI	G/AATTC	NEBuffer 1-4	<i>New England Biolabs</i>
<i>Nde</i> I	CA/TATG	NEBuffer 4 + BSA	<i>New England Biolabs</i>
<i>Nhe</i> I	G/CTAGC	NEBuffer 2 + BSA	<i>New England Biolabs</i>
<i>Not</i> I	GC/GGCCGC	NEBuffer 3 + BSA	<i>New England Biolabs</i>
<i>Sal</i> I	G/TCGAC	NEBuffer 3 + BSA	<i>New England Biolabs</i>
<i>Xho</i> I	C/TCGAG	Buffer D	<i>Promega</i>

2.6 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 14: Auflistung der im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid 40% (29:1)/Bisacrylamid (AccuGel)	<i>National Diganostics</i>
Agarose	<i>SeaKem</i>
Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat	<i>AppliChem</i>
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	<i>Roth</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ampicillin	<i>Sigma-Aldrich</i>
Antibiotika/Antimycotica	<i>Invitrogen</i>
Bacto Agar	<i>BD</i>
Bacto Peptone	<i>BD</i>
Bacto Tryptone	<i>BD</i>
Borsäure	<i>Merck</i>
Bovine Serum Albumin (BSA)	<i>New England Biolabs</i>
Calciumchlorid (CaCl ₂)	<i>Fluka</i>
Chloramphenicol	<i>Sigma-Aldrich</i>
Cholesterol	<i>Sigma-Aldrich</i>

Tabelle 14: Auflistung der im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Chemikalien - Fortsetzung

Chemikalie	Hersteller
Coomassie Blau G 250	<i>Roth</i>
Desoxyribonucleotidtriphosphate (dNTPs)	<i>Roche</i>
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	<i>Roth</i>
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	<i>Roth</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM)	<i>Invitrogen</i>
ECL Lösung	<i>Pierce; Millipore, eigene Herstellung</i>
EDTA Dinatriumsalz (Na_2EDTA)	<i>Roth</i>
Essigsäure	<i>Merck</i>
Ethanol	<i>Roth</i>
Ethidiumbromid	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ethylendiamintetraazetat (EDTA)	<i>Roth</i>
Fötales Kälberserum (FCS)	<i>Invitrogen</i>
Glycerol	<i>Merck</i>
Glycin	<i>Roth</i>
Harnstoff	<i>Roth</i>
Hefeextrakt	<i>Gibcos</i>
HEPES	<i>Sigma-Aldrich</i>
hSOD1	<i>Sigma-Aldrich</i>
IGEPAL [®] CA-630 (NP-40)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Imidazol	<i>Roth</i>
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	<i>Roth</i>
Kaliumchlorid (KCl)	<i>Roth</i>
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	<i>Roth</i>
Kupfersulfat ($CuSO_4$)	<i>Merck</i>
Luminol	<i>Sigma-Aldrich</i>
Magnesiumsulfat Heptahydrat ($MgSO_4$ [7 H ₂ O])	<i>AppliChem</i>

Tabelle 14: Auflistung der im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Chemikalien - Fortsetzung

Chemikalie	Hersteller
Margermilchpulver	<i>Hill Country Fare, AppliChem</i>
Methanol	<i>Roth</i>
Natrium Pyruvat	<i>Invitrogen</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Roth</i>
Natriumdesoxycholat	<i>Merck</i>
Nickel Sepharose 6 Fast Flow	<i>GE Healthcare</i>
NTA (Nitrilotriacetic acid)	<i>Sigma-Aldrich</i>
ortho-Phosphorsäure	<i>Roth</i>
PAR (4-(2-Pyridylazo)resorcinol)	<i>Sigma-Aldrich</i>
para-Hydroxycoumarinsäure	<i>Sigma-Aldrich</i>
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	<i>Roth</i>
Polythylenglykol (PEG) 6000	<i>Serva Electrophoresis</i>
Ponceau S	<i>Sigma-Aldrich</i>
Protein A Agarose	<i>Sigma-Aldrich</i>
Proteinaseinhibitor Complete	<i>Roche Applied Science</i>
Salzsäure (HCl)	<i>Roth</i>
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	<i>Roth</i>
Spectinomycin	<i>Sigma-Aldrich</i>
Streptomycin	<i>Sigma-Aldrich</i>
Streptomycinsulfat Salz	<i>Sigma-Aldrich</i>
TEMED (N,N,N+,N+-Tetramethylethyldiamin)	<i>Bio-Rad</i>
Tris	<i>Roth</i>
Trypsin	<i>Invitrogen</i>
Tween20	<i>Roth</i>
Uracil	<i>Sigma-Aldrich</i>
Zinksulfat (ZnSO ₄)	<i>Sigma-Aldrich</i>
β-Mercaptoethanol	<i>Roth</i>

Tabelle 15: Auflistung der im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Reagenzienansätze

Name	Verwendung	Hersteller
<i>BCA Protein Assay Reagent</i>	Proteinbestimmung	<i>Pierce/Thermo Scientific</i>
<i>Gateway LR Clonase II Enzyme Mix</i>	zur Klonierung mittels Rekombination	<i>Invitrogen</i>
<i>GenElute HP Plasmid Midiprep Kit</i>	Plasmid-DNA Aufreinigung	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>MAXI Columns Kit</i>	Plasmid-DNA Aufreinigung	<i>JETSTAR 2.0</i>
<i>NucleoSpin Extract II</i>	Gel-Extraktion	<i>Macherey-Nagel</i>
<i>NucleoSpin Plasmid</i>	Plasmid-DNA Aufreinigung	<i>Macherey-Nagel</i>
<i>pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit</i>	Klonierung von Taq- Polymerase-amplifizierten PCR Produkten in einen Vektor des Gateway Systems	<i>Invitrogen</i>
<i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	DNA-Ligation	<i>Roche</i>
<i>SOD Assay Kit-WST</i>	Dismutaseaktivitätsmessung von SOD1-Proteinen	<i>Probior GmbH</i>
<i>Thrombin Cleavage Capture Kit</i>	Abspaltung des Histidin-Anhangs der rekombinanten SOD1 Dimere	<i>Novagen</i>

2.7 Puffer und Lösungen

2.7.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeitsmethoden

1 x TBE

Tris	90 mM
Borsäure	90 mM
Na ₂ EDTA	1,2 mM
pH 8,0	

Ethidiumbromid-Lösung

1 x TBE	100 ml
Ethidiumbromid (5 mg/ml)	100 µl

LB-Medium

BactoTryptone	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	1,2 mM
ad ddH ₂ O	1 L
pH 7,5	

TSS-Puffer (Transformation & Storage Solution)

Polythylenglykol (PEG) 6000	10 %
DMSO	5 %
MgSO ₄ (7 H ₂ O)	50 mM
ad LB-Medium	100 ml
pH 6,5	

2.7.2 Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeitsmethoden**Kulturmedium**

DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	500 ml
Natrium Pyruvat	1mM
Antibiotika/Antimycotica	5 ml
FCS (fötales Kälberserum)	10 %

1 x PBS (steril filtriert)

NaCl	0,137 M
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
pH 7,4	

2x HBS (steril filtriert)

NaCl	280 mM
Hepes	50 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
pH 7,12	

2.7.3 Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung

Expressionsmedium

LB-Medium	250 ml
CuSO ₄	0,5 mM
ZnSO ₄	0,2 mM
Ampicillin	50 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml

Lysispuffer

KCl	300 mM
KH ₂ PO ₄	50 mM
Imidazol	5 mM
pH 8,0	

Waschpuffer

KCl	300 mM
KH ₂ PO ₄	50 mM
Imidazol	10 mM
pH 8,0	

Elutionspuffer

KCl	300 mM
KH ₂ PO ₄	50 mM
Imidazol	250 mM
pH 8,0	

2.7.4 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeitsmethoden

4 x SDS-Trenngelpuffer

Tris	1,5 M
SDS	0,4 %
pH 8,8	

4 x SDS-Sammelgelpuffer

Tris	0,6 M
SDS	0,4 %
pH 6,8	

4 x SDS Ladepuffer

Tris, pH 6,8	200 mM
Glycerol	40 %
Bromphenolblau	0,02 %
SDS	8 %
β-Mercaptoethanol	20%

1 x SDS-Laufpuffer

Tris	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1 %

1 x Transferpuffer

Tris	25mM
Glycin	250 mM
Methanol	20 %

Ponceau Lösung

Ponceau S	0,025 %
Essigsäure	1 %

1 x PBS

NaCl	0,137 M
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
pH 7,4	

1 x PBST

1 x PBS	1L
Tween20	0,05 %

ECL (enhanced chemiluminescence) LösungLösung A

Luminol	50 mg
0.1 M Tris-HCl	200 ml
pH 8,6	

Lösung B

para-Hydroxycoumarinsäure	11 mg
DMSO	10 ml

Kolloidale Coomassie-Lösung

Coomassie Blau G250	0,02 %
Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat	5 %
Ethanol (99 %, p.a.)	10 %
ortho-Phosphorsäure (100 %)	2 %

Coomassie Entfärberlösung

Ethanol (99 %, p.a.)	10 %
ortho-Phosphorsäure (100 %)	2 %

4 x nativer Trenngelpuffer

Tris	1,5 M
pH 8,8	

4 x nativer Sammelgelpuffer

Tris	0,6 M
pH 6,8	

2 x nativer Ladepuffer

Tris, pH 6,8	200 mM
Glycerol	20 %
Bromphenolblau	0,04 %
NP-40	0,4 %

1 x nativer Laufpuffer

Tris	50 mM
Glycin	50 mM

50 mM KPO₄ Lösung

K ₂ HPO ₄ (1M)	45,4 ml
KH ₂ PO ₄ (1M)	4,6 ml
ddH ₂ O	1 L
pH 7,8	

Färbelösung für Aktivitätsgel

50 mM KPO ₄ , pH 7,8	25 ml
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	275 µg/ml
Riboflavin	65 µg/ml
TEMED	80 µl

RIPA-Puffer

Tris, pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1 %
Natriumdesoxycholat	0,5%
EDTA	1 mM

2.7.5 Puffer und Lösungen für Arbeiten mit *C. elegans*

1 x PPB

KH_2PO_4	0,72 M
K_2HPO_4	0,28 M
pH 6,0	

Nematode growth media (NGM)

NaCl	1,5 g
Bacto Peptone	1,25 g
Bacto Agar	8 g
ddH ₂ O	0,5 L

Lösung autoklavieren und vor dem Gießen der Platten folgende, steril filtrierte, bzw. autoklavierte Lösungen unter Rühren zu dem Agar geben:

1 M PPB, pH 6,0	12,5 ml
1 M CaCl_2	0,5 ml
1 M MgSO_4	0,5 ml
Uracil (2 mg/ml)	0,5 ml
Cholesterol (5 mg/ml)	0,5 ml
Streptomycin (200 mg/ml)	0,3 ml

1 x M9-Medium

Na_2HPO_4	40 mM
KH_2PO_4	20 mM
NaCl	9 mM
NH_4Cl	20 mM

Lösung autoklavieren.

2 x Einfriermedium

NaCl	100 mM
PPB	50 mM
Glycerol	30 %
MgSO_4	0,3 mM

Lösung autoklavieren.

2.8 Geräte

Tabelle 16: Auflistung der im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschränke	<i>Binder</i>
<i>C. elegans</i> Injektionsmikroskop; DMIRB	<i>Leica</i>
<i>FemtoJet Microinjector</i>	<i>Eppendorf</i>
Fluoreszenzmikroskop, <i>MZ10 F</i>	<i>Leica</i>
FPLC-System	<i>Bio-Rad</i>
Heizblock; <i>Thermomixer comfort</i>	<i>Eppendorf</i>
Laser-Scanning-Mikroskop; <i>LSM 710</i>	<i>Carl Zeiss</i>
Luminometer	<i>Wallac Inc., PerkinElmer</i>
Mikrotiterplatten-Lesegerät, <i>Multiskan RC</i>	<i>Thermo Labsystems</i>
<i>Mini Trans-Blot Cell System</i>	<i>Bio-Rad</i>
<i>Mini-PROTEAN 3 Cell System</i>	<i>Bio-Rad</i>
<i>Agagel Mini</i>	<i>Biometra</i>
Zentrifuge; <i>RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge</i>	<i>Sorvall</i>
Spektralphotometer; <i>Nanodrop 1000</i>	<i>PeqLab</i>
Stereomikroskop <i>SZ61</i>	<i>Olympus</i>
Thermozykler	<i>Biometra®</i>
Tipsonikator	<i>Micro Ultrasonic Cell Disruptor, Kontes</i>
Tischzentrifuge	<i>Hettich</i>
Tischzentrifuge, <i>Heraeus Fresco 17</i>	<i>Thermo Scientific</i>
Entwicklermaschine, <i>LAS-3000</i>	<i>Fuji</i>
Wurminjektionsvorrichtung, <i>TransferMan NK2</i>	<i>Eppendorf</i>

2.9 Software

Tabelle 17: Auflistung der im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Software

Verwendung	Software
Bildbearbeitung	<i>Gimp</i>
Statistische Auswertung	<i>SPSS; calc (Libre Office)</i>
Densitometrische Analysen	<i>ImageJ</i>
Laser-Scanning-Software	<i>ZEN software (Zeiss)</i>
Proteinberechnung	<i>Ascent Software v.2.6</i>

3. METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction; PCR*) dient der Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes. Mithilfe einer Polymerase und zwei Oligonukleotiden (*Primern*), die ein bestimmtes DNA-Stück flankieren, kann dieser Abschnitt unter Verwendung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) innerhalb kurzer Zeit exponentiell vervielfältigt werden (Mullis et al., 1986). Die *Taq*-Polymerase wurde für PCRs verwendet, bei denen die amplifizierte DNA ausschließlich im Gel analysiert und anschließend nicht weiter verwendet wurde. Für die PCR zur Amplifikation bestimmter cDNA-Abschnitte zu Testzwecken wurden 25 µl angesetzt und die *Taq*-Polymerase verwendet.

dNTPs (5 mM)	0,5 µl
Primer for (10 µM)	1 µl
Primer rev (10 µM)	1 µl
10 x <i>Taq</i> -Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	0,75 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,1 µl
cDNA	1 µl
ddH ₂ O	18,15 µl

Neben der *Taq*-Polymerase wurde auch die rekombinante *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase (*Finnzymes*) verwendet. Diese Polymerase besitzt, verglichen mit der *Taq*-Polymerase, eine 50-fach geringere Fehlerrate und wurde speziell für PCRs eingesetzt, bei denen die amplifizierte DNA anschließend für weitere Verwendungszwecke präpariert werden sollte. Anders als bei der *Taq*-Polymerase wurde die DNA unter Verwendung der *Phusion*-Polymerase bei 98 °C für 30 sec denaturiert.

Für präparative Zwecke wurde die *Phusion*-Polymerase in insgesamt 50 µl angesetzt:

dNTPs (5 mM)	2 µl
Primer for (10 µM)	2,5 µl
Primer rev (10 µM)	2,5 µl
<i>Phusion</i> Puffer (HF)	10 µl
<i>Phusion</i> -Polymerase	0,5 µl
cDNA	1 µl
ddH ₂ O	31,5 µl

Alle PCRs wurden in Thermozyklern von *Biometra* durchgeführt.

3.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die Poren eines Agarosegels in Richtung Anode. Hierbei passieren kleinere Moleküle die Poren des Gels schneller als größere, sodass nach einer Inkubation mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid die unterschiedlich großen DNA-Fragmente ein charakteristisches Bandenmuster im Gel zeigen. Für die Auftrennung der DNA wurde vertikale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden 0,75 %, bzw. 1,5 % Agarosegele hergestellt. Die entsprechende Menge Agarose wurde hierzu in 1 x TBE Puffer aufgekocht und in die Gelapparatur (*Agagel Mini*, *Biometra*) gegossen. Zu den aufzutragenden Proben wurde 6 x Orange-G-Puffer gegeben. Jeweils 5 µl dieser Ansätze wurde bei 100 mA aufgetrennt und die Gele anschließend für einige Minuten in einem Ethidiumbromidbad inkubiert, sodass die DNA-Banden unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert werden konnten. Als Größenmarker wurde der *MassRuler™ DNA Ladder Mix* von *Fermentas* (103 ng/µl) benutzt.

3.1.3 Gelextraktion

Es ist es möglich gezielt DNA-Fragmente aus einem Gel aufzureinigen. So können z.B. amplifizierte DNA-Fragmente auf dem Gel aufgetrennt und die DNA anschließend zurückgewonnen werden. Für präparative Aufreinigungen wurden die entsprechenden Banden direkt aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mithilfe des *NucleoSpin® Extract II* Kits von *Macherey-Nagel* extrahiert. Die Elution der DNA von den Säulchen des Kits erfolgte mit 20 µl H₂O.

3.1.4 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind spezielle bakterielle Enzyme, welche die Phosphodiesterbindung von DNA-Molekülen an definierten DNA-Sequenzen, den Schnittstellen des jeweiligen Restriktionsenzym, spalten können. Um eine maximale Enzymaktivität zu erhalten werden Restriktionen bei 37 °C in Puffern mit geeigneten Salzkonzentrationen durchgeführt.

Restriktionen wurden dazu genutzt, die Zusammensetzung eines Plasmids zu überprüfen, indem mit ausgewählten Enzymen ein Verdau der DNA durchgeführt und der Ansatz anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt wurde. Die durch die Restriktion resultierenden Fragmente gaben dabei Aufschluss über die Zusammensetzung des Plasmids. Für einen Testrestriktionsverdau wurde ein Reaktionsvolumen von 10 µl angesetzt, der Ansatz 1 h inkubiert und die Proben im Gel analysiert.

DNA	2,5 µl
Puffer	1 µl
BSA (wenn nötig)	0,1 µl
Restriktionsenzym I	0,25 µl
Restriktionsenzym II	0,25 µl
H ₂ O	5,9 µl

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Zielvektor wurden beide DNA-Moleküle mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt. Die dabei entstehenden Überhänge in den DNA-Strängen beider Moleküle wurden anschließend während der Ligation wieder miteinander verknüpft. Für diese präparativen Restriktionen wurden je 60 µl angesetzt, um genügend DNA für die anschließende Ligation zu erhalten und der Ansatz 2 h inkubiert.

DNA (aus der Gelextraktion)	20µl
Puffer	2,5 µl
BSA (wenn nötig)	0,25 µl
Restriktionsenzym I	0,5 µl
Restriktionsenzym II	0,5 µl
H ₂ O	1,25 µl

Während des Restriktionsverdaus wurden die Vektoren zusätzlich mit Alkalischer Phosphatase aus Garnelen (*Shrimp Alkaline Phosphatase [SAP], USB*) behandelt. Alkalische Phosphatase dephosphoryliert die DNA an ihrem 5'-Ende, wodurch eine Religation des linearisierten Vektors bei der anschließenden Ligation verhindert wird.

3.1.5 Ligation

Bei der Ligation werden DNA-Fragmente mithilfe des Enzyms DNA-Ligase unter Bildung einer Phosphodiesterbindung verbunden. Für Ligationen wurden 25 ng Vektor DNA eingesetzt und die fünffache Menge der einzubringenden DNA hinzugefügt. Es wurde das *Rapid DNA Ligation* Kit (*Roche*) verwendet und die Ansätze für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Ligation wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellen (*E.co DH5α*) (*Invitrogen*) oder BL21(DE3)pLysS Bakterien (*Promega*) mit den Vektorkonstrukten transformiert.

3.1.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien nach Chung und Kollegen (Chung et al., 1989) wurden Über-Nacht-Kulturen kommerzieller *EcoDH5α*, bzw. BL21(DE3)pLysS angesetzt und 100 ml LB-Medium mit 1 ml dieser Über-Nacht-Kulturen angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD_{600 nm} von 0,3 - 0,4 herangezogen. Die Bakterien wurden anschließend bei 3.000 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 1/10 eiskaltem TSS-Puffer (ausgehend vom Ausgangsvolumen) resuspendiert. Die Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigen Stickstoff gegeben und bei -80 °C gelagert.

3.1.7 Transformation und Selektion

Die Aufnahme einer Fremd-DNA z.B. eines Vektorkonstrukts durch kompetente Bakterienzellen, wird als Transformation bezeichnet. Die Teilung der Zellen und damit die Weitergabe der Fremd-DNA an die Tochterzellen führt zu einer Vervielfältigung dieser DNA.

Für die hier verwendete Hitzeschock-Transformation wurden kompetente *E.coli-Dh5α* und BL21(DE3)pLysS Zellen verwendet. Zur Transformation wurde das Plasmid zu den Bakterienzellen gegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 2 min in einen Heizblock bei 42 °C und die Proben wurden für kurze Zeit wieder auf Eis gestellt. Zu den Ansätzen wurde je 1 ml LB-Medium gegeben und die Bakterien bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator für 1 h inkubiert. Je nach Resistenzgen des Vektorkonstrukts wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Um diejenigen Zellen zu vervielfältigen, die auf den LB-Agarplatten trotz des Selektions-Antibiotikums wachsen konnten und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit das Vektorkonstrukt mit der entsprechenden Antibiotika-Resistenz enthielten, wurden Über-Nacht-Kulturen der

entsprechenden Bakterienklone angesetzt. Die auf den Platten der Transformation gewachsenen Kolonien wurden hierfür mit sterilen Pipettenspitzen in Röhrchen überführt, die Antibiotikahaltiges LB-Medium enthielten. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Aus den Über-Nacht-Kulturen ließen sich durch Plasmidpräparation die Vektorkonstrukte zurückgewinnen. Für eine Mini-Präparation mit einer geringeren DNA-Ausbeute wurden Bakterienkolonien einer Platte jeweils in ein Röhrchen mit 4 ml LB-Medium überführt. Für eine Midi-Präparation wurden zu 50 ml LB-Medium 1 ml einer vorangegangenen Über-Nacht-Kultur und für eine Maxi-Präparation zu 250 ml LB-Medium 2 ml aus einer vorangegangenen Über-Nacht-Kultur gegeben. Um das Wachstum anderer Bakterien in den Über-Nacht-Kulturen zu vermeiden, wurde das LB-Medium mit einem Selektions-Antibiotikum versetzt.

3.1.8 Plasmidpräparation

Bei der Plasmidpräparation werden in Bakterienzellen vervielfältigte Vektorkonstrukte aus den Bakterien aufgereinigt. Mini-, Midi- und Maxi-Präparation bezeichnet hierbei die Menge an Ausgangsmaterial und damit an Vektor-DNA, die aus den Bakterienzellen präpariert wird.

Die Mini-Präparation erfolgte mit dem *NucleoSpin® Plasmid* Kit (*Macherey-Nagel*), wobei die Plasmid-DNA anschließend mit 50 µl H₂O von den Säulchen des Kits eluiert wurde. Für die Midi-Präparationen wurde das *GenElute™ HP Plasmid Midiprep* Kit (*Sigma-Aldrich*) verwendet. Um eine große Menge an Vektorkonstrukt zu erzielen, wurde für Maxi-Präparationen die Vektor-DNA mit dem Präparationskit von *JETSTAR 2.0* präpariert.

3.1.9 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma *GENterprise GmbH*, Mainz, durchgeführt. Für eine Sequenzierung wurden je 0,4 – 0,7 µg DNA mit 1 µl Primer angesetzt und mit ddH₂O auf 6 µl aufgefüllt.

3.1.10 Herstellung der *sodI* Dimerkonstrukte

Die in dieser Arbeit verwendeten *sodI* Dimerkonstrukte wurden von Heidrun Witan am Institut für Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz generiert und im pEGFP-N1-Vektor zur Verfügung gestellt (Witan et al., 2008, 2009). Für verschiedene Analysen wurden die Konstrukte in mehrere Vektoren (siehe Anhang) kloniert. Hierfür wurde die cDNA der Dimerkonstrukte zunächst aus dem pEGFP-N1-Vektor mit den Primern *Kon_pEGFP for* und

Kon_pEGFP rev2 amplifiziert, wodurch zum einen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bgl*II und *Eco*RI für die Klonierung zur Verfügung standen und zum anderen unmittelbar hinter die cDNA des *sod1* Dimerkonstrukts ein Stoppcodon eingefügt und die EGFP-Domäne entfernt wurde. Über die Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI und *Eco*RI im pFastBac-Vektor wurde die amplifizierte cDNA des *sod1* Dimerkonstrukts in den pFastBac-Vektor eingefügt. Nach einer Mini-Präparation des Vektorkonstrukts wurde die Sequenz per Sequenzierung mit den Primern *pFastBac for* und *Test rev* überprüft.

Im Folgenden soll die Generierung der weiteren, in dieser Arbeit verwendeten, Vektorkonstrukte erläutert werden.

3.1.10.1 *Sod1* Dimerkonstrukte im pET-14b-Vektor

Zur Expression der SOD1 Dimere in BL21(DE3)pLysS Bakterien wurde die cDNA der *sod1* Dimerkonstrukte in den pET-14b-Vektor (*Novagen*) kloniert. Mithilfe der Primer *pFB/NdeI for* und *pFB/XhoI rev* wurden die Restriktionsschnittstellen für *Nde*I und *Xho*I an die cDNA angefügt. Sowohl das Amplifikat als auch der pET-14b-Vektor wurden mit diesen Enzymen restringiert und anschließend miteinander ligiert. Durch die Klonierung der Dimerkonstrukte in den pET-14b-Vektor wurde N-terminal an die cDNA der *sod1* Dimerkonstrukte ein sechsfacher Histidin-Anhang (Histidin-tag) angefügt. Dieser Histidin-tag erleichtert die Aufreinigung der Proteine. Das Vektorkonstrukt wurde anschließend nach einer Mini-Präparation durch die Primer *pet for* und *pet rev* sequenziert.

3.1.10.2 *Sod1* Dimerkonstrukte im pIRES-Vektor

Der pIRES-Vektor (*Clontech Laboratories*) ist ein Vektor, der zwei multiple Klonierungsstellen (*multiple cloning sites*; MCS) enthält.

Zunächst wurde aus dem pEGFP-N1-Vektor die cDNA für EGFP mithilfe der Restriktionsenzyme *Sal*I und *Not*I herausgeschnitten und in die MCS B des pIRES eingefügt. Nach einer Mini-Präparation wurde die MCS durch die Primer *pIRES MCS B_for* und *pIRES MCS B_rev* sequenziert.

Die Primer *Neh1-Dimer for* und *Kon_pFB Test rev* wurden verwendet, um die cDNA der *sod1* Dimerkonstrukte aus dem pFastBac-Vektor zu amplifizieren, um sie dann anschließend mit *Neh*I und *Eco*RI zu restringieren und in die MCS A des pIRES-Vektors zu klonieren. Auch hier wurden die Vektorkonstrukte mittels Mini-Präparation aufgereinigt und eine Sequenzierung mit den Primern *T7 for* und *Linker for* durchgeführt.

3.1.10.3 Fusions-PCR zur Herstellung transgener *C. elegans*

Für die Herstellung transgener *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*, s. Abschnitt 3.6) wurden die *sod1* Dimerkonstrukte SOD1^{WTWT}-EGFP, SOD1^{85WT}-EGFP und SOD1⁸⁵⁸⁵-EGFP unter die Kontrolle des Promotors des *Serpentine Receptor, class A (sra-6)*-Gens gebracht. SRA-6 wird im Wurm u.a. in den ASH-Neuronen exprimiert, die der osmo- und mechanosensorischen Wahrnehmung dienen. Hierbei wurden nach dem Fusions-PCR-Protokoll von Oliver Hobert (Oliver Hobert, 2002) vorgegangen.

Zur Amplifikation des *sra-6* Promotors wurde dieser zunächst aus 10 ng/µl genomischer DNA von *C. elegans* amplifiziert, indem der Bereich zwischen dem Gen F35H8.1 und dem *sra-6* Gen mit den Primern *sra-6 for* und *sra-6 rev* flankiert wurde. Für die PCR wurde die *Phusion*-Polymerase verwendet und da das zu amplifizierende DNA-Stück knapp 3000 Basenpaare (bp) umfasste, die Elongationszeit der DNA auf 1,5 min verlängert.

Um die *sod1* Dimerkonstrukte unter die Kontrolle des Promotors von *sra-6* zu bringen, musste der Promotor und die cDNA von SOD1 fusioniert werden. Aus diesem Grund wurde für die Amplifikation der *sod1* cDNA ein *forward*-Primer gewählt (*SOD1 for (sra-6)*), welcher einen 32 bp-Überhang generiert, der homolog zu einem Teil der Sequenz des *sra-6* Promotors ist und somit die Fusion der beiden Amplifikate ermöglicht. Die Vervielfältigung der cDNA der *sod1* Dimerkonstrukte erfolgte aus dem pEGFP-N1-Vektor, sodass an das SOD1 Dimer zusätzlich eine EGFP-Domäne gekoppelt wird.

Um die Amplifikate aus der *sod1*- und der *sra-6*-Promotor-PCR miteinander zu verbinden, wurden jeweils 10 ng für eine Fusions-PCR eingesetzt und Primer verwendet, welche vor dem *sra-6* Promotor (*sra-6/SOD1 for*) und hinter der EGFP-Domäne des SOD1 Konstrukts (*sra-6/SOD1 rev*) binden konnten. Über diese Primer und den 32 bp-Überhang des *sod1*-Amplifikats erfolgte die Fusion der beiden DNA-Fragmente, sodass der *sod1* cDNA der *sra-6* Promotor vorangestellt war.

Durch Injektion dieser cDNA in die Gonaden des Fadenwurms *C. elegans* (s. 3.6.2 Herstellung transgener *C. elegans*) wurde gewährleistet, dass nur in solchen Zellen, in denen SRA-6 exprimiert wird, auch die SOD1 Dimere exprimiert wurden.

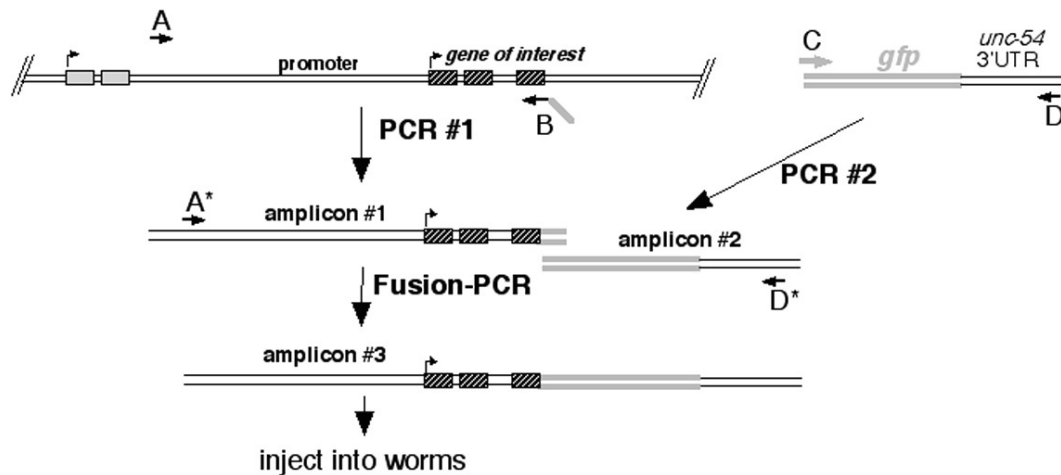


Abb. 3: Fusions PCR, Hobert, 2002

3.1.10.4 TOPO TA-Klonierung

Um die durch die Fusions-PCR generierte *sra-6/sod1* cDNA in den zur Injektion von *C. elegans* verwendeten Zielvektor zu klonieren, wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte zunächst mithilfe des *pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kits* (Invitrogen) in den TOPO-Vektor (Invitrogen) gebracht und schließlich über Rekombination in den Zielvektor pRL1899 (zur Verfügung gestellt von Rueyling Lin, UTSW, Dallas, USA) eingeschleust.

Da bei Elongation mit der *Phusion* DNA-Polymerase Fragmente mit glatten Enden entstehen, für die Klonierung in den TOPO-Vektor allerdings DNA-Fragmente mit Adenosin-Überhang benötigt werden, wurde in einem ersten Schritt an die glatten Enden der Fragmente mithilfe der *Taq*-Polymerase ein Adenosin angehängt. Der Ansatz wurde 30 min bei 70 °C inkubiert.

DNA aus Fusions-PCR	7 µl
dATPs (2 mM)	1 µl
10x <i>Taq</i> -Puffer + Mg ₂ Cl	
(24,25 µl <i>Taq</i> -Puffer + 0,75 µl 50mM Mg ₂ Cl)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1 µl

Anschließend wurden diese Fragmente für 5 min bei 25 °C mit dem TOPO-Vektor ligiert.

DNA aus Fusions-PCR mit Adenosin-Überhang	4 µl
TOPO-Salze	1 µl
TOPO-Vektor	1 µl

Es erfolgte die Aufreinigung der Vektorkonstrukte mittels Mini-Präparation und die Sequenzierung durch die Primer *Linker rev* und *SeqSOD1_Mon2_rev*.

3.1.10.5 LR-Rekombination

Nach erfolgter Klonierung der *sra-6/sod1*-Konstrukte in den TOPO-Vektor wurden diese letztlich mit dem *Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen)* in den Zielvektor pRL1899 eingeschleust.

pRL1899	150 ng
TOPO-Vektor mit <i>sra-6/sod1</i> -cDNA	150 ng
ddH ₂ O (autoklaviert)	8 µl
LR-Clonase	2 µl

Nach 1 h bei 25 °C wurde dem Ansatz 1 µl Proteinase K (*Invitrogen*) hinzugefügt und weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Vektorkonstrukte wurden in einer Midi-Präparation aufgereinigt und für die Injektion in *C. elegans* verwendet.

3.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Die hier verwendeten HEK-293t Zellen wurden in Brutschränken bei 37 °C mit 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Als Kulturmedium wurde *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), versetzt mit Pyruvat (1:100), Antimycotikum und Antibiotikum (1:100) und 10 % fötalem Kälberserum (FCS) (*Invitrogen*), verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (Greiner Bio-One) mit einer Wachstumsfläche von 58 cm² kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2.2 Transfektion von Zellen

Zur Expression der SOD1 Dimere in HEK-293t Zellen wurden die *sod1*-Vektorkonstrukte in diese eingebracht. Hierzu wurden die Zellen mithilfe der Kalziumphosphatpräzipitation nach Chen und Okayama (Chen and Okayama, 1988) transient transfiziert. Dabei entstehen durch die Reaktion von Kalziumchlorid (CaCl_2) und eines Phosphatpuffers schwerlösliche Kalziumphosphatpräzipitate. An diese bindet die DNA und wird von den zu transfizierenden Zellen mittels Endozytose aufgenommen.

Für die Transfektion wurden 10 µg DNA zu 420 µl H_2O pipettiert. Zu diesem Ansatz wurden 60 µl einer 2 M CaCl_2 -Lösung gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe des Phosphatpuffers (2 x HBS Puffer) tropfenweise. Die langsame Zuführung verhindert die Ausbildung großer Kalziumpräzipitate, die für die Zellen schädlich wären. Dieser Ansatz wurde für 30 min inkubiert und schließlich zu den vorbereiteten Zellen in eine 58 cm² Schale gegeben. 24 h nach Transfektion erfolgte ein Wechsel des Mediums, 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in 350 µl 1 x PBS geerntet. Die Zellen wurden jeweils 4 x 10 sec mit einem Tipsonikator (*Micro Ultrasonic Cell Disruptor*, Kontes) aufgeschlossen und bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Behandlung von HEK-293t Zellen mit siRNA

Small interfering RNA (siRNA) sind kleine doppelsträngige RNA-Moleküle, die an RNA Interferenz (RNAi) beteiligt sind und die Expression eines bestimmten Gens regulieren können. Diese siRNA-Stränge können hierbei wie Vektor-DNA mittels Transfektion in die Zellen eingeschleust werden (Elbashir et al., 2001).

Es wurden hier je 10 µg CCS_1 und CCS_2 siRNA sowie zusätzlich 5 µg pIRES/SOD1 mittels Kalziumphosphatpräzipitation in HEK-293t Zellen eingeschleust, um in den transient transfizierten Zellen gleichzeitig die Expression des Chaperons CCS zu verringern. Die Zellen wurden auf Platten mit einer Wachstumsfläche von 21 cm² kultiviert, 24 h nach der Transfektion das Medium gewechselt und nach 48 h in 1 x PBS geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 150 µl 1 x PBS jeweils 4 x 10 sec mit einem Tipsonikator (*Micro Ultrasonic Cell Disruptor*, Kontes) aufgeschlossen und die Lysate bei -80 °C gelagert.

3.3 Proteinaufreinigung

3.3.1 Expression in BL21(DE3)pLysS kompetenten Zellen

Zur Expression rekombinanter SOD1 Dimere wurden BL21(DE3)pLysS mit den entsprechenden *sod1* Dimerkonstrukten im pET-14b-Vektor transformiert und die Bakterien in 4 ml Über-Nacht-Kulturen herangezogen. Für die Über-Nacht-Kulturen wurde LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol versetzt. 0,5 ml der Bakterienkultur wurde mit 0,5 ml sterilem Glycerol versetzt und die Bakterien zur Langzeitlagerung auf -80 °C gestellt.

Für die Expression wurden 4 ml einer Über-Nacht-Kultur in 1 L Erlmeyerkolben zu 250 ml LB-Medium gegeben. Zu diesem Medium wurde ebenfalls 50 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol sowie 0,5 mM CuSO₄ und 0,2 mM ZnSO₄ gegeben. CuSO₄ und ZnSO₄ dienten hierbei als Quelle für die Beladung der SOD1 Dimere mit Kupfer und Zink.

Nach einer Inkubationszeit von circa 4 h bei 37 °C hatten die Bakterien eine optische Dichte bei 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) von 0,6 – 1. Daraufhin wurde 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) zur Induktion der Expression eingesetzt. Anschließend wurden die SOD1 Heterodimere und das wildtypische Homodimer bei Raumtemperatur (RT) mindestens 4 h und die mutanten SOD1 Homodimere bei 11 °C mindestens 20 h exprimiert.

Die Bakterienzellen wurden bei 8.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und das Gewicht des Bakterienpellets bestimmt. Anschließend wurde das Pellet in einem zehnfachen Volumen des Lysispuffers resuspendiert. Nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen der Proben wurden diese zusätzlich 4 x 1 min sonifiziert. Die Ansätze wurden bei 12.000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet verworfen. Unmittelbar vor der Aufreinigung der Proteine wurde der Überstand durch einen 0,2 µm Filter gefiltert, um ein Verstopfen der FPLC-Säulen zu verhindern.

3.3.2 Ermittlung der Löslichkeit der SOD1 Dimere

Um die optimale Aufreinigungsmethode für die exprimierten SOD1 Dimere zu ermitteln, wurde deren Löslichkeit überprüft. Hierfür wurden 2 ml von einer Bakterien-Über-Nacht-Kultur bei 4.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl 1 x PBS resuspendiert und auf Eis 6 x 10 sec sonifiziert. 100 µl wurden entnommen und als „Totallysat“ (T) gekennzeichnet. Der Rest der Probe wurde nochmals bei 12.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand in eine neues Reaktionsgefäß überführt und als „Lösliche Fraktion“ (L) markiert. Das Pellet wurde in 1 x PBS mit 6 M Harnstoff resuspendiert und auf Eis 6 x 10 sec sonifiziert. Das Lysat wurde wieder bei 12.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt

und als „Pellet (Unlösliche) Fraktion“ (P) bezeichnet. Von den verschiedenen Fraktionen wurden jeweils 50 µl entnommen, mit 16,67 µl 4 x Ladepuffer versehen und bei 99 °C aufgeköcht. Je 3,5 µl des Ansatzes wurden auf ein 12 % SDS Polyacrylamidgel aufgetragen und dieses mit einer kolloidalen Coomassie Lösung gefärbt.

3.3.3 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Zur Aufreinigung der exprimierten SOD1 Homo- und Heterodimere wurden *Bio-Scale Mini Profinity Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) Cartridges, (5ml) (Bio-Rad)* verwendet. Die stationäre Phase der Säulen besteht aus an eine Matrix gebundenen *Iminodiacetic acid* (IDA) Gruppen, die in der Lage sind mit Nickelionen einen Komplex zu bilden (Abb. 4). Ist ein Protein mit einem Histidin-tag versehen, so binden die Imidazolringe der Histidine mit hoher Affinität an diese Nickelionen und damit an die stationäre Phase der Affinitätssäule.

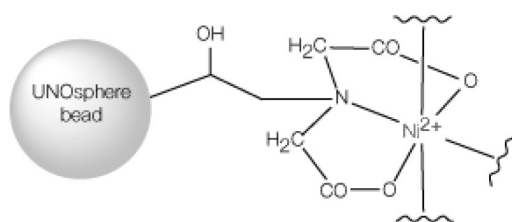


Abb. 4: *Bio-Scale™ Mini Profinity™ IMAC Cartridges von Bio-Rad*

Das an die IDA-Gruppe der Säule gebundene Ni^{2+} -Ion besitzt drei freie Bindungsstellen (dargestellt durch gewellte Linien), durch die es z.B. Histidine binden kann.

Vor der Beladung der Säulen mit den Bakterienlysaten wurden diese mit 25 ml Lysispuffer bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 2 ml/min equilibriert. Der gleiche Puffer wurde dazu benutzt das Bakterienlysat auf die Säule zu laden. Anschließend wurde die Säule bei 2 ml/min mit 30 ml Lysispuffer und 30 Waschpuffer gewaschen. Alle Proteine, die keinen Histidin-tag enthielten, wurden von der Säule gespült. Die gebundenen Proteine wurden anschließend mit 50 ml eines an Imidazol hochkonzentrierten Elutionspuffers von der Säule eluiert. Die SOD1 Proteine wurden nach Elution mit Proteaseinhibitor (*Complete EDTA-free; Roche*) versetzt, um sie vor einer Degeneration durch Proteasen zu schützen. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei 4 °C.

3.3.4 Abspaltung des Histidin-tags

Nach Expression und Aufreinigung der SOD1 Proteine wurde der für die Aufreinigung notwendige Histidin-tag entfernt. Hierzu wurden zunächst 300 µl der verschiedenen Eluate in *Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, MWCO 7 kDa (Thermo Scientific)* für 48 h gegen 1 x PBS dialysiert. Für die Abspaltung des Histidin-tags wurde anschließend das *Thrombin Cleavage Capture Kit (Novagen)* verwendet und 10 Einheiten (*Units*; U) biotinyliertes Thrombin pro 1 mg Protein zu den dialysierten Proben gegeben. Der Ansatz wurde für mindestens 96 h bei 8 °C unter Rotation inkubiert und nachfolgend mit 32 µl Streptavidinagarose pro 1 U Thrombin für 30 min bei 4 °C versetzt. Anschließend wurden die Ansätze in Filtersäulchen gegeben und 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Die Filtrate enthielten die aufgereinigten SOD1 Dimere ohne Histidin-tag, während das an die Streptavidinagarose gebundene biotinylierte Thrombin im Filter zurückgehalten wurde. Zur endgültigen Beseitigung aller Histidin-Reste und eventueller nicht verdauter SOD1 Dimere wurden die Proben anschließend zusätzlich mit Nickel Sepharose behandelt. Histidin bindet mit hoher Affinität an das an die Sepharose gebundene Nickel. Durch einen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 500 x g wurde das in der Probe verbliebene Histidin pelletiert und von dem die SOD1 Proteine enthaltenden Überstand getrennt.

3.4 Biochemische Arbeitsmethoden

3.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test

Die Quantifizierung des Proteingehalts nach der BCA-Methode (Smith et al., 1985) beruht auf der Biuret-Reaktion, nach der die Cu^{2+} -Ionen mit Proteinen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden. Die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes werden dabei zu Cu^+ -Ionen reduziert. Diese bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex, sodass die Proteinkonzentration anschließend photometrisch bestimmt werden kann.

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde in einer 96-Loch-Platte eine BSA-Standardreihe mit den Proteinkonzentrationen 1 µg/µl, 0,5 µg/µl, 0,25 µg/µl, 0,125 µg/µl, 0,0625 µg/µl und 0,03125 µg/µl erstellt. Ein weiterer Ansatz mit ddH₂O diente als Nullabgleich. Je 5 µl der Standardreihe als auch der Proben wurden in die Löcher der 96-Loch-Platte pipettiert. Sowohl zu den Ansätzen der Standardreihe als auch zu den Proben wurde je 95 µl der nach Anleitung entsprechend angesetzten BCA-Reagenz (*Pierce*) pipettiert. Die Proben wurden 30 min bei 60 °C inkubiert und anschließend photometrisch gemessen. Anhand der Extinktion bei 560 nm (*Multiskan RC, ThermoLabsystems*) konnte die Proteinkonzentration der jeweiligen Lösung ermittelt werden.

Über die Absorption der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin bei einer Wellenlänge von 280 nm lässt sich ebenfalls die Proteinmenge einer Lösung bestimmen. Mithilfe eines Spektralphotometers (*Nanodrop 1000*; *PeqLab*) wurde die Extinktion gemessen und über den molaren Extinktionskoeffizienten und das Molekulargewicht der SOD1 Dimere die Konzentration des Proteins berechnet. Neben der Extinktion der aromatischen Aminosäuren gibt das Proteinspektrum zudem Aufschluss über die Beschaffenheit aufgereinigter Proteine und die Reinheit der Proben.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Größe. Das anionische Detergenz Natrium Dodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*; SDS) bindet hierbei an hydrophobe Bereiche eines Proteins und entfaltet es. Durch die Bindung von SDS erhalten Proteine zudem eine gleichmäßige negative Ladung, welche die Eigenladung des Proteins überdeckt. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die Proteine nun unabhängig ihrer Eigenladung zur positiven Elektrode. Um Disulfidbrücken zu lösen wird zusätzlich ein Reduktionsmittel, hier β -Mercaptoethanol, zu den Ansätzen gegeben.

Für die hier durchgeführten SDS-PAGEs nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurden die Ansätze zur Denaturierung für 5 min bei 99 °C im Heizblock aufgeköcht, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Um die Proteine in möglichst scharfen Banden aufzutrennen, wurde hier das Prinzip der diskontinuierlichen Elektrophorese angewendet. Dabei durchlaufen die Proteine zwei Acrylamidgele mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichem pH-Wert. Die Polymerisierung des Acrylamid wurde durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) gestartet, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) diente als Polymerisierungskatalysator.

Für die SDS-PAGEs wurde das *Mini-PROTEAN® 3 Cell System* von *Bio-Rad* verwendet und die Gelkammern mit SDS-haltigen Laufpuffer befüllt. Als Größenmarker diente der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Marker* von *Fermentas*.

3.4.3 Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen

Proteine können in einem Polyacrylamidgel direkt nach der Auftrennung über Coomassie Brilliantblau unspezifisch nachgewiesen werden. Für die Färbung wurden die Gele zunächst in ddH₂O 30 sec in der Mikrowelle erhitzt und anschließend 5 min gewaschen. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt und anschließend die kolloidale Coomassie Lösung auf die Gele gegeben. Die Inkubation mit der Färbelösung erfolgte für 3 – 12 h. Wenn nötig, wurden die Gele nachfolgend mit 10 % Ethanol und 2 % ortho-Phosphorsäure entfärbt.

3.4.4 Western Blot-Analyse

Mithilfe des Western Blot Verfahrens können Proteine, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, durch Anlegen einer Spannung auf eine geeignete Membran transferiert werden. Die auf die Membran transferierten Proteine können anschließend durch spezifische Antikörper detektiert werden. Nitrozellulose besitzt eine hohe Proteinbindungskapazität und bindet Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Um die Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran zu aktivieren, wurde der Transferpuffer mit 20 % Methanol versetzt. Für den Proteintransfer wurde hierbei das *Mini Trans-Blot Cell System* von *Bio-Rad* verwendet.

Für den Proteintransfer von einem SDS Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Membran zur Anode ausgerichtet, da die negativ geladenen Proteine von der Kathode zur Anode wandern. Die Blot-Kammer wurde anschließend mit Transferpuffer befüllt. Der Übertrag fand über Nacht bei 30 V oder für 3 Stunden bei 90 V und 8 °C statt.

3.4.4.1 Ponceaufärbung membrangebundener Proteine

Zur Kontrolle der Vollständigkeit des Proteintransfers wurden die Membranen nach Beendigung des Transfers für 1 – 2 min mit Ponceaurot bei Raumtemperatur gefärbt. Die Färbung ist reversibel und kann mit Wasser wieder entfernt werden.

3.4.4.2 Immundetektion membrangebundener Proteine

Nach dem Transfer von einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran können auf der Membran gebundene Proteine selektiv durch Antikörper immunologisch nachgewiesen werden.

Hierfür wurde die Membran mit einer Blockierlösung (4 % entfettetes Milchpulver gelöst in 1 x PBST) für etwa 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um alle Proteinbindestellen der Membran zu besetzen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 8 °C mit dem primären Antikörper inkubiert und anschließend dreimal jeweils 10 min mit 1 x PBST gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 min mit 1 x PBST gewaschen und die verwendeten HRP-konjugierten (*Horseradish peroxidase*; Meerrettichperoxidase) Sekundärantikörper schließlich mit Chemiluminiszenz Lösung (*Enhanced chemiluminescence*; ECL Lösung) detektiert. Die Peroxidase katalysiert hierbei die Oxidation von Luminol. Die Membranen wurden in der Entwicklmaschine *LAS-3000 (Fuji)* je nach Intensität des Signals wenige Sekunden bis mehrere Minuten exponiert.

3.4.5 Aktivitätsbestimmung der SOD1 Dimere

SOD1 dismutiert Superoxidanionen zu H_2O_2 und Sauerstoff. Diese Reaktion lässt sich sowohl qualitativ als auch quantitativ verfolgen. Bei der qualitativen Aktivitätsmessung werden die Proben in einem Polyacrylamidgel unter nicht denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend gefärbt. Die quantitative Aktivitätsbestimmung erfolgte in einer 96-Loch-Platte, die Aktivität wurde anschließend in einem Plattenlesegerät kolorimetrisch bestimmt.

3.4.5.1 Qualitative Aktivitätsbestimmung mittels nativer Gelelektrophorese

Um die Dismutaseaktivität von SOD1 Enzymen zu untersuchen, wurden je 0,1 μg aufgereinigtes Protein auf ein 15 %iges Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen geladen. Anschließend wurden das Gel in eine Färbelösung mit Riboflavin und Nitroblau Tetrazoliumsalz (NBT) gegeben und 45 min lichtgeschützt inkubiert. Unter Lichteinfall produziert Riboflavin Superoxidanionen, welche NBT zu Formazan-Blau reduzieren und wodurch sich das gesamte Gel blau färbt. An den Stellen, an denen SOD1 die Superoxidanionen dismutiert, findet keine Reduktion des Tetrazoliumsalzes und somit auch keine Färbung statt. Diese Bereiche sind als helle Banden im gefärbten Gel zu erkennen. Die Gele wurden nach Färbung dem Licht ausgesetzt und über einen längeren Zeitraum eingescannt.

3.4.5.2 Qualitative Aktivitätsbestimmung nach Vorbehandlung mit Riboflavin und H_2O_2

Zu weiteren Analysen der Enzymaktivität wurden 0,2 μg der aufgereinigten Proteine vor der elektrophoretischen Auftrennung mit 100 ng/ml und 10 ng/ml Riboflavin, bzw. 2 μM und 0,02 μM H_2O_2 behandelt. Für die Inkubation mit Riboflavin wurde in einem Gesamtvolumen von 10 μl außerdem 0,03 μl TEMED zugefügt. Die Proben wurden anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie mit nativem Ladepuffer versetzt und auf ein 15 % natives Polyacrylamidgel geladen wurden. Nach Auftrennung wurde das Gel für 45 min in eine Riboflavin und NBT enthaltende Färbelösung gegeben und die Reduktion des NBT zu Formazan-Blau aufgezeichnet. Die hellen Stellen im Gel markierten Bereiche mit Dismutaseaktivität.

3.4.5.3 Quantitative Aktivitätsbestimmung mittels WST-1

Zur quantitativen Aktivitätsmessung wurde das *SOD Assay Kit-WST* von *Dojindo Molecular Technologies* verwendet. Im Gegensatz zu NBT ist das Tetrazolium Salz WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, Mononatriumsalz) gut wasserlöslich und

kann durch die Anwesenheit von Superoxidanionen zu seinem ebenfalls wasserlösliche Formazan Farbstoff reduziert werden. Die Superoxidanionen werden hierbei durch die Reaktion von Xanthin und Xanthinoxidase generiert. In Anwesenheit von SOD1 werden die Superoxidanionen dismutiert und können somit WST-1 nicht mehr reduzieren. Die Reduktion von WST-1 zu seinem gelben Formazan-Farbstoff lässt sich in einem Plattenlesegerät kolorimetrisch verfolgen.

Zur Bestimmung der optimalen SOD1 Konzentration für die Aktivitätsmessung wurden zunächst Konzentrationsreihen von 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,05 µg/ml für jedes SOD1 Dimer gemessen. Die Messung erfolgte in einem *Viktor* von *PerkinElmer* bei 450 nm alle 5 min für insgesamt 1 h. Als Kontrolle wurde zusätzlich eine Standardreihe mit humaner SOD1 (*Sigma-Aldrich*) in den Konzentrationen 200 U/ml, 100 U/ml, 50 U/ml, 20 U/ml, 10 U/ml, 5 U/ml, 1 U/ml, 0,1 U/ml, 0,05 U/ml, 0,01 U/ml, 0,001 U/ml angesetzt. Es wurden weiter Messungen von jedem Konstrukt mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml in einem Ansatz durchgeführt. Auch hier wurde innerhalb 1 h die Aktivität alle 5 min gemessen.

3.4.6 Metallgehaltsbestimmung

Die richtige Faltung und enzymatische Aktivität von SOD1 hängt u.a. von seiner Beladung mit den Metallen Zink und Kupfer ab. Für die Analyse der Metallbeladung der SOD1 Dimere wurde nach dem Protokoll von Crow et al., 1997 und Mulligan et al., 2008 vorgegangen. Die Absorption des Komplexindikators PAR (4-(2-Pyridylazo)resorcinol) bei 500 nm steigt unter Bindung von Metallen wie Kupfer und Zink drastisch an. Durch die Zugabe von Nitrilotriessigsäure (NTA) wird Zink selektiv aus dem Zn-PAR₂ Komplex entfernt, sodass durch die Veränderung der Absorption von PAR bei 500 nm vor und nach Zugabe von NTA auf die Mengen von Kupfer und Zink zu schließen ist.

Zur Bestimmung des Metallgehalts der SOD1 Dimere wurden je 125 µl einer Lösung mit 6 M Guanidin-HCl, 100 µM PAR und 20 mM HEPES in eine 96-Loch-Platte pipettiert und bei einer Wellenlänge von 490 nm in einem Plattenlesegerät gemessen. Anschließend wurden 25 µl der SOD1 Proteine (2 - 4 µM), sowie Standardreihen von CuSO₄ und ZnSO₄ (14 µM, 12 µM, 10 µM, 8 µM, 6 µM, 4 µM, 2 µM und 0 µM) zu der Lösung gegeben. Durch die denaturierende Wirkung des Guanidin-HCl wurden die SOD1 Proteine entfaltet und das gebundene Kupfer und Zink freigesetzt. Die Platte wurde daraufhin erneut ausgelesen. Anschließend erfolgte die Zugabe von NTA zu einer Endkonzentration von 0,8 mM und eine weitere Messung der Absorption bei 490 nm. Zur Analyse der Daten wurden die Werte der ersten Messung von den Werten nach Zugabe der Standardkurven von Kupfer und Zink sowie von den Werten nach Zugabe von NTA abgezogen. Die Ergebnisse der Standardkurven wurden auf einen Graphen aufgetragen und Trendlinien gelegt.

Anhand der Steigung der Standardkurven konnte anschließend auf die Menge an Kupfer und Zink in den SOD1 Dimeren geschlossen werden. Die Konzentration von Kupfer wurde bestimmt, indem die Werte der Messung vor Zugabe von SOD1 von den Werten der NTA-Messung abgezogen wurden. Anschließend wurde das Ergebnis durch die Steigung der Kupfer+NTA-Standardkurve geteilt und somit die Gesamtkonzentration an Kupfer in der Probe ermittelt. Für die Gesamtkonzentration von Zink in der Probe wurde das Resultat der SOD1+NTA-Messung von der SOD1-Messung ohne NTA abgezogen und das Ergebnis durch die Steigung der Zink-Standardkurve geteilt. Der Anteil an Kupfer und Zink pro SOD1 Dimermolekül wurde berechnet, indem die Gesamtkonzentration der Metalle aus den Proben durch die doppelte Konzentration der Dimere geteilt wurde.

3.4.7 Proteinase K Verdau

Proteinase K ist eine Serinprotease, die unspezifisch Proteine abbaut, indem sie sowohl endständige Peptidbindungen als auch Bindungen innerhalb eines Proteins spaltet.

Um die Stabilität der einzelnen SOD1-Dimerkonstrukte zu überprüfen, wurden diese mit Proteinase K (*Roche*) behandelt und die Proben anschließend via SDS-PAGE und Proteintransfer analysiert. Der Proteinase K Verdau wurde sowohl mit Zelllysaten aus HEK-293t Zellen als auch mit aufgereinigten SOD1-Dimerkonstrukten durchgeführt. Bei Versuchen mit HEK-293t Zelllysaten, wurden die Zellen zunächst mit unmarkierten *sod1* Dimerkonstrukten im pIRES-Vektor transfiziert. Die Zelllysate wurden anschließend jeweils mit 10 µg/ml Proteinase K versetzt und der Ansatz in einen Heizblock auf 37 °C gestellt. Die Reaktion wurde mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (*Roth*) abgestoppt, einem Serinprotease-Inhibitor, der irreversibel an das aktive Serin der Proteinase K bindet. Die Reaktion wurde nach 0 min, d.h. unmittelbar nach Zugabe von Proteinase K sowie 10, 20, 30 und 60 min nach Zugabe der Proteinase mit 5 mM PMSF abgestoppt. Für die Proteinase K Behandlung aufgereinigter SOD1-Dimere wurde jeweils 0,25 µg SOD1 mit 90 µg HEK-293t Zelllysate als Puffer versetzt und der Ansatz mit 10 µg/ml Proteinase K behandelt. Auch hier wurde die Reaktion nach 0, 10, 20, 30, bzw. 60 min mit 5 mM PMSF abgestoppt. Für beide Ansätze wurde jeweils eine Probe ohne Proteinase K als Kontrolle verwendet. Die Proben wurden anschließend über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem anti-SOD1 Antikörper (*Epitomics*) detektiert. Mithilfe des Analyseprogramms *ImageJ* wurden die Banden densitometrisch ausgewertet und der Wert der unbehandelten Probe als 100 % definiert.

3.4.8 Immunpräzipitation (IP)

Bei einer Immunpräzipitation (IP) können Proteine mithilfe eines gegen sie gerichteten spezifischen Antikörpers aus einer Lösung, z.B. einem Gewebe- oder Zelllysate, von anderen Proteinen getrennt und dabei angereichert werden. Hierfür wird der Antikörper an eine feste Matrix (Protein A-Agarose oder Protein G-Sepharose Kügelchen) gebunden, woraufhin der gesamte Immunkomplex mittels Zentrifugation von dem Lysat getrennt werden kann.

Die für die IPs verwendeten Peptid-Antikörper wurden freundlicherweise von Janice Robertson und Avijit Chakrabarty, Toronto, Kanada zur Verfügung gestellt. Der SEDI (*SOD1 exposed dimer interface*)-Antikörper bindet an die Dimerisierungsdomäne von SOD1, wenn die Dimerbindung gestört ist (Rakhit et al., 2007). Der USOD (*unfolded SOD1*)-Antikörper detektiert SOD1 mit einem entfaltetem β -Faltblattzylinder (Kerman et al., 2010).

Für die IPs wurden zunächst HEK-293t Zellen transient mit *sod1* Dimeren im pIRES, im pEGFP-N1 und im pEF-BOS-Vektor transfiziert. Während die im pIRES-Vektor exprimierten SOD1 Dimere keinerlei Markierung aufweisen, trugen die im pEGFP-N1-Vektor exprimierten Proteine C-terminal eine EGFP-Domäne (Witan et al., 2008) und die im pEF-BOS-Vektor vorliegenden *sod1* Konstrukte N-terminal einen Histidin-tag (Konstrukte hergestellt von Anna Besemer am Institut für Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz).

Für die IP wurden die transient transfizierten HEK-293t Zellen mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in 600 μ l kaltem RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Zur Lyse wurden die Zellen für 20 min bei 4 °C rotierend inkubiert. Um die in RIPA-Puffer löslichen von den unlöslichen Zellbestandteilen zu trennen, wurden die Ansätze bei 15.000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand für die IP verwendet.

Für die IP wurde Protein A-Agarose (*Sigma-Aldrich*) verwendet. Um die Protein A-Agarose für die IP vorzubereiten, wurden 40 μ l der Suspension mit 480 ml kaltem RIPA-Puffer versehen. Der Ansatz wurde bei 3.500 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten zwei weitere Waschschrte, anschließend wurde die Protein A-Agarose in 40 μ l RIPA-Puffer resuspendiert.

Die lösliche Fraktion der Zelllysate wurde mit 20 μ l Protein A-Agarose für 1 h unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Hierdurch wurden unspezifisch bindende Komponenten der löslichen Fraktion aus dem Zelllysate entfernt. Der Ansatz wurde anschließend bei 10.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und je 200 μ l des Überstands auf neue Reaktionsgefäße aufgeteilt.

Anschließend wurden je 2 μ g des SEDI- oder USOD-Antikörpers, sowie 2 μ g IgG als Kontrolle zu den vorbehandelten Zelllysaten gegeben und der Ansatz über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Der entstandene Immunkomplex wurde nach Zugabe von 20 μ l Protein A-Agarose an

diese gebunden. Hierfür wurde der Ansatz bei 4 °C unter Rotation für 2 – 4 h inkubiert. Der an die Protein A-Agarose gebundene Komplex wurde anschließend bei 3.500 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und die Agarose dreimal mit 1,5 ml kaltem RIPA-Puffer gewaschen. Um den Immunkomplex von der Agarose zu lösen, wurde nach dem letzten Waschschrift der Überstand verworfen und 20 µl 2 x Laemmli Probenpuffer zu der Protein A-Agarose gegeben. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend bei 10.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend zur weiteren Analyse auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. SOD1 wurde anschließend mit einem SOD1-spezifischen Antikörper (*Epitomics*) detektiert.

3.5 Biophysikalische Arbeitsmethoden

3.5.1 Zirkulardichroismus-Spektroskopie (*Circular Dichroism Spectroscopy*; CD-Spektroskopie)

Zur Aufklärung der Sekundärstruktur der SOD1-Dimere wurde für jedes Konstrukt eine Zirkulardichroismus-Spektroskopie (*Circular Dichroism Spectroscopy*, CD-Spektroskopie) durchgeführt.

Kann ein Molekül nicht mit seinem Spiegelbild zur Deckung gebracht werden, so bezeichnet man es als chiral, bzw. als optisch aktiv. Die Enantiomere – also Bild und Spiegelbild – eines chiralen Moleküls unterscheiden sich in ihrer optischen Aktivität. So absorbieren sie z.B. zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark. Diese Differenz bei bestimmten Wellenlängen im niedrigen UV-Bereich (in der Regel 190 nm – 260 nm) ergeben ein CD-Spektrum, das einen Aufschluss über die Sekundärstruktur des Proteins zulässt.

Die CD-Spektren der einzelnen SOD1 Dimere wurden im Bereich 190 nm – 260 nm gemessen. Verwendet wurde hierzu ein CD-Spektrometer von *Jobin Yvon* am Institut für Biophysik der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heinz Decker. Für die Spektroskopie wurden jeweils 0,3 µg/µl Protein gelöst in 1 x PBS in einem Volumen von 400 µl in einer 1 mm Glasküvette gemessen. Als Ausgabeformat wurde die Elliptizität (Theta [θ] in mDeg) gewählt. Für den Graph wurde die Elliptizität gegen die Wellenlänge in 1 nm Schritten aufgetragen und grobe Ausreißer, die auf eine Fehlmessung des Geräts beruhen, verrechnet. Hierfür wurden die Werte der umliegenden Wellenlängen gemittelt und der Ausreißer durch diesen Mittelwert ersetzt. Die Berechnung der Sekundärstruktur erfolgte mit *Dichroweb* (Whitmore and Wallace, 2004, 2008). Um die Spektren auswerten zu können, mussten sie zunächst bei einer Wellenlänge von 260 nm auf null gesetzt werden. Die Messwerte der letzten drei Wellenlängen (258 nm, 259 nm und

260 nm) wurden hierfür gemittelt und als Basis von allen anderen Werten abgezogen. Die so vorbereiteten Daten wurden nach *Dichroweb* (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>) importiert. Als Input wurde für die Einheit „Theta“, für den Algorithmus „Contin“ und als Referenzset „Set 4 (190 - 240 nm)“ gewählt. Das durchschnittliche Molekulargewicht der Aminosäuren des Proteins (*Mean Residue Weight*; MRW) wurde mit 101 Da angegeben.

3.6 Der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) als *in vivo*-Modell

Der Nematode *C. elegans* eignet sich besonders gut als *in vivo*-Modell, da er mit vergleichbar geringem Aufwand und kostengünstig zu kultivieren ist, schnell und reichlich Nachkommen produziert, transparent und somit für Mikroskopierstudien geeignet ist und zudem eine Eutelie, eine Zellkonstanz aufweist (Sulston and Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983). Als Ausgangslinie für alle Arbeiten mit *C. elegans* diente der wildtypische Stamm N2.

3.6.1 Kultivierung von *C. elegans*

Die Nematoden wurden auf 6 cm Agarplatten (3 mg/ml NaCl, 2.5 mg/ml Bactopeptone, 16 mg/ml Bactoagar, 25 mM PPB, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 2 µg/ml Uracil, 5 µg/ml Cholesterol, 120 µg/ml Streptomycin) bei einer konstanten Temperatur von 20 °C gehalten. Als Nahrungsquelle diente den Tieren der Streptomycin resistente *E. coli*-Stamm HB101. 3,5 cm Platten wurden mit 200 µl, 6 cm Platten mit 350 µl einer dicht bewachsenen HB101-Kultur versetzt. Die Würmer wurden erhalten, indem entweder einzelne Würmer von einer Platte auf eine neue Platte umgesetzt wurden oder indem aus einer dicht besiedelten Platte ein ganzes Agarstück herausgeschnitten und auf eine neue Platte gesetzt wurde.

3.6.2 Herstellung transgener *C. elegans*

Zur Herstellung transgener *C. elegans* wurden Tiere des Larvalstadiums L4 gewählt. Diesen wurde mithilfe einer Mikroinjektionsnadel (*TransferMan NK2*; *FemtoJet*[®] *Microinjector*, *Eppendorf*), welche zuvor mit 2,5 µl einer 120 µg/ml konzentrierten cDNA-Lösung beladen wurde, die jeweilige cDNA in eine der beiden Gonaden des Wurms injiziert. Hierzu wurde der Wurm auf 2 %igen Agar in Halocarbonöl fixiert, injiziert und anschließend mit einem Tropfen M9-Medium wieder vom Agar gelöst.

Den Würmern wurde die cDNA der *sod1* Dimerkonstrukte SOD1^{WTWT}-EGFP, SOD1^{85WT}-EGFP sowie SOD1⁸⁵⁸⁵-EGFP, welche unter die Kontrolle des *sra-6* Promotors gestellt wurden injiziert. Da

sra-6 lediglich in 4 Neuronenklassen, u.a. in den multisensorischen ASH-Neuronen, exprimiert wird, wurde zusätzlich ein grün fluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein*; GFP) als Ko-Injektionspartner unter die Kontrolle des *elt-2* Promotors gestellt. *Elt-2* wird im Darm von *C. elegans* exprimiert und ist aufgrund der Größe des Darms als Marker für eine erfolgreiche Injektion gut geeignet. Da jeweils zwei cDNAs gleichzeitig in den Wurm injiziert wurden, wurde von jeder cDNA jeweils 60 µg/ml in die Gonaden injiziert. Nach der Injektion wurde jeder Wurm separat auf eine 3 cm Platte überführt und zur weiteren Kultivierung bei 20 °C gehalten. Zu diesem Zeitpunkt lag die injizierte DNA extrachromosomal vor. Tiere mit positiven Nachkommen (d.h. Nachweis des GFP im Darm mittels Fluoreszenzmikroskopie [MZ10 F, Leica]) wurden weiter kultiviert, verstorbene Tiere und solche ohne positive Nachkommen wurden verworfen.

3.6.3 Integration des Zielgens in das Genom von *C. elegans* mittels UV-Bestrahlung

Um das Zielgen stabil im Genom des Nematoden einzubauen, wurden etwa 70 Würmer des Lavalstadiums L4 auf eine bakterienfreie Agarplatte gesetzt und mit UV-Licht der Intensität 35 mJ – 37,5 mJ bestrahlt. Durch die Bestrahlung werden Chromosomenstrangbrüche hervorgerufen, sodass sich die bis dahin extrachromosomal vorliegende cDNA des Zielgens im Genom des Wurms integrieren kann. Nach der Behandlung wurden jeweils acht Tiere auf eine 6 cm Schale umgesetzt und bei 20 °C kultiviert. Über Fluoreszenzmikroskopie wurden jene Linien ausgewählt, die zu 100 % das Markerprotein GFP im Darm unter der Kontrolle des *elt-2* Promotors exprimierten. Diese Linien wurden anschließend an einem Laser-Scanning-Mikroskop ebenfalls auf ihre SOD1-Expression in den ASH-Neuronen kontrolliert.

Da die Bestrahlung mit UV-Licht Chromosomenstrangbrüche bewirkt, ist eine schwerwiegende Beschädigung der DNA der bestrahlten Tiere nicht auszuschließen. Aus diesem Grund wurden mit UV-Licht bestrahlte Wurmlinien nach der erfolgten Integration des Zielgens in das Genom mit wildtypischen N2-Männchen ausgekreuzt, um etwaige Beschädigungen der DNA aus den Linien zu entfernen. Hierfür wurden jeweils acht männliche wildtypische N2-Männchen mit zwei Hermaphroditen der entsprechenden Linie verkreuzt. Hieraus entstandene transgene Männchen wurden wiederum bei einer Rückkreuzung eingesetzt, welche verhindern sollte, dass das Zielgen bei diesen Auskreuzungen aus dem Genom der Tiere entfernt wird.

Auskreuzungsschritt: ♂_{N2} x ♀_{transgen}

Rückkreuzungsschritt: ♂_{transgen} x ♀_{transgen}

Es erfolgten fünf Auskreuzungs- und Rückkreuzungsschritte, bevor die Tiere für die nachfolgenden Versuche verwendet wurden.

3.6.4 Herstellung männlicher *C. elegans*

Der Nematode *C. elegans* ist ein sich selbst befruchtender Hermaphrodit. Allerdings existieren auch männliche Würmer, welche mit Hermaphroditen kopulieren und auf diese Weise den Genpool erweitern können.

Die Verpaarung von mit UV-Licht bestrahlten Würmer mit wildtypischen N2-Männchen ermöglicht das Auskreuzen von Mutationen, die durch diese Behandlung auftreten können. Aus diesem Grund wurde die Produktion männlicher Nachkommen gefördert. Hierfür wurden etwa 150 L4-Larven auf eine 6 cm Platte gesetzt und für 6 h auf 30 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden je acht Würmer dieses Ansatzes auf neue Platten überführt und die Tiere bei 20 °C gehalten. Die hohe Temperatur forcierte die Anzahl an männlichen Nachkommen. Diese wurden folgend mit wildtypischen N2-Hermaphroditen verpaart, sodass aus dieser Verpaarung weitere männliche Nachfahren hervortraten. Zur Verpaarung wurden jeweils acht männliche *C. elegans* und zwei Hermaphroditen auf eine 3,5 cm Platte gesetzt, welche mit einem Tropfen Bakterienkultur versehen wurde. Auf diese Weise ließen sich männliche *C. elegans* erhalten und konnten anschließend für die Auskreuzungen eingesetzt werden.

3.6.5 Überlebenszeitanalyse

Die Lebensdauer der Würmer wurde analysiert, um zu überprüfen, ob sich die Expression von SOD1^{WT-WT}-EGFP, SOD1^{85-WT}-EGFP oder SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP unter der Kontrolle des *sra-6* Promotors auf die Lebensspanne von *C. elegans* auswirkt. Es wurden pro SOD1 Dimer je zwei voneinander unabhängig generierte Linien untersucht, um auszuschließen, dass es sich bei den Ergebnissen um einen reinen Linieneffekt handelte. Die Würmer wurden für den Versuch zunächst auf ein Entwicklungsstadium synchronisiert, indem nur Larven des Larvalstadiums 4 (L4)-Stadiums vereinzelt wurden. Bei 20 °C erreichten die L4-Larven nach einem Tag das Adultstadium. Hieraufhin wurden pro Linie mindestens 30 adulte Würmer auf eine neue Platte umgesetzt. Die Anzahl der Tiere wurde jeden Tag bestimmt, bis alle Würmer verstorben waren. Die Überlebensstudien wurden insgesamt dreimal durchgeführt, wobei jene Tiere nicht berücksichtigt wurden, welche an den Rand der Platte gekrochen und dort vertrocknet waren.

3.6.6 Analyse der Eiablage

Die Beschaffenheit der Umgebung, in der *C. elegans* lebt, kann sich stark auf das Eiablageverhalten der Tiere auswirken. Die Umwelt wird von den Würmern hierbei u.a. chemosensorisch wahrgenommen. Es wurde überprüft, ob die Expression der SOD1 Dimere SOD1^{WT-WT}-EGFP,

SOD1^{85-WT}-EGFP und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP in den multisensorischen ASH- oder ASI-Neuronen einen Einfluss auf die Anzahl der Nachkommen ausübt. Von jeder Linie wurden hierfür Würmer des L4-Stadiums vereinzelt und nach 24 h pro Linie ein Wurm auf eine 3,5 cm Platte überführt. Die adulten Tiere wurden 24 h bei 20 °C auf den Platten gehalten und anschließend wieder entfernt. Die gelegten Eier wurden für weitere 24 h auf 20 °C gegeben und die geschlüpften Würmer gezählt. Die statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Linien wurden anschließend mit dem Zweistichproben-t-Test ermittelt.

3.6.7 Langzeitlagerung von *C. elegans*

Für Langzeitlagerung können *C. elegans* Würmer auf -80 °C oder im flüssigen Stickstoff (Brenner, 1974) gehalten werden. Hierfür wurden die Würmer auf mehreren 6 cm Platten so lange kultiviert, bis die Platten mit Larven des L1/L2-Stadiums dicht bevölkert waren. Larven dieses Stadiums überleben das Einfrieren am besten, wenn sie frisch ausgehungert wurden. Als Vorbereitung für das Einfrieren wurden die Würmer mit 1 x M9-Medium von den Platten gespült. 500 µl des 2 x Einfriermediums wurden in Kryoröhrchen vorgelegt und 500 µl der Würmer in M9 hinzu gegeben. Die Cryoröhrchen wurden bei -80 °C langsam herab gekühlt. Anschließend lassen sich die Würmer bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff über Jahre lagern.

3.7 Statistik

Für die Auswertung der Proteinase K Behandlungen wurden mindestens drei von einander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Western Blots wurden mit der Software *ImageJ* densitometrisch ausgewertet und die unbehandelte Kontrolle als 100 % definiert. Die statistische Signifikanz der einzelnen Versuche wurde mit einer Varianzanalyse (zweifach ANOVA) mit wiederholten Messungen bestimmt. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit den Mittelwerten der einzelnen Versuche, die Abweichungen vom Mittelwert wurden mithilfe des Standardfehlers angezeigt.

Für die Eilegestudien der einzelnen *C. elegans* Linien wurden die geschlüpften Würmer ausgezählt und die statistische Signifikanz zwischen den verschiedenen Linien mit dem Zweistichproben-t-Test berechnet. Auch hier wurden die Daten über den Mittelwerten der einzelnen Versuche dargestellt und die Abweichungen vom Mittelwert mithilfe des Standardfehlers angezeigt.

Für Überlebensstudien der verschiedenen transgenen *C. elegans* Linien wurde jeweils bei einer Population von etwa 90 Wümmern der Todestag jedes Individuums vermerkt und mit dem Log-Rang-Test die statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Linien ermittelt. Der Graph wurde als Kaplan-Meier-Kurve aufgezeichnet.

4. ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurden die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von Dimeren der SOD1 Mutationen A4V, G37R, G41D, G41S, G85R und G93C untersucht. Der Schwerpunkt der Untersuchung lag hierbei auf dem Vergleich von mutanten Homodimeren, welche zwei mutierte Untereinheiten aufweisen (z.B. SOD1³⁷⁻³⁷) und dem jeweils korrespondierendem Heterodimer, welches eine mutierte und eine wildtypische Untereinheit enthielt (z.B. SOD1^{37-WT}). Als Kontrolle diente jeweils das wildtypische Homodimer SOD1^{WT-WT}.

Um die Eigenschaften der mutanten Homo- und Heterodimere miteinander vergleichen zu können, wurden die Dimerkonstrukte in zwei Zellsystemen exprimiert. Die Expression der Konstrukte in HEK-293t Zellen diente der funktionellen und biophysikalischen Untersuchung der Dimere in einem eukaryotischen Hintergrund, während die vergleichsweise hohe Expressionsrate in dem Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS für eine anschließende Aufreinigung der Dimere aus dem Bakterienlysat und zur detaillierten Analyse der SOD1 Dimere genutzt wurde. Die hierbei gewonnenen Dimere wurden hinsichtlich ihrer Struktur, ihrer Konformation und ihrer Dismutaseaktivität untersucht.

4.1 Expression der SOD1 Dimere in BL21(DE3)pLysS Bakterien

Für die Aufreinigung der obligatorischen SOD1 Dimere wurde das bakterielle Expressionssystem BL21(DE3)pLysS verwendet. Das in diesem Bakterienstamm enthaltene Plasmid pLysS, welches ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Chloramphenicol aufweist, enthielt eine T7-Lysozym kodierende Sequenz. Lysozym dient als Inhibitor der T7 RNA Polymerase und verhindert eine exzessive Produktion des rekombinanten Proteins in den BL21 Bakterien. Eine übermäßige Expression rekombinanter Proteine könnte dazu führen, dass diese Proteine in Einschlusskörpern angereichert werden und sich nur durch denaturierende Reagenzien wieder in Lösung bringen lassen. Es wurde zunächst überprüft, ob die in diesem System exprimierten SOD1 Dimere im Zytosol oder in Einschlusskörpern vorlagen. Ohne Induktion durch IPTG erfolgte die Expression der SOD1 Dimere nur auf einem, durch Coomassiefärbung nicht nachweisbarem, basalen Level (Abb. 5A). Es zeigte sich, dass sowohl SOD1^{WT-WT} als auch die SOD1 Heterodimere bei einer Expression bei Raumtemperatur (RT) in der löslichen Fraktion des Zytosols (L) der Bakterien vorlagen, während die entsprechenden mutanten Homodimere vorwiegend in der, die Einschlusskörper enthaltenden, Pelletfraktion (P) lokalisiert waren (Abb. 5A).

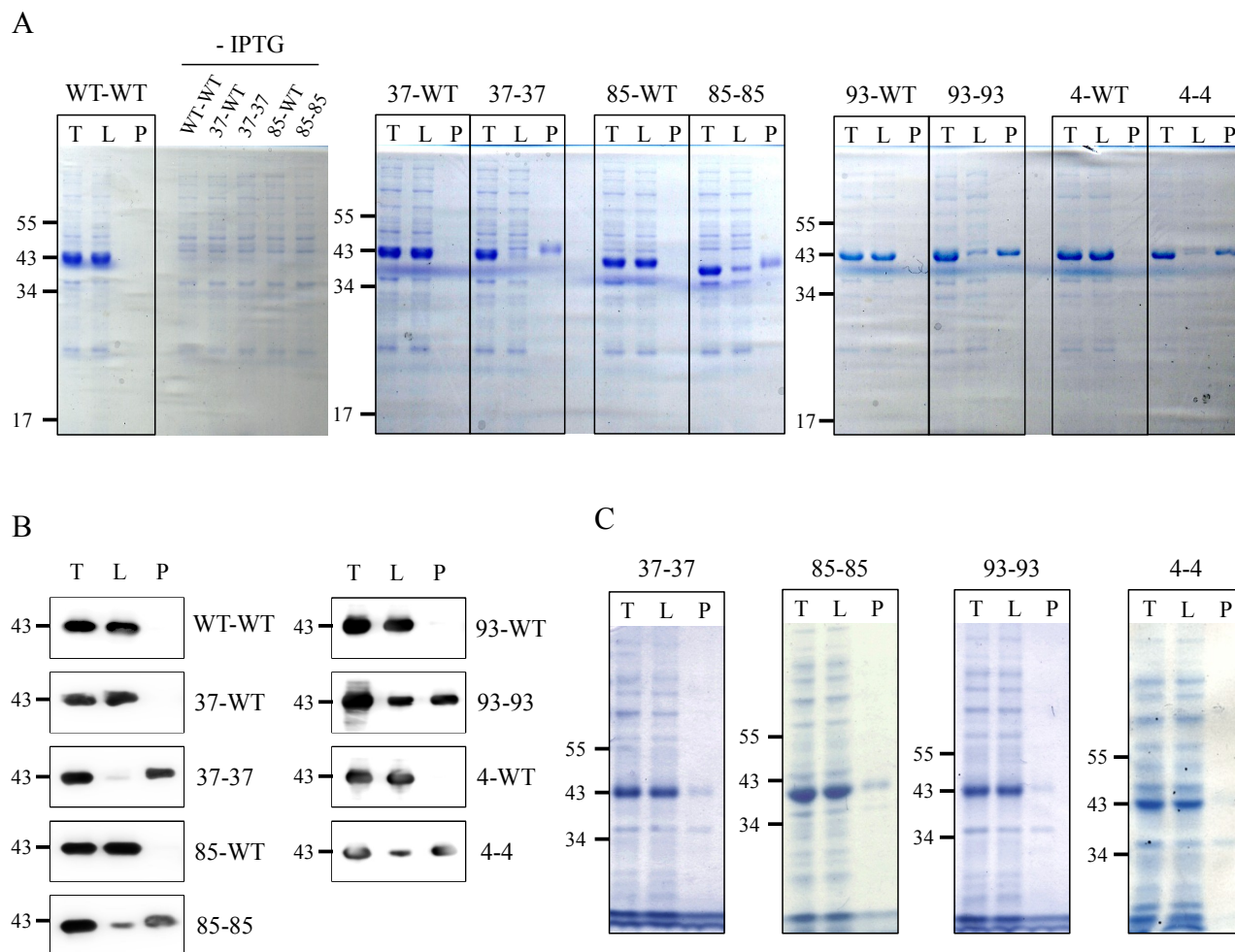


Abb. 5: Expression der Histidin-markierten SOD1 Dimere in BL21(DE3)pLysS kompetenten Bakterien bei Raumtemperatur (RT) und 11 °C.

Die Bakterien wurden bei 37 °C bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,1 – 6 herangezogen. Anschließend wurde die Temperatur gesenkt und die Expression mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach der Expression der SOD1 Dimere wurden die Zellen lysiert, in ein Totallysat (T), eine lösliche Fraktion (L) und eine unlösliche Pelletfraktion (P) aufgeteilt, auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt.

A Erfolgte die Expression der Dimere für 4 h bei Raumtemperatur (RT), fanden sich SOD1^{WT-WT} und die SOD1 Heterodimere in der löslichen Fraktion, während die mutanten SOD1 Homodimere in der Pelletfraktion angereichert waren. Ohne Zugabe von IPTG wurden die SOD1 Dimere nur auf einem basalen Level exprimiert.

B Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran konnten die SOD1 Dimere mittels eines SOD1-spezifischen Antikörpers (*Epitomics*) detektiert und somit nachgewiesen werden, dass es sich bei den aufgereinigten Proteinen um SOD1 handelte.

C Bei einer Expressionstemperatur von 11 °C für 20 h verblieben auch die mutanten SOD1 Homodimere in der löslichen Fraktion und konnten ohne den Einsatz von denaturierenden Mitteln aufgereinigt werden.

Nach Transfer der Proben auf eine Nitrozellulosemembran konnten die SOD1 Dimere zusätzlich mit einem SOD1-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 5B). Da der Einsatz von denaturierenden Puffern bei der Aufreinigung der SOD1 Dimere die Faltung der Proteine, ihre Beladung mit Kupfer und Zink und somit auch ihre enzymatische Aktivität beeinflussen, wurden die Bedingungen der Expression der mutanten Homodimere verändert, um die Konformation der Proteine zu schützen. Die Temperatur während der Expression wurde auf 11 °C abgesenkt und die Expressionsdauer auf 20 h verlängert. Durch die hieraus resultierende langsamere Expression der mutanten Homodimere erfolgte eine Verschiebung der rekombinanten Proteine in die lösliche Fraktion (Abb. 5C).

4.2 Aufreinigung der Proteine durch *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)

Nach Expression der SOD1 Dimere in den BL21(DE3)pLysS Bakterien wurden diese mittels Affinitätschromatographie in einem FPLC-System von den restlichen bakteriellen Proteinen getrennt. Der an den N-Terminus der rekombinanten SOD1 Dimere gekoppelte sechsfache Histidintag gewährleistete hierbei eine starke Bindung der Dimere an die mit Nickel beladene Säulenmatrix. Die restlichen Bakterienproteine konnten nicht an die Säule binden. Nach mehreren Waschschritten wurden die an die Säule gebundenen SOD1 Proteine durch einen hochkonzentrierten Imidazol-Puffer eluiert. Mittels eines UV-Detektors, welchen die Proteine passierten als sie von der Säule gespült wurden, ließ sich die Aufreinigung der SOD1 Dimere als Chromatogramm darstellen (Abb. 6A). Die Elutionsfraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, die SOD1 Dimere durch eine Coomassiefärbung detektiert (Abb. 6B) und anschließend vereint.

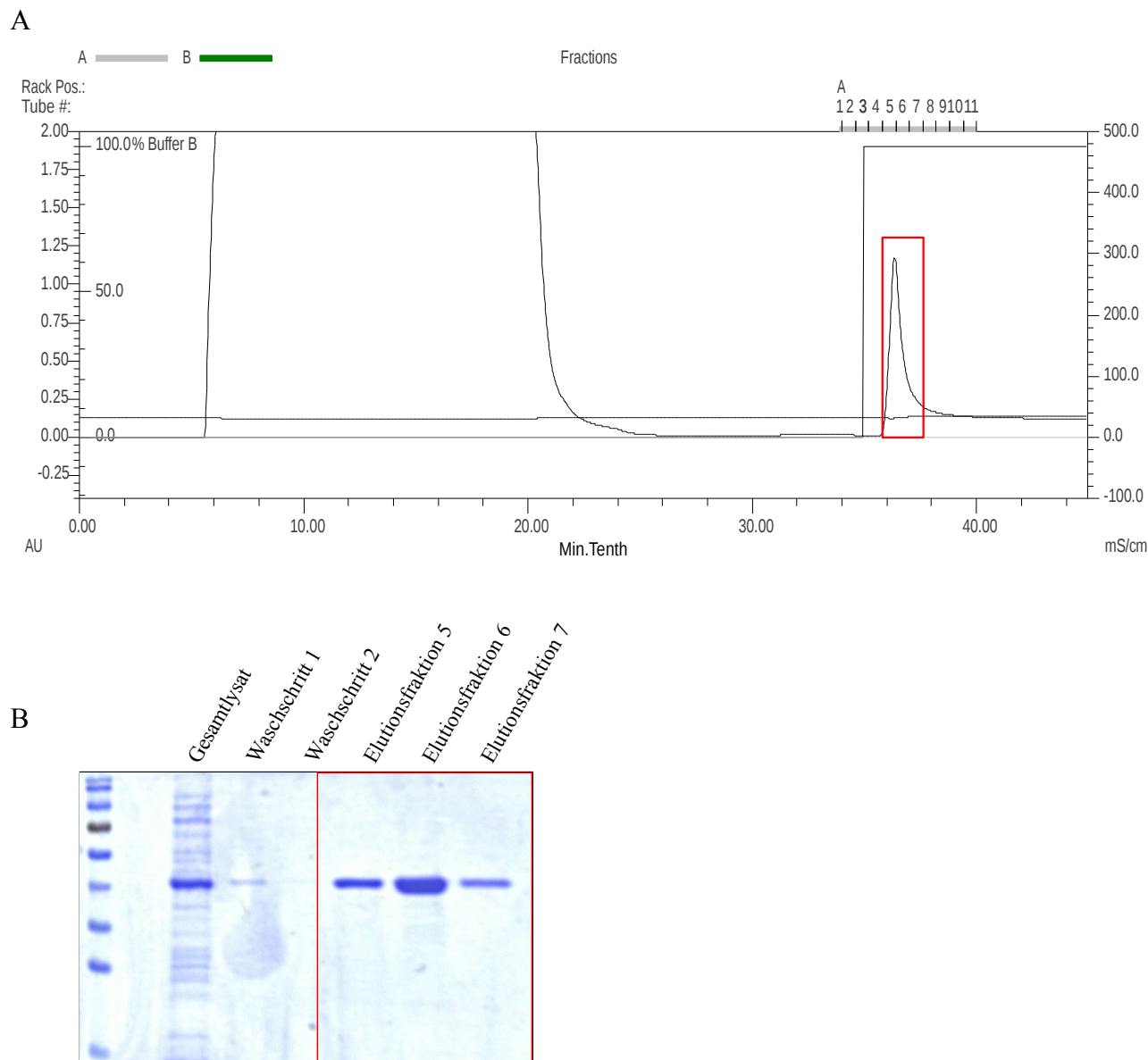


Abb. 6: FPLC: Chromatogramm von SOD1^{WT-WT} und Coomassiegel der FPLC Fraktionen von SOD1^{WT-WT}

A Mithilfe eines UV-Detektors (280 nm) ließ sich die Verteilung der Proteine während der Chromatographie verfolgen. Während der Beladung und des Waschens der Säule wurden alle bakteriellen Proteine von der Säule gespült (Kurve bei 6 – 24 min), während die SOD1 Dimere durch den Histidin-tag an die Säule gebunden wurden. Die Elution der Dimere erfolgte nach Zugaben eines hochkonzentrierten Imidazol-Puffers und manifestierte sich in einem steilen Anstieg der optischen Dichte (hier bei 36 – 38 min). Der Durchfluss der bakteriellen Proteine wurde verworfen und die eluierten Proteine in Fraktionen gesammelt.

B Nach der Aufreinigung mittels FPLC wurden die Fraktionen auf einem 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und in einer Coomassie Lösung angefärbt. Während der FPLC wurden die SOD1 Dimere, welche einen großen Teil des Gesamtlysats bildeten, von den übrigen bakteriellen Proteinen getrennt und in Elutionsfraktionen (5 - 7) aufkonzentriert.

4.3 Entfernung des Histidin-tags

Um das SOD1 Dimer in einem möglichst nativen Zustand zu erhalten, wurde der während der Chromatographie benötigte N-terminale Histidin-tag der SOD1 Dimere nach der Aufreinigung über eine Thrombin Schnittstelle wieder entfernt. Hierfür wurde das *Thrombin Cleavage Capture Kit* (Novagen) verwendet. Im Anschluss an den Thrombin Verdau wurden die Proben zusätzlich mit Nickel Sepharose behandelt, wodurch alle abgespaltenen Histidinreste und alle nicht verdauten SOD1 Dimere mit Histidin-tag an die Sepharose gebunden und somit aus der Lösung entfernt wurden. Der Erfolg der Abspaltung des Histidin-tags wurde nach Auftrennung der Proben auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mithilfe eines Histidin-spezifischen Antikörpers nachgewiesen (Abb. 7A). Als Kontrollen wurden sowohl unbehandelte SOD1 Dimere mit Histidin-tag als auch ein weiteres mit einem sechsfachen Histidin-tag versehenes Protein (6xHis-p53) verwendet. Nach der Thrombin- und Nickel Sepharose-Behandlung konnte kein Histidin-tag an den SOD1 Dimeren mehr nachgewiesen werden. Die Proben wurden zusätzlich mit einem SOD1-spezifischen Antikörper nachgewiesen (Abb. 7B). Hierdurch konnte zum einen gezeigt werden, dass ausreichend Protein eingesetzt wurde, um den Histidin-tag nachzuweisen sowie, dass die SOD1 Dimere durch die Behandlung mit Thrombin nicht degradiert wurden. Nach der Expression, der Aufreinigung und Thrombinbehandlung der SOD1 Dimere konnten diese für biophysikalische und biochemische Analysen verwendet werden.

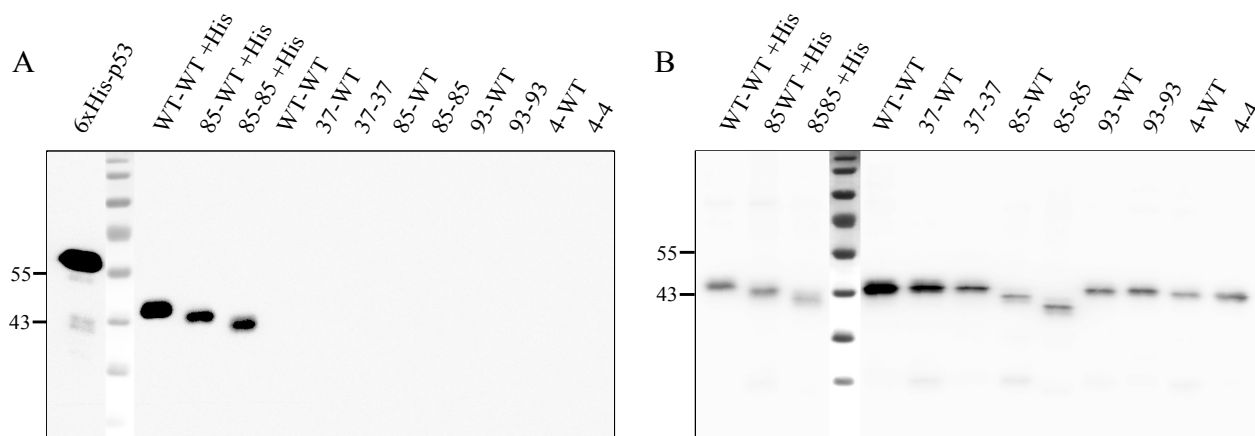


Abb. 7: Abspaltung des sechsfachen Histidin-tags durch Thrombin

A Um den sechsfachen Histidin-tag nach der Aufreinigung von den SOD1 Dimeren vollständig abzuspalten, wurden die Proteine für mindestens 96 h bei 4 °C mit 10 U Thrombin pro 1 mg SOD1 Dimer inkubiert. Anschließend wurden die Proben zusätzlich mit Nickel Sepharose versetzt, wobei alle Histidin-markierten Proteine, sowie die abgespaltenen Histidin-tags durch Zentrifugation aus der Lösung entfernt wurden. Nach Auftrennung auf einem 12 % Polyacrylamidgel, Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Inkubation mit einem Histidin-spezifischen Antikörper, zeigte sich, dass die SOD1 Dimere keinen Histidin-tag mehr trugen. Als Kontrolle wurden die unbehandelten SOD1 Dimere SOD1^{WT-WT}, SOD1^{85-WT} und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵, sowie ein weiteres Histidin-markiertes Protein (6xHis-p53) eingesetzt.

B Die Thrombin behandelten Proben wurden zusätzlich mit einem SOD1-spezifischen Antikörper detektiert, um zu gewährleisten, dass die Proteinspiegel der Dimere nicht zu gering waren, um den Histidin-tag mittels des Histidin Antikörpers zu erkennen. Weiter sollte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Thrombin die Dimere nicht zu kleineren Fragmenten degradiert wurden.

4.4 Dismutaseaktivität der aufgereinigten SOD1 Dimere

Die Fähigkeit biochemische Reaktionen zu katalysieren ist ein entscheidendes Merkmal von Enzymen. Um ihre katalytische Funktion erfüllen zu können, benötigen Enzyme eine definierte Struktur. Ist die Faltung dieser Proteine verändert, können sie ihr Substrat nicht mehr umsetzen. Ein wichtiger Schritt nach der Aufreinigung der SOD1 Dimere war die Überprüfung der Fähigkeit der Dimere, Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid detoxifizieren zu können. Hierfür wurden die Proteine einmal über ein natives Polyacrylamidgel ohne denaturierende oder reduzierende Agenzien aufgetrennt und die enzymatische Aktivität direkt im Gel nachgewiesen (Abb. 8, 9). Zum quantitativen Nachweis der Dismutaseaktivität der SOD1 Dimere wurde ein Reaktionsansatz verwendet, der es erlaubte, die Reaktion in einem Plattenlesegerät photometrisch zu verfolgen (Abb. 10). Beide Nachweise zeigten hierbei, dass alle aufgereinigten SOD1 Dimere Superoxidanionen dismutieren konnten.

4.4.1 Qualitative Bestimmung der Dismutaseaktivität der aufgereinigten SOD1 Dimere mittels nativer Aktivitätsgele

Für einen qualitativen Nachweis der Dismutaseaktivität der aufgereinigten SOD1 Dimerproteine wurden jeweils 0,1 µg Protein auf ein natives Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung der Proteine wurde das Gel in einer Färbelösung mit NBT und Riboflavin inkubiert. Riboflavin, bzw. Vitamin B2 diente hierbei als Superoxidanionenproduzent. Unter Licht produziert Riboflavin freie Sauerstoffradikale, wie Superoxid (Heelis, 1982; Natera et al., 2011). Superoxidanionen dienen in diesem Versuch der Reduktion von Nitroblautetrazolium Chlorid (NBT) zu einem blauen Formazanfarbstoff. An jenen Stellen, an denen die Superoxidanionen von SOD1 zu H_2O_2 dismutiert wurden, erfolgte keine Reduktion des Nitroblautetrazoliumsalses durch Superoxid. Diese Stellen erschienen im gefärbten Gel als helle Flecken (Abb. 8). Als Kontrolle wurde eine rekombinante, monomere humane (h)SOD1 verwendet, welche eine Doppelbande im Gel ausbildete. Alle in dieser Arbeit aufgereinigten SOD1 Dimere zeigten eine Dismutaseaktivität, welche sich allerdings nicht nur durch eine Doppelbande im Gel abzeichnete, sondern durch zusätzliche Banden im höhermolekularen Bereich. Es ist davon auszugehen, dass die SOD1 Dimere unter nativen Bedingungen dazu in der Lage sind Multimere zu formen. Die in der Literatur als inaktiv geltende Mutation SOD1^{G85R} (Borchelt et al., 1994; Bruijn et al., 1997b; Cao et al., 2008) wies in den nativen Aktivitätsgele ebenfalls eine eindeutige, wenn auch schwache Dismutaseaktivität auf, deren Intensität im Laufe der Reaktion abnahm (Abb. 8).

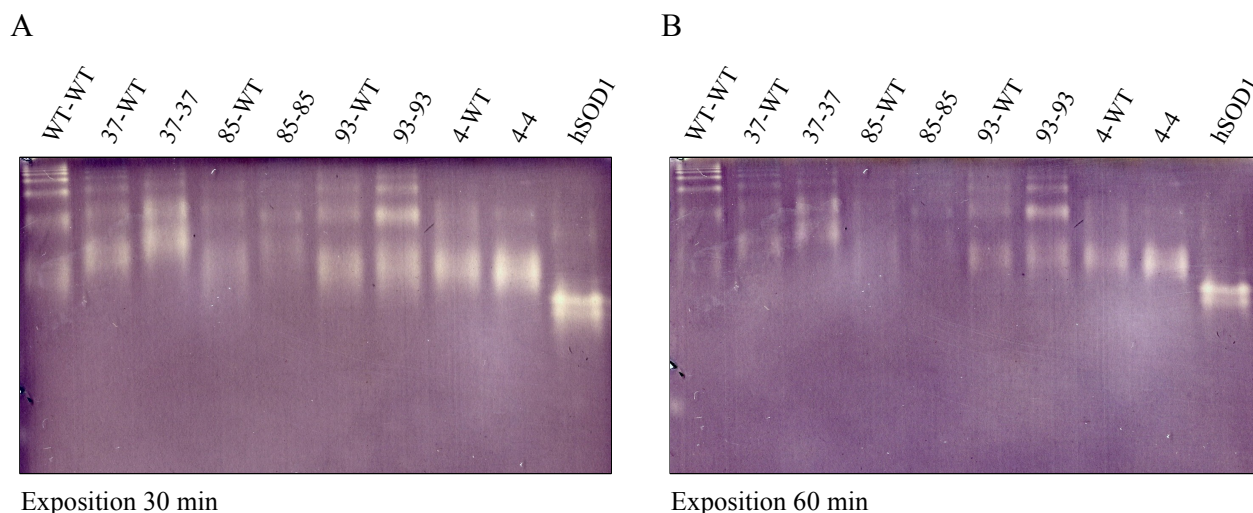


Abb. 8: Aktivitätsgele von bakteriell aufgereinigten SOD1 Homo- und Heterodimeren

Aktivitätsgele laufen unter nativen Bedingungen ohne SDS oder reduzierende Reagenzien. Es wurden je 0,1 µg SOD1 auf die 15 % Polyacrylamidgele aufgetragen, welche anschließend in einer Färbelösung mit Riboflavin und NBT für 45 min inkubiert und dem Licht ausgesetzt wurden. Helle Banden im Gel markieren Bereiche mit Superoxiddismutaseaktivität. 0,1 µg rekombinante monomere hSOD1 (*Sigma-Aldrich*) wurde als Kontrolle verwendet. Die Färbung der Gele durch Lichtexposition wurde in 5 min Abständen aufgezeichnet. Nach 30-minütiger Exposition zeigten alle SOD1 Homo- und Heterodimere eine enzymatische Aktivität. SOD1^{G85R} gilt als enzymatisch inaktiv. Nichtsdestotrotz wies das Homodimer SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ nach 30 min Exposition eine schwache enzymatische Aktivität auf, welche im Laufe der Reaktion reduziert wurde. Die Aktivität der monomeren hSOD1 manifestierte sich im Aktivitätsgel als Doppelbande, während die SOD1 Dimere mehrere Banden im höhermolekularen Bereich aufwiesen. Dies deutet auf eine mögliche Bildung von SOD1 Multimeren hin.

Als mögliche Mechanismen der Inaktivierung des mutanten Dimers SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ wurde hieraufhin die Hemmung des Enzyms durch sein eigenes Substrat oder Produkt untersucht. Jeweils 0,2 µg von SOD1^{WT-WT}, SOD1^{85-WT}, SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ und monomerer hSOD1 wurden 30 min bei 37 °C mit 10 ng/ml Riboflavin, 1 ng/ml Riboflavin, 2 µM H₂O₂ oder 0,2 µM H₂O₂ behandelt (Abb. 9). Eine Vorinkubation mit Riboflavin führte bei beiden verwendeten Konzentrationen zu einer verminderten enzymatischen Aktivität bei allen untersuchten SOD1 Proteinen und inhibierte die Dismutaseaktivität von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ gänzlich. Auch H₂O₂ wirkte bei den eingesetzten Konzentrationen regulierend auf die Aktivität der SOD1 Dimere. Bei einer Konzentration von 2 µM wies SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ keinerlei enzymatische Aktivität mehr auf. Lediglich die monomere hSOD1 wurde von H₂O₂ nicht wesentlich in ihrer Dismutaseaktivität beeinflusst.

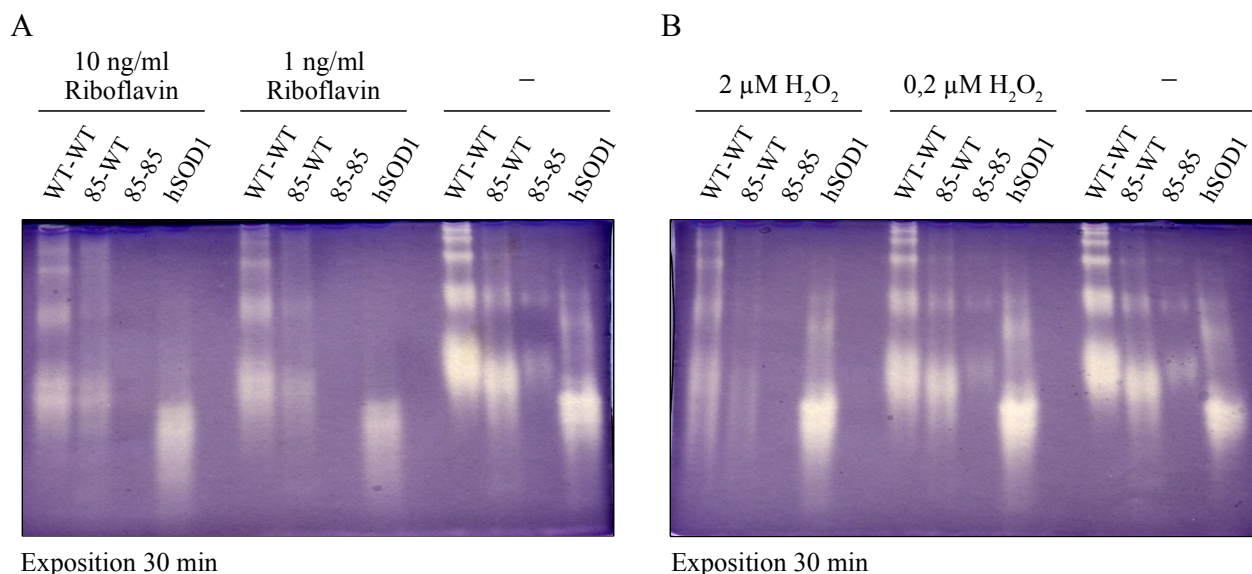


Abb. 9: Riboflavin und H₂O₂ inhibieren die Dismutaseaktivität von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵

Inkubation von 0,2 μg SOD1^{WT-WT}, SOD1^{85-WT}, SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ und monomerer hSOD1 mit 10 ng/ml und 1 ng/ml Riboflavin sowie 2 μM bzw. 0,2 μM H₂O₂ für 30 min bei 37 °C vor der Auftrennung auf einem nativen Aktivitätsgel zeigte, dass die enzymatische Aktivität von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ bei diesen Konzentrationen sowohl von Riboflavin als auch von H₂O₂ stark beeinträchtigt wurde, während die Aktivität der anderen SOD1 Proteine weniger stark beeinflusst war. SOD1^{85-WT} zeigte nach Behandlung mit 2 μM H₂O₂ ebenfalls eine deutlich schwächere Dismutaseaktivität.

4.4.2 Quantitative Messung der Dismutaseaktivität der aufgereinigten SOD1 Dimere mittels WST-1

Zur quantitativen Bestimmung der Dismutaseaktivität der aufgereinigten SOD1 Dimere wurde der Umsatz des verwendeten Tetrazolium Salzes WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-(2,4-Disulfophenyl)-2H-Tetrazolium, Natrium Salz) zu WST-Formazan gemessen. WST-1 ist im Gegensatz zu NBT sehr gut wasserlöslich und wird bei Reduktion in einen ebenfalls gut wasserlöslichen, gelben Formazanfarbstoff umgewandelt. Diese Farbumschlag lässt sich bei 450 nm photometrisch verfolgen. Die Absorption ist hierbei proportional zu der Menge an durch Xanthin/Xanthinoxidase produzierte O₂^{•-}, sodass die Dismutaseaktivität mit der Inhibition der Farbänderung gleichgesetzt werden kann. Die photometrische Messung wurde in einem Luminometer alle 5 min über 1 h vorgenommen. Zunächst wurde die Dismutaseaktivität der SOD1 Dimere bei den Konzentrationen 0,05 μg/ml, 0,1 μg/ml, 0,5 μg/ml, 1 μg/ml, 2 μg/ml, 5 μg/ml, 10 μg/ml, 20 μg/ml und 40 μg/ml über 60 min beobachtet (Abb. 10A). Nach 15 min Reaktionszeit zeigten alle SOD1 Dimere eine vergleichbare enzymatische Aktivität bei allen eingesetzten

Konzentrationen. Nach 30 min wies SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ eine schwächere Enzymaktivität auf als die übrigen SOD1 Proteine. Selbst bei der höchsten Konzentration von 40 µg/ml war die Aktivität von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ auf knapp 70 % reduziert. Nach 60 min wies SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ eine Enzymaktivität von 18,66 % ± 12,05 % auf, während die anderen Dimere nach dieser Zeit im Schnitt nur etwa 10 % Aktivität verloren hatten. Um die Kinetik der enzymatischen Aktivität über einen definierten Zeitraum zu untersuchen, wurde eine Konzentration gewählt, bei der die Aktivität der Enzyme im linearen Bereich lag. Hierfür wurden jeweils 2 µg/ml SOD1 Protein über 60 min alle 5 min im Plattenlesegerät gemessen (Abb. 10B). Es zeigte sich, dass bereits nach 50 min bei SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ keine Enzymaktivität mehr gemessen werden konnte. Die Unterschiede zur Aktivität der anderen SOD1 Dimere bei dieser Konzentration waren bis auf SOD1^{85-WT} signifikant. Verglichen mit monomerer hSOD1, entsprachen bei diesem Versuch etwa 2 µg/ml SOD1^{WT-WT} einer Aktivität von 5 U/ml hSOD1 (Abb. 10C).

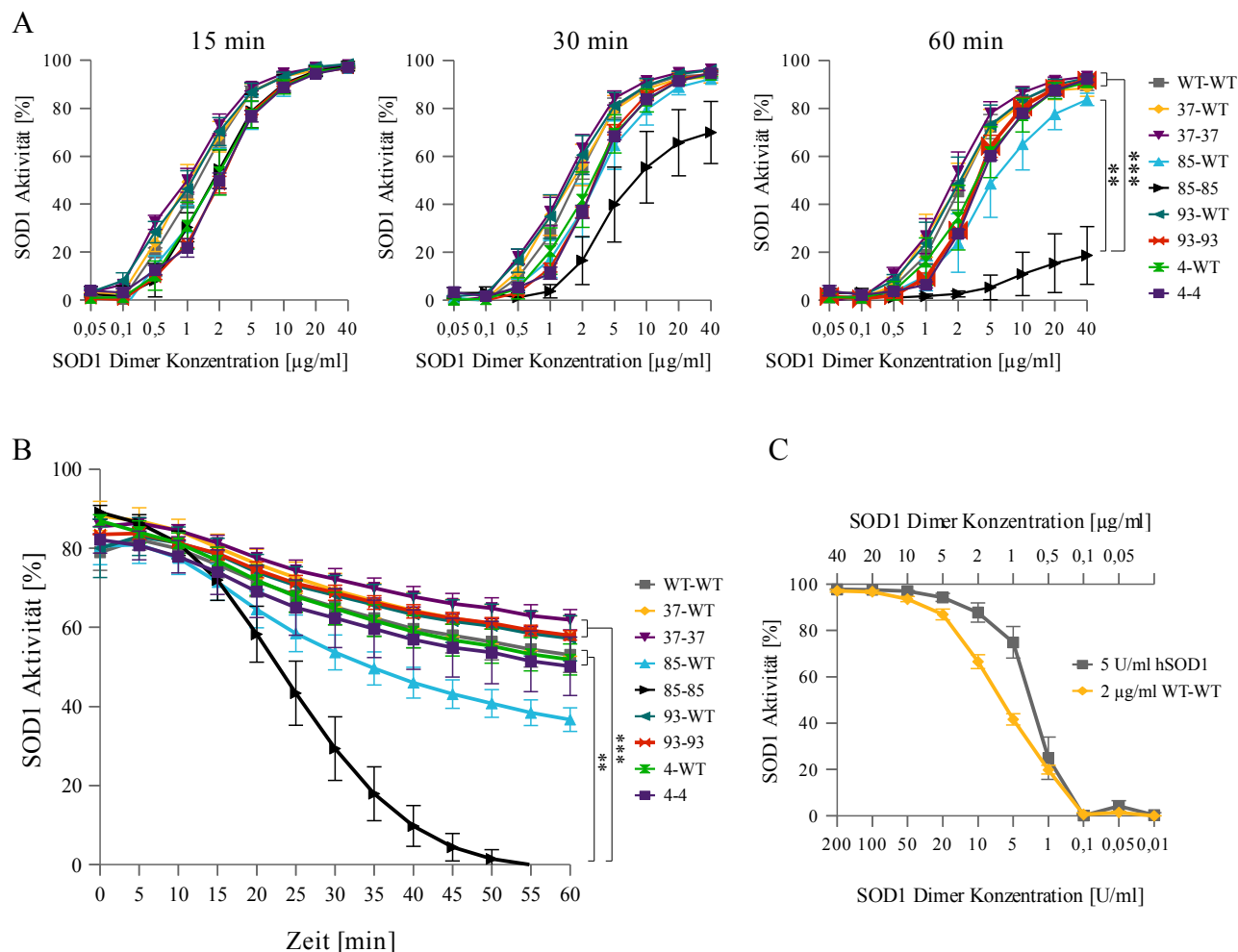


Abb. 10: Quantitative Aktivitätsbestimmung aufgereinigter SOD1 Dimere

Für eine quantitative Analyse der Dismutaseaktivität der SOD1 Dimere wurde der WST-1 Reaktionsansatz von *Dojindo* verwendet. Hierbei wird die Inhibition der Bildung des gelben Formazanals von WST-1 photometrisch bestimmt. Diese Inhibitionsrate ist mit der Dismutaseaktivität der SOD1 Dimere gleichzusetzen. Die Reaktion wurde hierbei in einem Plattenlesegerät bei 37 °C über eine Stunde alle 5 min gemessen.

A Die Dismutaseaktivität der SOD1 Dimere wurde bei unterschiedliche Konzentrationen alle 5 min gemessen. Bei Konzentrationen ab 10 µg/ml wiesen nach 15 min Reaktionszeit alle Dimere eine nahezu 100 %ige enzymatische Aktivität auf. Nach 30 min sank die Aktivität des Homodimers SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ bei einer Konzentration von 10 µg/ml auf unter 60 %. Der Unterschied war hierbei statistisch signifikant zu SOD1^{37-WT} ($p = 0,045$), SOD1³⁷⁻³⁷ ($p = 0,013$) und SOD1^{93-WT} ($p = 0,020$). Die enzymatische Aktivität von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ ging schließlich nach 60 min Reaktionszeit gegen null, während die Enzymaktivität der anderen SOD1 Dimere auch nach 60 min nur geringfügig abnahm. Lediglich SOD1^{85-WT} zeigte nach 60 min Inkubationszeit ebenfalls eine leicht verringerte Dismutaseaktivität.

B Um den kinetischen Verlauf der enzymatischen Aktivität im Detail zu verfolgen, wurden 2 µg/ml der SOD1 Dimere in die Reaktion eingesetzt und über 60 min gemessen. Während nach 15-minütiger Reaktionszeit das Dimer SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ nur eine etwas geringere Enzymaktivität aufwies als die anderen SOD1 Dimere, nahm die Aktivität dieses Dimers im Laufe der Zeit stark ab und war nach 55 min nicht mehr detektierbar. SOD1^{85-WT} zeigte im Laufe der Reaktion ebenfalls einen deutlichen Abfall seiner Enzymaktivität, während die übrigen SOD1 Homo- und Heterodimere nur eine geringfügige Abnahme in ihrer Aktivität aufwiesen.

C Die enzymatische Aktivität von 2 µg/ml aufgereinigter SOD1^{WT-WT} war vergleichbar mit der Aktivität von 5 U/ml monomerer hSOD1 (*Sigma-Aldrich*).

Die Graphen repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler aus je drei Messungen von drei voneinander unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Zur statistischen Analyse wurde eine Varianzanalyse mit wiederholten Messungen angewandt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.5 Metallgehalt der aufgereinigten SOD1 Dimere

Alle bekannten Superoxiddismutasen sind Metalloenzyme, d.h. sie enthalten Metallionen, die sie in ihrer Konformation stabilisieren oder zu ihrer katalytischen Aktivität beitragen. Bei der SOD1 unterstützt jeweils ein Zinkion pro Untereinheit das Dimer in seiner Struktur, während jeweils ein Kupferion pro Protein im aktiven Zentrum die Dismutasereaktion katalysiert. Die korrekte Beladung mit diesen Metallen ist somit entscheidend für die richtige Faltung und die enzymatische Aktivität der Proteine. Die Beladung der Proteine wurde photometrisch bestimmt, indem die Dimere unter denaturierenden Bedingungen mit einem Metallchelator (PAR) versetzt wurden, welcher unter Bindung von Metallen seine Absorption bei 490 nm verändert. Diese Absorptionsänderung wurde in einem Plattenlesegerät gemessen und die Proben anschließend mit NTA versetzt, welches eine hohe Affinität zu Zink besitzt und somit das Zink aus dem PAR-Cu/Zn-Komplex entfernt. Daraufhin wurden die Proben erneut bei 490 nm ausgelesen und anhand von Standardreihen die Kupfer- und Zinkmengen pro SOD1 Dimer bestimmt (Abb. 11). Alle Dimere waren vollständig mit Kupfer und teilweise mit Zink beladen.

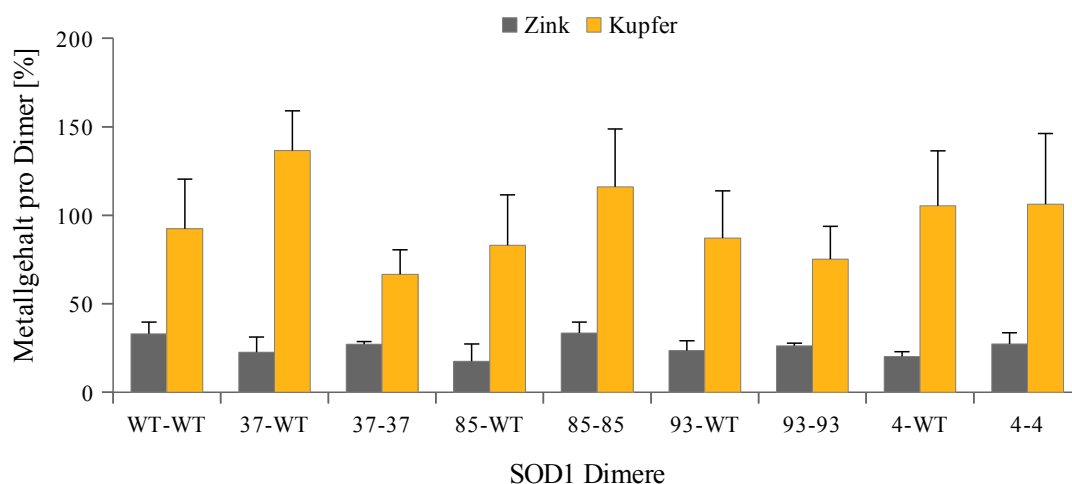


Abb. 11: Aufgereinigte SOD1 Dimere sind vollständig mit Kupfer- und teilweise mit Zinkionen beladen.

Die Beladung der SOD1 Dimere mit den Metallionen Kupfer und Zink wurde photometrisch bestimmt. Durch die Bindung von Metallionen erfolgte bei dem Reagenz PAR ein Farbumschlag, welcher sich bei einer Wellenlänge von 490 nm verfolgen läßt. Durch Zugabe von NTA konnte Zink aus dem PAR-Metallionenkomplex wieder entfernt werden, was sich in einer weiteren Änderung der Absorption von PAR bei 490 nm äußerte.

Es zeigte sich, dass alle SOD1 Dimere vollständig mit Kupfer und teilweise mit Zink beladen waren.

Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen ($n \geq 2$).

4.6 Expression der SOD1 Dimere in HEK-293t Zellen

Für die Arbeit in HEK-293t Zellen wurden die *sod1* Dimerkonstrukte in den pIRES-Vektor kloniert. Da dieser Vektor zwei multiple Klonierungsstellen besitzt, konnten die Dimerkonstrukte ohne Anhang in die multiple Klonierungsstelle A eingebracht werden, während in die zweite Klonierungsstelle das Markerprotein EGFP kloniert wurde. Dadurch konnte die Transfektionseffizienz verfolgt werden, ohne EGFP direkt an die SOD1 Dimere zu koppeln. Die Expression der Proteine wurde durch eine Western Blot Analyse belegt (Abb. 12).

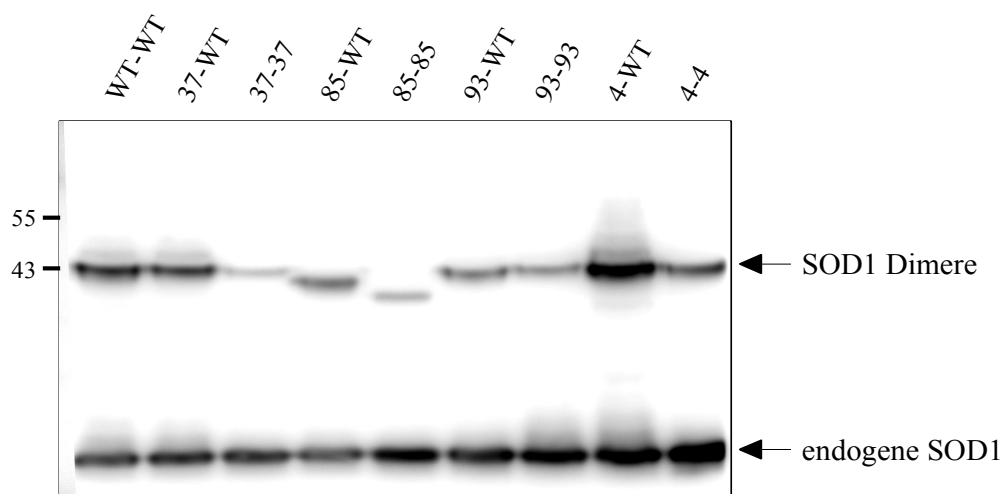


Abb. 12: Expression der SOD1 Dimere in HEK-293t Zellen

Nach Transfektion von HEK-293t Zellen mit *sod1* Dimerkonstrukten im pIRES-Vektor wurden die Dimere ohne Anhang in den Zellen exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte nach Transfer der Proben auf eine Nitrozellulosemembran mittels eines SOD1-spezifischen Antikörpers.

4.7 Proteinase K Verdau der SOD1 Dimere in HEK-293t Zellen

Proteinase K ist eine Serinprotease aus dem Schimmelpilz *Tritirachium album*, welche Peptidbindungen von denaturierten aber auch von nativen Proteinen spalten kann. Die Protease bevorzugt hierbei Peptidbindungen nahe der Karboxylgruppen von aliphatischen und aromatischen Aminosäuren, benötigt aber keine definierte Sequenz, um proteolytisch aktiv zu sein (Ebeling et al., 1974).

Mit *sod1* Dimeren im pIRES-Vektor transient transfizierte HEK-293t Zellen wurden lysiert, mit 10 µg/ml Proteinase K bei 37 °C inkubiert und die Reaktion direkt nach Zugabe der Protease (0 min) sowie nach 10, 20, 30 und 60 min mit dem Serinprotease-Inhibitor PMSF abgestoppt. Als Kontrolle wurde jeweils ein äquivalentes Volumen der Probe ohne Zugabe von Proteinase K verwendet. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Western Blot (Abb. 13A). Im Laufe der Reaktion wurden alle SOD1 Dimere durch Proteinase K degradiert, wodurch die Proteinmenge der Dimere über einen Zeitraum von 60 min abnahm. Abhängig von der Mutation wurden die SOD1 Proteine unterschiedlich schnell abgebaut. Zudem wurden SOD1 Heterodimere langsamer von der Proteinase K verdaut als ihre entsprechenden mutanten Homodimere. Das mutante Homodimer der Mutation SOD1^{G85R} wurde hierbei von der Protease innerhalb von 10 min fast vollständig abgebaut, während das korrespondierende Heterodimer SOD1^{85-WT} wesentlich langsamer degradiert wurde. Die Banden der Immunblots wurden densitometrisch ausgewertet und der Unterschied zwischen mutanten Homo- und Heterodimeren mittels einer Varianzanalyse mit wiederholten Messungen statistisch analysiert (Abb. 13B). Es zeigte sich, dass die Homodimere der Mutationen SOD1^{G37R}, SOD1^{G41D}, SOD1^{G41S} und SOD1^{G85R} eine statistisch signifikant erhöhte Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K aufwiesen als ihre korrespondierenden Heterodimere. Gleichzeitig zeigten die Heterodimere der wildtyp ähnlichen SOD1^{G37R} und SOD1^{G93A} eine mit dem SOD1^{WT-WT} Dimer vergleichbare Stabilität gegenüber Proteinase K. SOD1^{G41D-WT} und SOD1^{G41S-WT} zeigten durch die wildtypische Untereinheit sogar eine höhere Stabilität gegenüber Proteinase K als das wildtypische Homodimer SOD1^{WT-WT}. Der Vergleich von mutanten Homo- und Heterodimeren unabhängig von der Mutation zeigte, dass die wildtypische Untereinheit der Heterodimere die Resistenz SOD1 Dimere gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K statistisch signifikant erhöhte (Abb. 13C). Mit dem Abbau der Dimerproteine durch die Protease, erfolgte eine Zunahme der Proteinmenge monomerer SOD1. Dies deutet auf eine teilweise Degradation der Dimere zu Monomeren hin (Abb. 14). Es wurde hierbei beobachtet, dass die Zunahme monomerer SOD1 bei SOD1^{WT-WT} gegenüber allen mutanten Homodimeren signifikant erhöht war. Für die Mutationen SOD1^{G37R}, SOD1^{G85R} und SOD1^{A4V} war zudem die Zunahme monomerer SOD1 von Hetero- zum entsprechenden Homodimer signifikant erhöht.

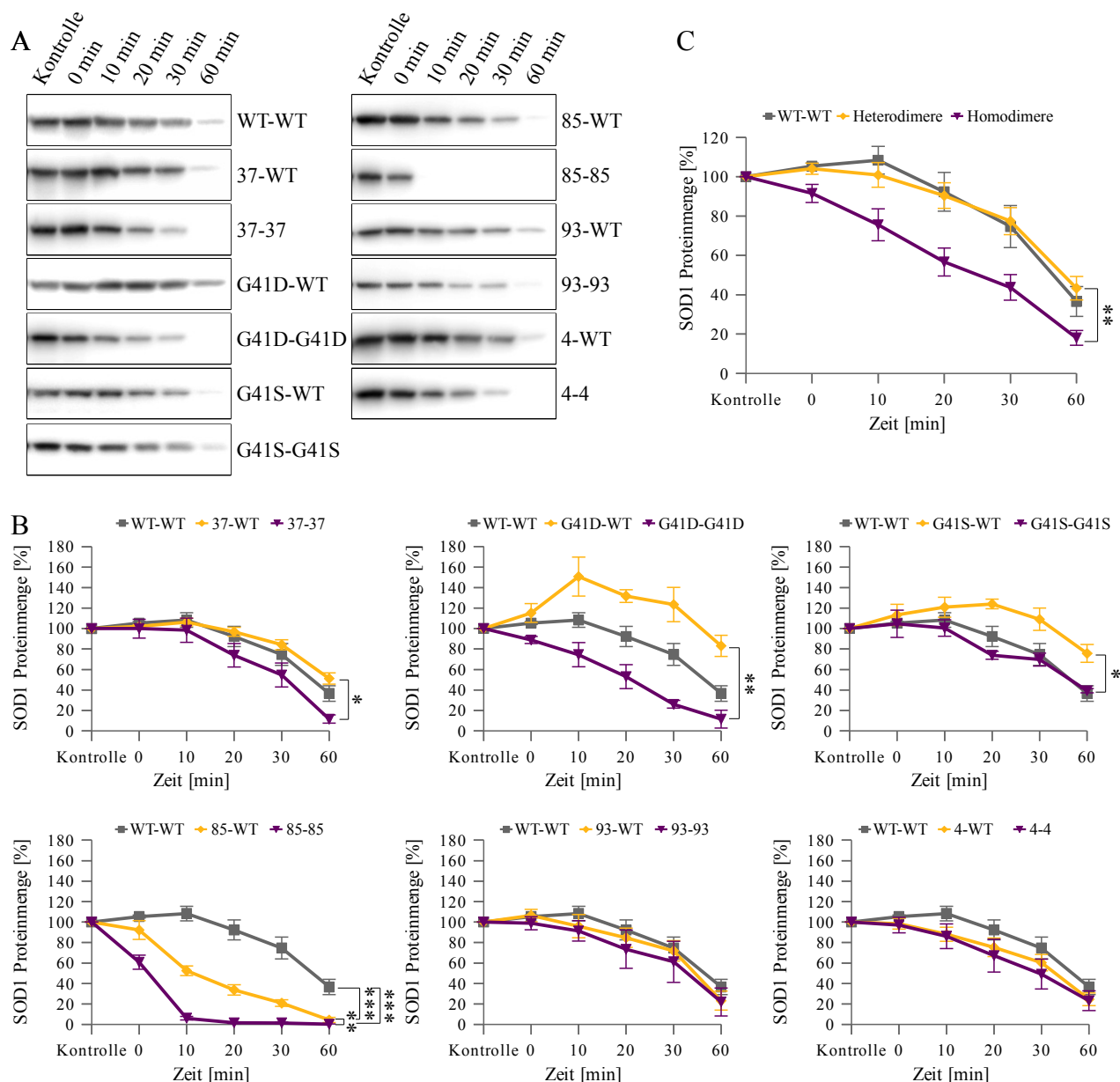


Abb. 13: In HEK-293T exprimierte SOD1 Homo- und Heterodimere zeigen unterschiedliche Stabilität gegenüber Proteinase K Verdau

A Mit *sod1* Dimeren im pIRES-Vektor transient transfizierte HEK-293T Zelllysate wurden mit 10 µg/ml Proteinase K bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 0, 10, 20, 30 und 60 min durch Zugabe von 5 mM PMSF abgestoppt. Unbehandelte Zelllysate jeder Probe wurden als Kontrolle verwendet. Die Ansätze wurden über ein 12 % SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mithilfe eines SOD1 Antikörpers (*Epitomics*) wurden die Proteine detektiert. Im Laufe der Reaktion nahm die Menge an SOD1 Dimeren in unterschiedlichem Ausmaß ab.

B Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden zeigte eine erhöhte Resistenz von SOD1^{WT-WT} und der SOD1 Heterodimere verglichen mit den mutanten Homodimeren. Die Dimerproteinmenge der unbehandelten Kontrolle wurde hierbei als 100 % definiert. Für die Mutationen SOD1^{G37R}, SOD1^{G41D}, SOD1^{G41S} und SOD1^{G85R} waren die Unterschiede zwischen mutantem Homo- und Heterodimer statistisch signifikant.

C Verglichen mit den mutanten SOD1 Homodimeren, erhöhte die wildtypische Untereinheit der korrespondierenden Heterodimere unabhängig von der Mutation die Stabilität gegenüber Proteinase signifikant.

Die Kurven repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen (n ≥ 3). Zur statistischen Analyse wurde eine Varianzanalyse mit wiederholten Messungen angewandt (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

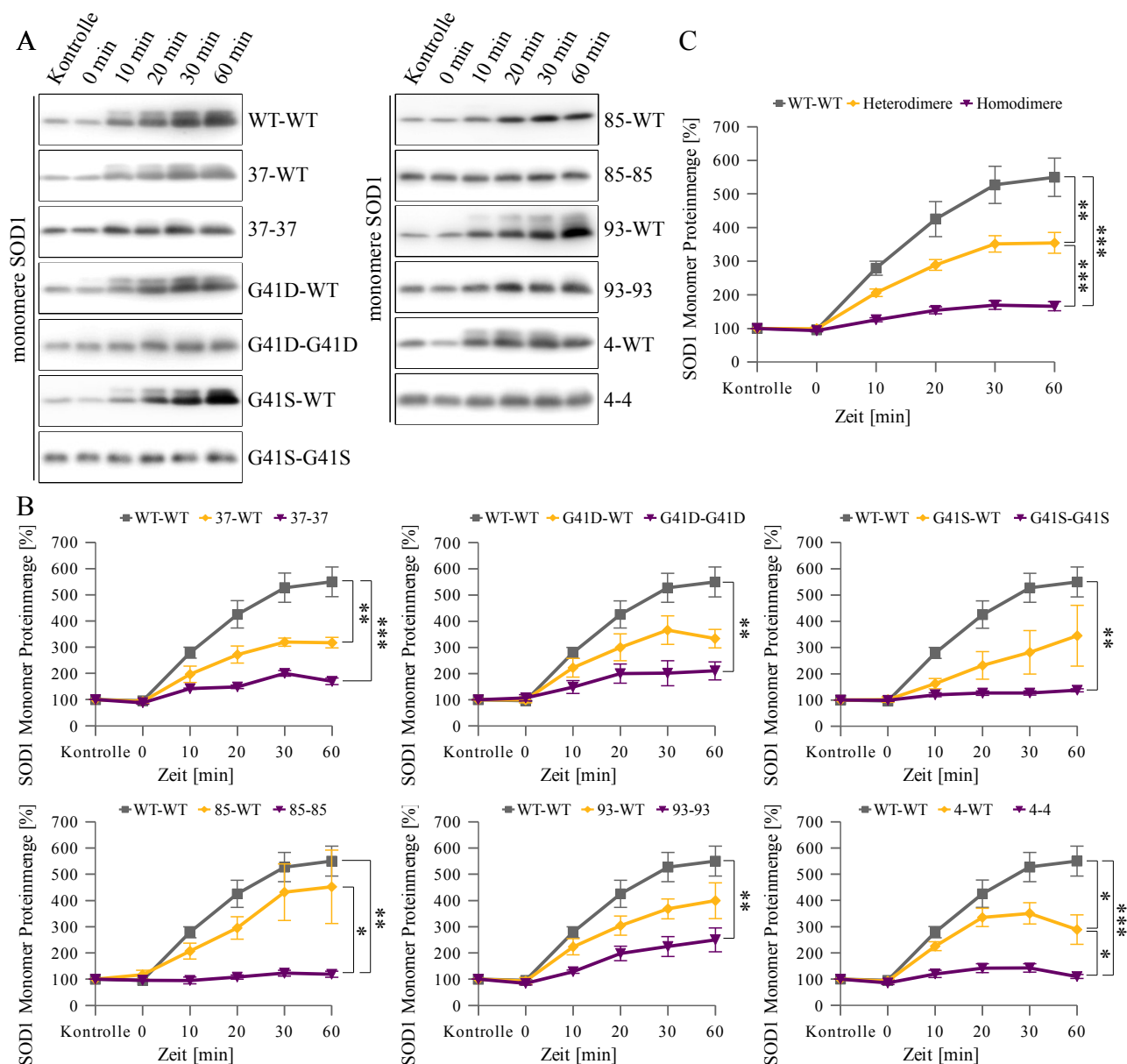


Abb. 14: In HEK-293t exprimierte SOD1 Homo- und Heterodimere werden durch Proteinase K zu Monomeren degradiert.

A Die während der Proteinase K Behandlung abgebauten SOD1 Homo- und Heterodimere wurden teilweise zu Monomeren abgebaut. Western Blot Analysen mit einem SOD1-spezifischen Antikörper (*Epitomics*) zeigten, dass im Laufe der Reaktion die Proteinmenge der SOD1 Monomere bei den einzelnen Dimeren in unterschiedlichem Umfang zunahm.

B Die densitometrische Auswertung der monomeren SOD1 Proteinbanden zeigte, dass die monomere SOD1 im Laufe der Proteinase K Reaktion bei SOD1^{WT-WT} am stärksten und bei SOD1 Heterodimeren ausgeprägter als bei den korrespondierenden Homodimeren akkumulierte. Die endogenen SOD1 der unbehandelten Kontrolle wurde als 100 % definiert. Für die Mutationen SOD1^{G85R} und SOD1^{A4V} waren die Unterschiede zwischen Homo- und Heterodimeren statistisch signifikant.

C Unabhängig von der Mutation akkumulierte die monomere SOD1 bei SOD1 Heterodimeren signifikant stärker als bei den Homodimeren. Die Zunahme monomeren Proteins war bei SOD1^{WT-WT} gegenüber den mutanten Dimeren ebenfalls statistisch signifikant.

Die Kurven repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen ($n \geq 3$). Zur statistischen Analyse wurde eine Varianzanalyse mit wiederholten Messungen angewandt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.8 Proteinase K Verdau der aufgereinigten SOD1 Dimere

Bei transienten Transfektionen können die Expressionsspiegel des rekombinanten Proteins bei verschiedenen Transfektionsansätzen mitunter stark variieren. Um die Stabilität der mutanten SOD1 Homo- und Heterodimere gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K unter kontrollierteren Bedingungen zu analysieren, wurden 0,25 µg der aufgereinigten SOD1 Dimere für den Verdau mit Proteinase K eingesetzt. Es wurden ähnliche Bedingungen geschaffen, wie bei der Behandlung der mit SOD1 Dimeren transient transfizierten HEK-293t Zellen. Hierfür wurde zu den SOD1 Dimeren jeweils 90 µg Gesamtlysate von nativen HEK-293t Zellen gegeben und der Verdau mit 10 µg/ml Proteinase K bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde auch hier jeweils nach 0, 10, 20, 30 und 60 min mit 0,5 mM PMSF abgestoppt. Die Proteinmenge der SOD1 Dimere wurde mittels Western Blot analysiert (Abb. 15A). Die Sensitivität der SOD1 Dimere gegenüber Proteinase K variierte zwischen den einzelnen Mutationen, nicht aber zwischen den Homo- und Heterodimeren einer Mutation. Die densitometrische Messung ergab ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Homo- und Heterodimeren einer Mutation. SOD1^{WT-WT} zeigte nur gegenüber den SOD1^{G85R} und SOD1^{A4V} mutanten Dimeren eine geringfügige, aber nicht signifikant erhöhte Resistenz gegen einen Abbau durch Proteinase K (Abb. 15B). Der zusammenfassende Vergleich aller Homo- und Heterodimere ergab, dass nach der Aufreinigung die wildtypische Untereinheit der SOD1 Heterodimere deren Abbau nicht mehr schützen konnte (Abb. 15C). Alle aufgereinigten Dimere wurden in gleichem Maße von Proteinase K degradiert. Auch bei den aufgereinigten Proteinen wurde beobachtet, dass die SOD1 Dimere durch Behandlung mit Proteinase K mitunter zu Monomeren degradiert wurden (Abb. 16). Die Zunahme monomerer SOD1 war in diesem Fall jedoch unabhängig von der Anwesenheit einer wildtypischen Untereinheit. Bei den Wildtyp-ähnlichen Mutationen SOD1^{G37R} und SOD1^{G93C} war die Zunahme monomerer SOD1 bei den Homodimeren sogar deutlich höher. Ähnlich wie bei der Proteinase K Behandlung in HEK-293t exprimierter SOD1 zeigte auch hier die SOD1^{G85R} Mutation den stärksten, jedoch statistisch nicht signifikanten Unterschied zwischen mutantem Homo- und Heterodimer (Abb. 16B, C).

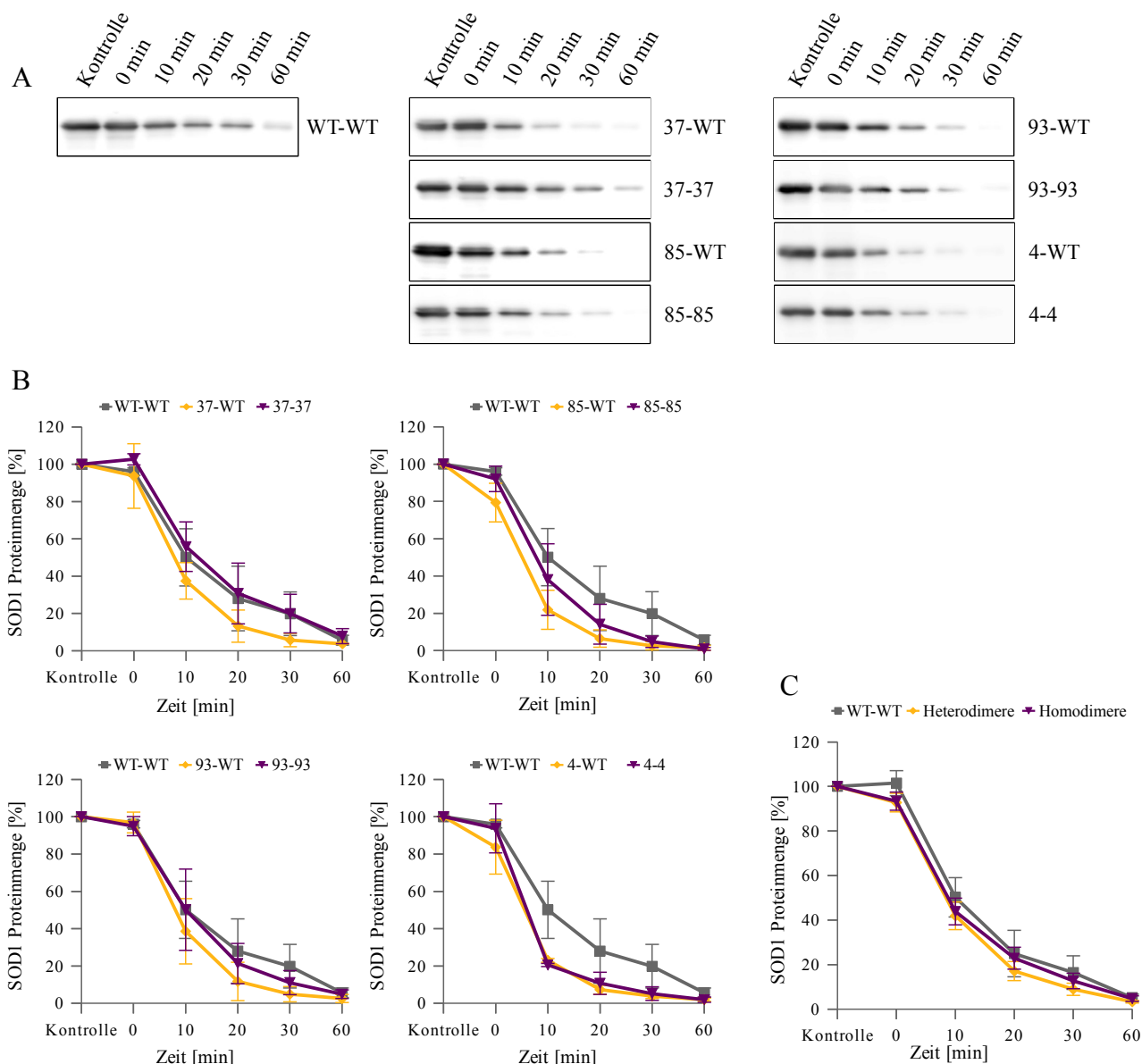


Abb. 15: Bakteriell aufgereinigte SOD1 Homo- und Heterodimere werden gleichmäßig durch Proteinase K abgebaut

A Für den Verdau wurden 0,25 µg aufgereinigte SOD1 Proteine mit 10 µg/ml Proteinase K bei 37 °C inkubiert. Hierbei wurde 90 µg natives HEK-293t Zelllysate als Puffer für die Proteinase eingesetzt. Die Reaktion wurde nach 0, 10, 20, 30 und 60 min durch Zugabe von 5 mM PMSF abgestoppt. Unbehandelte Zelllysate jeder Probe wurden als Kontrolle eingesetzt. Die Ansätze wurden über ein 12 % SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mithilfe eines SOD1 Antikörpers (*Epitomics*) wurden die Proteine detektiert. Im Laufe der Reaktion nahm die Proteinmenge der SOD1 Dimeren ab.

B Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden zeigt einen gleichmäßigen Abbau der SOD1 Homo- und Heterodimere. Die Proteinmenge der unbehandelten Kontrolle wurde als 100 % definiert.

C Der Vergleich von Homo- und Heterodimeren zeigte, dass nach der Aufreinigung die SOD1 Heterodimere durch die wildtypische Untereinheit nicht besser vor dem Abbau durch Proteinase K geschützt waren, als die mutanten Homodimere.

Die Kurven repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Versuchen (n=3).

Zur statistischen Analyse wurde eine Varianzanalyse mit wiederholten Messungen angewandt. Die Unterschiede zwischen SOD1^{WT-WT} und den mutanten Homo- und Heterodimeren waren statistisch nicht signifikant.

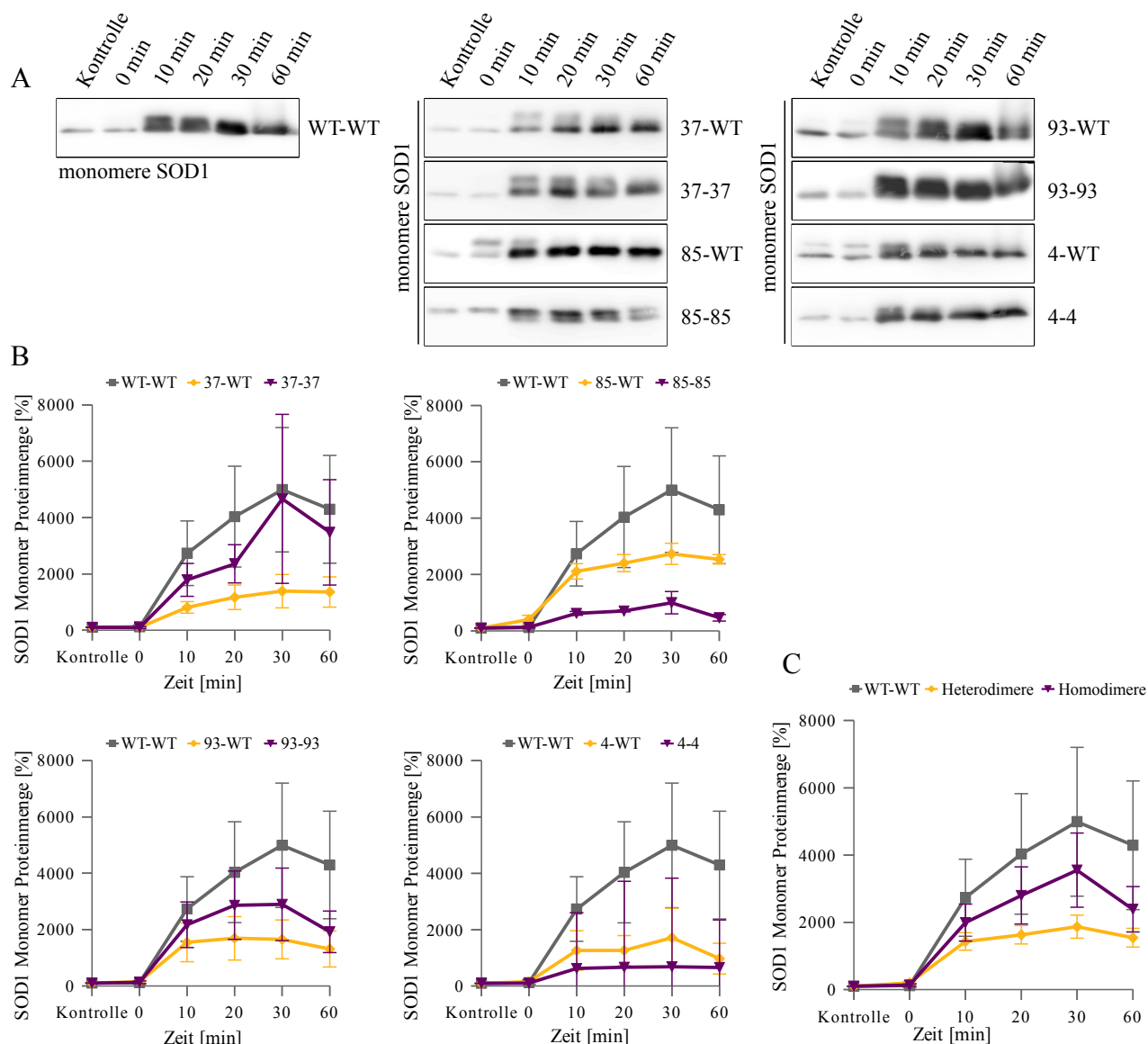


Abb. 16: Bakteriell aufgereinigte SOD1 Homo- und Heterodimere werden durch Proteinase K zu Monomeren abgebaut

A Die während der Proteinase K Behandlung abgebauten mutanten SOD1 Homo- und Heterodimere wurden teilweise zu Monomeren abgebaut. Western Blot Analysen mit einem SOD1-spezifischen Antikörper (*Epitomics*) zeigten, dass im Laufe der Reaktion die Proteinmenge der SOD1 Monomere bei den verschiedenen obligatorischen Dimeren in unterschiedlichen Umfang zunahm.

B Die densitometrische Auswertung der monomeren SOD1 Proteinbanden zeigte, dass die monomere SOD1 im Laufe der Proteinase K Reaktion bei SOD1^{WT-WT} am stärksten zunahm. Nur bei den wildtyp-ähnlichen SOD1^{G37R} und SOD1^{G93C} Mutationen war die Akkumulation monomerer SOD1 bei den mutanten Homodimeren stärker als bei den entsprechenden Heterodimeren. Zudem war bei keiner Mutation der Unterschied zwischen mutantem Homo- und Heterodimer oder von Hetero- oder Homodimer zu SOD1^{WT-WT} signifikant. Die endogene SOD1 der unbehandelten Kontrolle wurde als 100 % definiert.

C Der Vergleich von mutanten Homo- und Heterodimeren miteinander und mit dem wildtypischen Homodimer SOD1^{WT-WT} zeigte nur geringe Unterschiede bei der Akkumulation von SOD1 Monomeren.

Die Kurven repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Zur statistischen Analyse wurde eine Varianzanalyse mit wiederholten Messungen angewandt. Die Unterschiede zwischen SOD1^{WT-WT} und den mutanten Homo- und Heterodimeren waren statistisch nicht signifikant.

4.9 Proteinase K Verdau der SOD1 Dimere in BL21(DE3)pLysS Zellen

Da in HEK-293t Zellen exprimierte und bakteriell aufgereinigte SOD1 Dimere unterschiedlich schnell von Proteinase K abgebaut wurden, wurden mit *sod1* Dimeren im pET-14b-Vektor transformierte BL21(DE3)pLysS Bakterien lysiert und ebenfalls mit Proteinase K behandelt. Es sollte hierbei untersucht werden, ob die beobachteten Unterschiede in der Stabilität der SOD1 Dimere gegenüber Proteinase K durch die Expression in verschiedenen Systemen bedingt sein könnten. Es wurden 90 µg Bakterienlysate mit 10 µg/ml Proteinase K bei 37 °C inkubiert und die Reaktion nach 0, 10, 20, 30 und 60 min mit 0,5 mM PMSF abgestoppt. Anschließend wurden auch hier die Proben auf ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem SOD1-spezifischen Antikörper detektiert (Abb. 17A). Es konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen mutanten SOD1 Dimeren festgestellt werden. Lediglich SOD1^{WT-WT} zeigte eine verringerte Sensitivität gegenüber der Proteinase K Behandlung, wurde aber dennoch schneller degradiert als SOD1^{WT-WT} im HEK-293t Zelllysate. Die densitometrische und statistische Auswertung zeigte, dass auch hier die mutanten SOD1 Homo- und Heterodimere im gleichen Maße von der Protease abgebaut wurden (Abb. 17B, C).

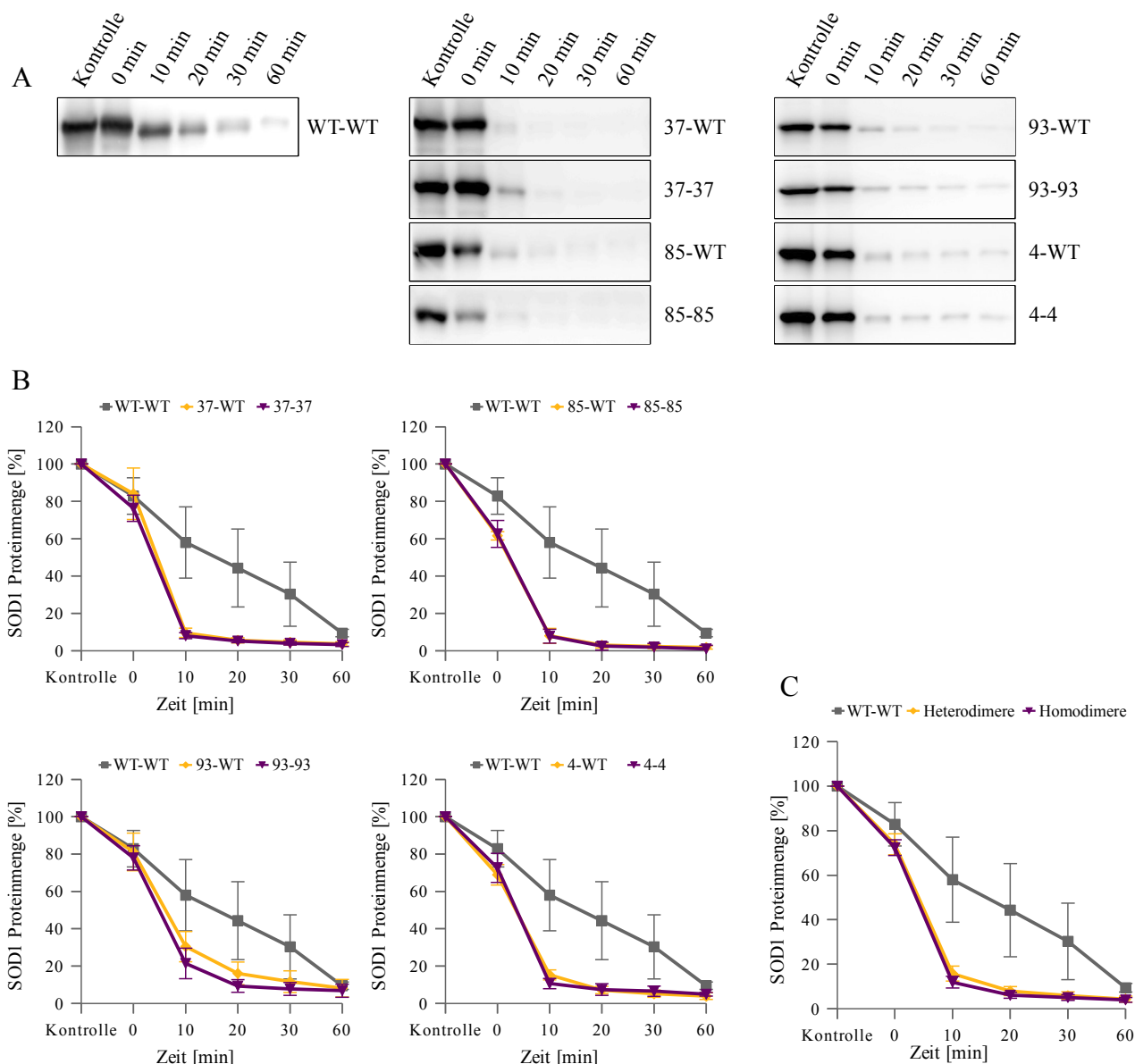


Abb. 17: Bakteriell exprimierte mutante SOD1 Homo- und Heterodimere werden gleichmäßig durch Proteinase K abgebaut

A 90 µg mit *sod1* Dimeren im pET-14b-Vektor transformierte BL21(DE3)pLysS Bakterienzellen wurden mit 10 µg/ml Proteinase K bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 0 min, 10 min, 20 min, 30 min und 60 min durch Zugabe von 5 mM PMSF abgestoppt. Unbehandelte Zelllysate jeder Probe wurden als Kontrolle eingesetzt. Die Ansätze wurden über ein 12 % SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mithilfe eines SOD1 Antikörpers wurden die Proteine detektiert. Im Laufe der Reaktion erfolgte eine Abnahme der SOD1 Proteinmenge.

B Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden zeigte einen gleichmäßigen Abbau der mutanten SOD1 Homo- und Heterodimere, lediglich SOD1^{WT-WT} zeigte eine etwas höhere Resistenz gegenüber Proteinase K. Die Proteinmenge der unbehandelten Kontrolle wurde als 100 % definiert.

C Der Vergleich von mutanten Homo- und Heterodimeren zeigte, dass nach der Aufreinigung die SOD1 Heterodimere durch die wildtypische Untereinheit nicht besser vor dem Abbau durch Proteinase K geschützt waren, als die mutanten Homodimere.

Die Kurven repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Versuchen (n = 3).

Zur statistischen Analyse wurde eine Varianzanalyse mit wiederholten Messungen angewandt. Die Unterschiede zwischen SOD1^{WT-WT} und den mutanten Hetero- und Homodimeren waren statistisch nicht signifikant.

4.10 Proteinase K Verdau der SOD1 Dimere in CCS (*Copper Chaperone for SOD1*)-depletierten HEK-293t Zellen

Die Ursache für den Unterschied in der Sensitivität der einzelnen SOD1 Dimere aus den verschiedenen Ansätzen gegenüber Proteinase K könnte darauf beruhen, dass im eukaryotischen System spezifische Proteine mit SOD1 interagieren. Eines der SOD1 bindenden Proteine ist das *Copper Chaperone for SOD1* (CCS), das Chaperon das SOD1 mit Kupfer belädt (Culotta et al., 1997; Casareno et al., 1998). Um zu untersuchen, ob CCS Einfluss auf die Sensitivität der SOD1 Dimere gegenüber Proteinase K Behandlung nimmt, wurden *sod1* Dimere im pIRES-Vektor in HEK-293t Zellen gleichzeitig mit CCS siRNA ko-transfiziert. Durch die Behandlung mit einer Kombination aus CCS siRNA_1 und CCS siRNA_2 konnte die Proteinmenge von CCS in den HEK-293t Zellen gesenkt werden. Gleichzeitig nahm die SOD1 Dimer Proteinmenge mit verminderten CCS Spiegeln zu, während kein eindeutiger Effekt auf die endogene SOD1 beobachtet werden konnte (Abb. 18).

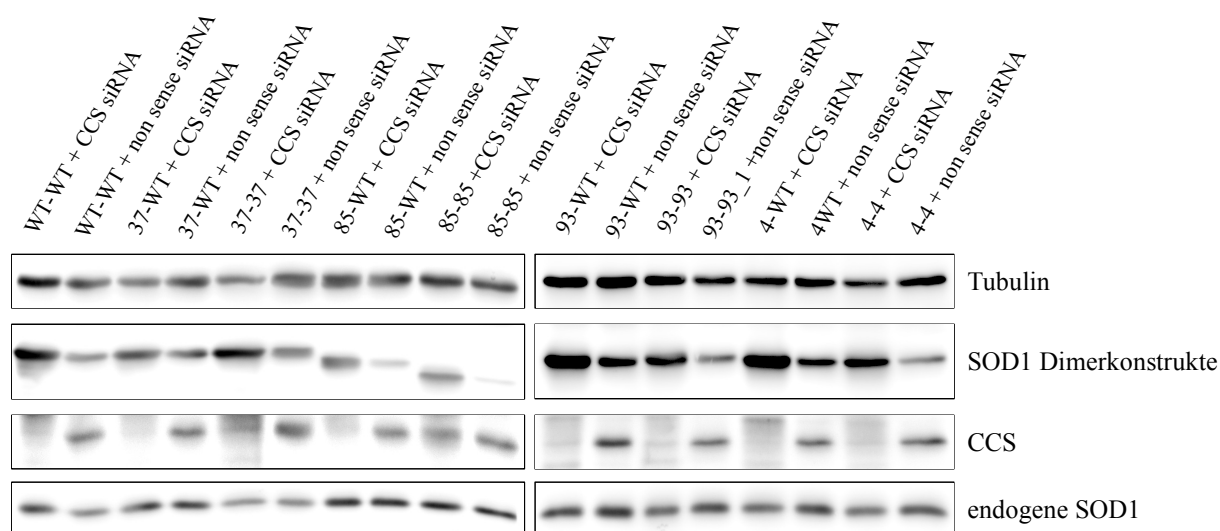


Abb. 18: Mit CCS siRNA behandelte HEK-293t Zellen weisen eine niedrigere CCS Proteinmenge auf.

HEK-293t Zellen wurden mit *sod1* Dimeren im pIRES-Vektor und einer Kombination aus CCS siRNA_1 und CCS siRNA_2 ko-transfiziert. Als Kontrolle wurden die gleichen *sod1* Dimerkonstrukte jeweils zusätzlich mit siRNA bestehend aus einer willkürlichen Basenfolge (*non sense* siRNA) ko-transfiziert. Die Lysate der Zellen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Diese wurde mit Antikörpern gegen CCS, SOD1 und Tubulin inkubiert. Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit CCS siRNA in allen SOD1 Dimer transfizierten Zellen zu verminderten CCS Spiegeln führte. Gleichzeitig nahm die SOD1 Dimerproteinmenge mit verminderten CCS Spiegeln zu, während kein eindeutiger Effekt auf die endogene SOD1 beobachtet werden konnte. Für jedes SOD1 Dimer wurden zwei voneinander unabhängige Transfektionen durchgeführt (n = 2).

Die Depletion von CCS in den HEK-293t Zellen führte zu keiner Veränderung der SOD1 Dimere in ihrer Sensitivität gegenüber Proteinase K, verglichen mit Zellen, die nicht mit siRNA oder mit einer siRNA mit willkürlicher Basenfolge behandelt wurden (Abb. 19).

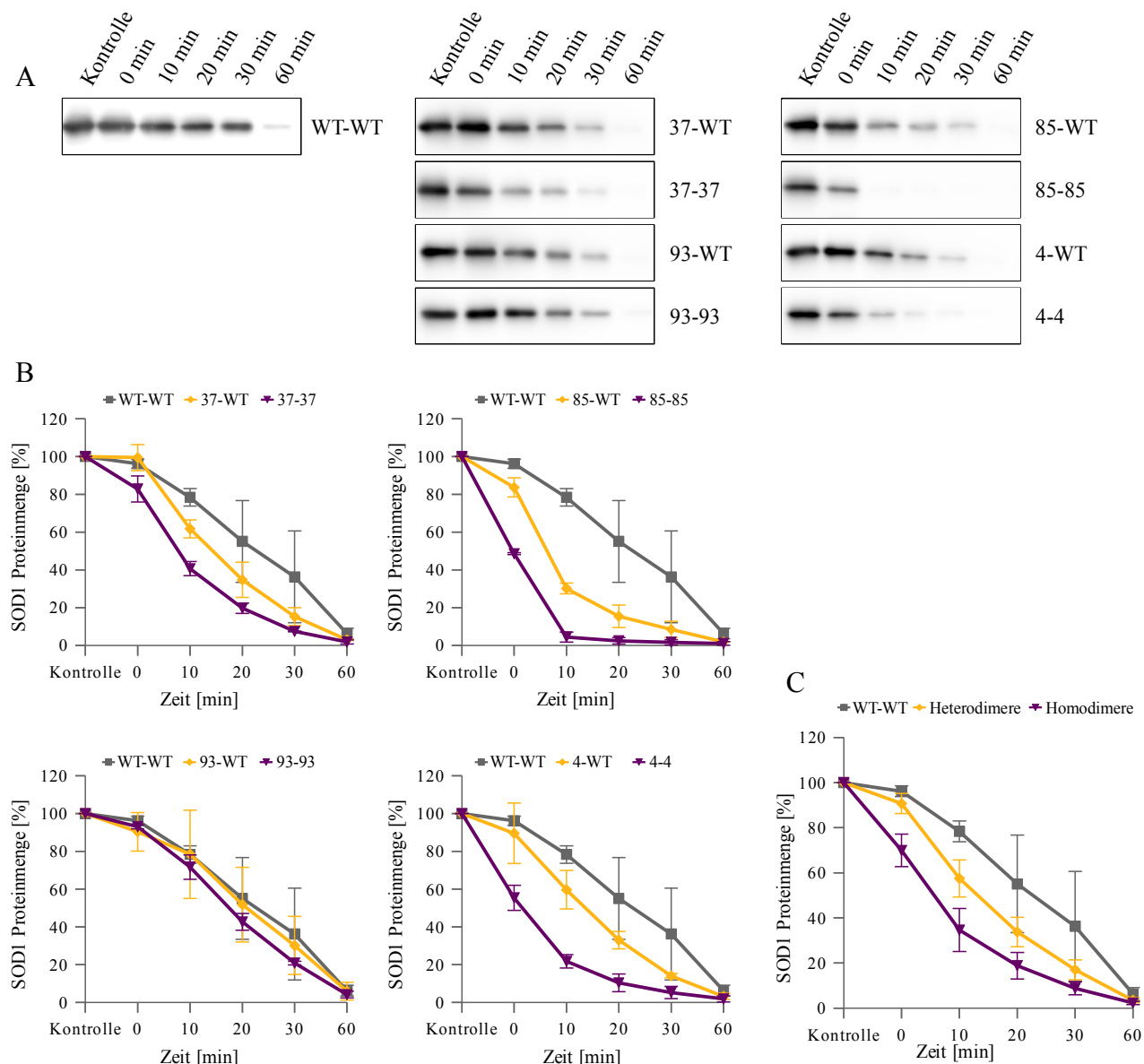


Abb. 19: CCS hat keinen Einfluss auf die unterschiedliche Resistenz der SOD1 Homo- und Heterodimere gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K.

A Mit *sod1* Dimeren im pIRES-Vektor und CCS siRNA transient transfizierte HEK-293t Zellen wurden mit 10 µg/ml Proteinase K bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 0, 10, 20, 30 und 60 min durch Zugabe von 5 mM PMSF abgestoppt. Unbehandelte Zelllysate jeder Probe wurden als Kontrolle verwendet. Western Blot Analysen mit einem SOD1-spezifischen Antikörper (*Epitomics*) zeigten, dass auch in Zellen, in denen CCS herunterreguliert wurde, die SOD1 Heterodimere resistenter gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K waren.

B Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden ergab, dass SOD1 Heterodimere, die gleichzeitig mit CCS siRNA in HEK-293t Zellen exprimiert wurden, weniger schnell durch Proteinase K degradiert wurden als die entsprechenden mutanten Homodimere.

C Unabhängig von der Mutation erhöhte die wildtypische Untereinheit der SOD1 Heterodimere die Stabilität gegenüber Proteinase K, verglichen mit den korrespondierenden mutanten Homodimeren.

Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen (n = 2).

4.11 Konformationsstudien der aufgereinigten SOD1 Dimere

Die bisherigen Untersuchungen der SOD1 Dimere zeigten, dass mutante SOD1 Homo- und Heterodimere unterschiedliche Resistenzen gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K aufwiesen. Um zu überprüfen, ob diese Unterschiede auf strukturelle Veränderungen zurückzuführen sind, wurden Konformationsstudien der rekombinanten Proteine durchgeführt. Die exakte Faltung ist besonders bei Enzymen von großer Bedeutung, da mit ihr auch die physiologische Funktion der Proteine einhergeht. Anhand der enzymatischen Aktivität der SOD1 Dimerproteine (Abb. 8) konnte gezeigt werden, dass die Konformation der SOD1 Dimere im Bereich des aktiven Zentrums eine Dismutaseaktivität ermöglichte. Die Interaktion zwischen den beiden Untereinheiten des SOD1 Dimers kann sich ebenfalls auf die Konformation der Proteine auswirken. Bei einem SOD1 Heterodimer, in dem ein mutantes und ein wildtypisches SOD1 Protein miteinander interagieren, könnte eine Untereinheit die Sekundärstruktur der anderen Untereinheit verändern.

4.11.1 Untersuchung der SOD1 Dimere auf intermolekulare Disulfidbrückenbildung

In Abb. 8 wird deutlich, dass die hellen Banden im nativen Aktivitätsgel, welche die Dismutaseaktivität repräsentierten, nicht allein auf Höhe des SOD1 Dimers erschienen, sondern auch im höhermolekularen Bereich auftraten. Aufgrund dieser Beobachtung sollte untersucht werden, ob die Untereinheiten verschiedener SOD1 Dimere miteinander durch Disulfidbrücken verbunden sein könnten. Die Proteine wurden hierfür über eine SDS-PAGE aufgetrennt, wobei der Ladepuffer, mit dem die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, entweder mit SDS und β -Mercaptoethanol oder nur mit SDS ohne reduzierende Reagenzien versetzt war. Zusätzlich wurden auch Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, die in einem Ladepuffer ohne β -Mercaptoethanol zusätzlich nicht aufgeköcht wurden (Abb. 20). Es zeigte sich, dass sich das Laufverhalten der SOD1 Dimere leicht veränderte, wenn die Proben in einem nicht-reduzierenden Ladepuffer aufgeköcht wurden. Allerdings ergab diese Behandlung keine Verschiebung in den höhermolekularen Bereich, die Dimerproteine liefen vielmehr auf einer etwas niedrigeren Höhe, verglichen mit den Proteinen, die in einem Ladepuffer mit β -Mercaptoethanol aufgeköcht wurden. Wurden die Proben in einem Laufpuffer ohne β -Mercaptoethanol 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, ergab sich ein diffuses Muster an Proteinbanden. Lediglich SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ manifestierte sich, wie nach Behandlung in Laufpuffer ohne β -Mercaptoethanol bei 99 °C, in einer definierten Proteinbande auf der gleichen Höhe.

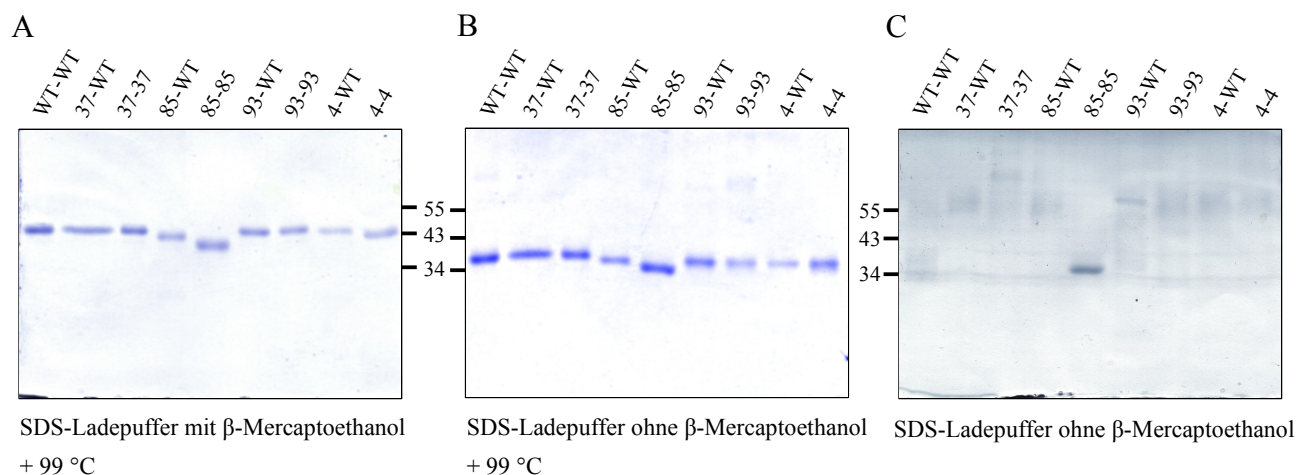


Abb. 20: Multimerisierung aufgereinigter SOD1 Dimere beruht nicht auf Disulfidbrückenbildung zwischen den Untereinheiten verschiedener SOD1 Dimere

Proben der SOD1 Dimere wurden zum einen in einem Ladepuffer mit SDS und β -Mercaptoethanol bei 99 °C 5 min aufgekocht, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden (A), zum anderen mit einem Ladepuffer mit SDS, allerdings ohne β -Mercaptoethanol versetzt. Diese Proben wurden entweder ebenfalls 5 min bei 99 °C aufgekocht (B) oder 5 min bei Raumtemperatur inkubiert (C). Das Gel wurde anschließend in Coomassie Lösung gefärbt. Die Vorbereitung der Proben in einem Ladepuffer ohne reduzierende Reagenzien hatte keine Ausbildung weiterer Banden im höhermolekularen Bereich zur Folge. Fehlte β -Mercaptoethanol im Ansatz, liefen die SOD1 Dimerproteine sogar auf einer etwas niedrigeren Höhe als die Proben, die mit SDS und β -Mercaptoethanol aufgekocht worden waren. Proben, die mit einem Ladepuffer ohne β -Mercaptoethanol nur bei Raumtemperatur inkubiert wurden, zeigten ein diffus verteiltes Muster an Proteinbanden, was auf eine ungenügende Entfaltung der Proteine hinwies. Lediglich bei SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ reichte eine Inkubation mit SDS bei RT aus, um das Protein vollständig zu entfalten.

4.11.2 Bestimmung der Sekundärstruktur der SOD1 Dimere mittels CD (*Circular Dichroism*)-Spektroskopie

Zirkularer Dichroismus (*Circular Dichroism*; *CD*) bezeichnet die Eigenschaft von chiralen Molekülen, zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Die Enantiomere eines Moleküls, also Bild und Spiegelbild, bezeichnet man daher auch als optisch aktiv. Die Absorptionsrate chiraler Moleküle kann über verschiedene Wellenlängen gemessen werden, wodurch sich ein Spektrum ergibt, welches z.B. Aufschluss über die Sekundärstruktur von Proteinen geben kann. Da die Konformation einer Untereinheit in einem SOD1 Dimer durch die mit ihr interagierende zweite Untereinheit verändert werden könnte, wurden die Sekundärstrukturen der jeweiligen mutanten SOD1 Homo- und Heterodimere miteinander verglichen.

Für die Bestimmung der Sekundärstruktur der aufgereinigten SOD1 Dimere wurde der Wellenlängenbereich von ultraviolett Licht (190 – 260 nm) gewählt (Abb. 21).

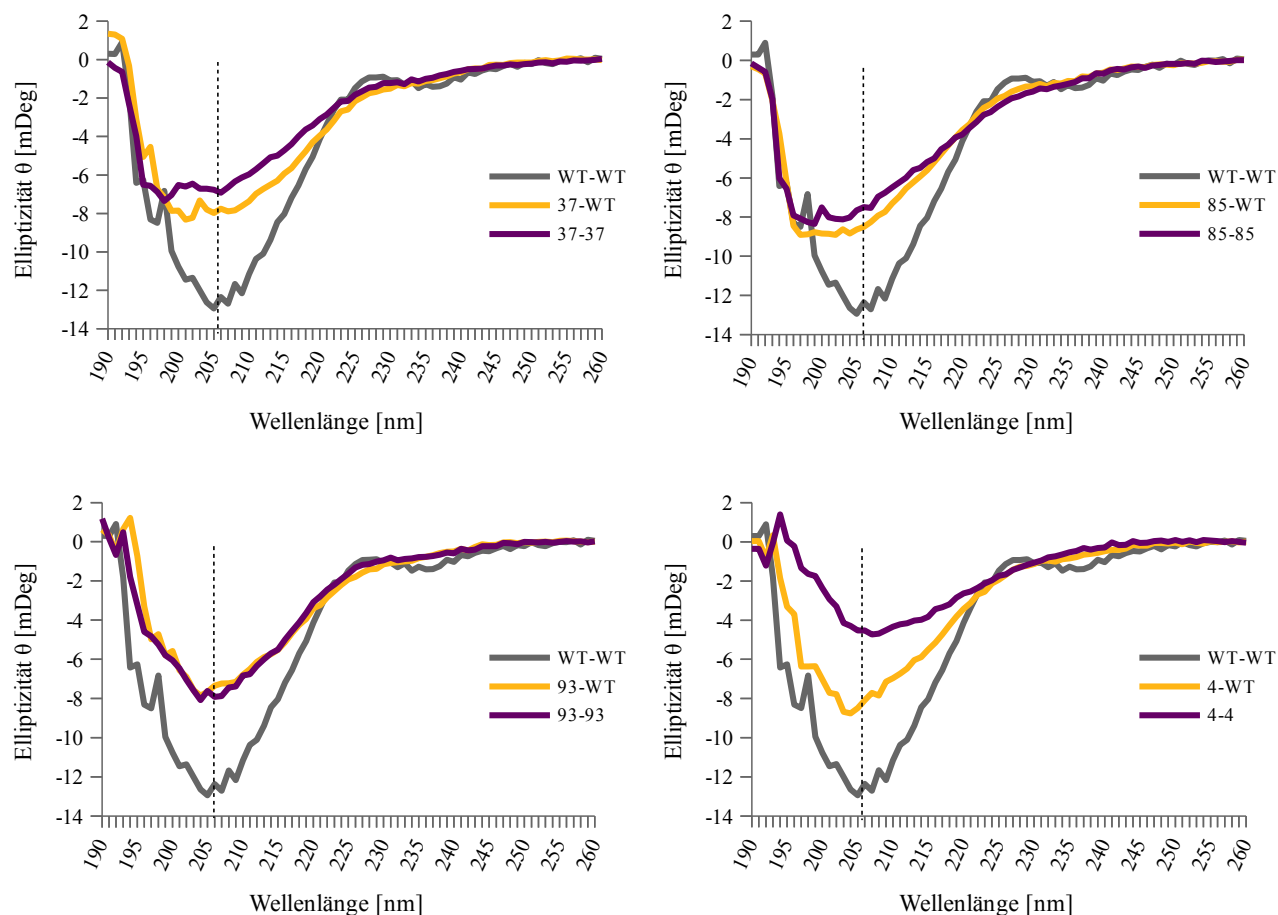


Abb. 21: CD-Spektren aufgereinigter SOD1 Dimere

Die Spektren der SOD1 Homo- und Heterodimere zeigten, dass die Minima der Homo- und Heterodimere von SOD1^{G37R}, SOD1^{G85R} und SOD1^{A4V} von dem Minimum des wildtypischen SOD1 Dimers abweichen.

Für die Aufnahme der CD-Spektren wurden pro Dimerkonstrukt jeweils 0,3 µg/µl von drei voneinander unabhängigen Proben (n = 3) zehnmal gemessen und die Messungen gemittelt.

Es wurden jeweils 0,3 µg/µl Protein für jede Messung verwendet. Pro SOD1 Dimer wurden drei voneinander unabhängig aufgereinigte Proteinproben verwendet und jede Probe zehnmal gemessen. Diese Messung und die Messungen der drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden anschließend gemittelt und zur Auswertung in die Datenbank *Dichroweb* eingegeben. Der Vergleich mit bereits bekannten Proteinstrukturen aus verschiedenen Datenbanken erlaubte anschließend die Auswertung der CD-Spektren und die Bestimmung der Anteile von Helices und β -Faltblattstrukturen in den SOD1 Dimeren (Tabelle 18).

Tabelle 18: Anteile an α -Helices und β -Faltblattstrukturen in den bakteriell aufgereinigten SOD1 Dimeren

SOD1 Dimer	α-Helix	β-Faltblatt	andere Strukturen
SOD1 ^{WT-WT}	7,7 %	36,4 %	55,9 %
SOD1 ^{37-WT}	6,4 %	37,0 %	56,5 %
SOD1 ³⁷⁻³⁷	6,2 %	37,4 %	56,3 %
SOD1 ^{85-WT}	6,5 %	37,1 %	56,3 %
SOD1 ⁸⁵⁻⁸⁵	6,1 %	37,6 %	56,3 %
SOD1 ^{93-WT}	7,0 %	36,6 %	56,4 %
SOD1 ⁹³⁻⁹³	6,4 %	37,3 %	56,4 %
SOD1 ^{4-WT}	6,5 %	37,0 %	56,6 %
SOD1 ⁴⁻⁴	6,1 %	37,8 %	56,1 %

Die Auswertung der Spektren ergab, dass der Anteil an α -Helices mit der Abnahme an wildtypischen Untereinheiten leicht zurückging, während gleichzeitig der Anteil an β -Faltblattstrukturen zunahm. In der Literatur schwanken die Angaben für die wildtypische SOD1 von 60 % β -Faltblattstrukturen sowie 30 % anderer Strukturen (Nagami et al., 2005; Hong et al., 2009) und 6 % α -Helices, 43 % β -Faltblattstrukturen sowie 51 % anderer Strukturen (Arnesano et al., 2004). In der Datenbank von UniProt sind die α -Helices im wildtypischen Protein mit 4,6 % und die β -Faltblattstrukturen mit 52,3 % angegeben. Vergleichbar mit den Spektrum des SOD1^{WT-WT} Dimers liegen die Minima weiterer gemessener CD-Spektren ebenfalls zwischen 205 und 210 nm (Arnesano et al., 2004; Banci et al., 2007; Potter et al., 2007; Rakhit et al., 2007; Hong et al., 2009; Stevens et al., 2010; Kitamura et al., 2011).

4.11.3 Immunpräzipitation der SOD1 Dimere mit Antikörpern gegen fehlgefaltete SOD1

Die Antikörper SEDI (*SOD1 exposed dimer interface*) und USOD (*unfolded SOD1*) detektieren spezifisch SOD1 Moleküle, deren Dimerisierungsdomäne gestört ist (SEDI) oder welche eine entfaltete Struktur aufweisen (USOD). Diese Antikörper wurden hier für Immunpräzipitationen eingesetzt. Hierfür wurden die SOD1 Dimere transient in HEK-293t Zellen exprimiert. Nach Expression über den pIRES-Vektor lagen die unmarkierten Proteine sowie ungebundenes EGFP in den Zellen vor. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer aufgeschlossen, welcher die Zellmembranen aufricht, ohne einen Einfluss auf die Konformation von Proteinen auszuüben. Die Lysate wurden jeweils mit 2 µg der Antikörpern versetzt und nach der IP per Western Blot analysiert. Es zeigte sich, dass die SOD1 Dimere unterschiedlich gut von SEDI und USOD detektiert und vom Rest des Zelllysats getrennt worden waren (Abb. 22). SOD1^{WT-WT} ebenso wie die endogene SOD1 zeigte hierbei die geringste Interaktion mit den Antikörpern. Verglichen mit den Expressionsspiegeln der SOD1 Dimere (Abb. 22A) wurde weiterhin deutlich, dass die SOD1 Heterodimere weniger gut durch SEDI und USOD erkannt wurden als die mutanten Homodimere. Hierbei wiesen von den mutanten SOD1 Dimeren vor allem die Heterodimere der Wildtyp- ähnlichen Mutationen SOD1^{G37R} und SOD1^{G93C} die geringste Interaktion mit SEDI und USOD auf (Abb. 22B, C). Als Kontrolle wurde zum einen ein leerer pEGFP_N1-Vektor verwendet, wodurch ausschließlich EGFP in den Zellen exprimiert wurde. Außerdem wurde ein Teil des Zelllysats statt mit den Antikörpern mit 2 µg Immunglobulin G (IgG) versetzt und ebenfalls immunpräzipitiert, um eine unspezifische Bindung der SOD1 Dimere an die Antikörperketten von SEDI und USOD ausschließen zu können (Abb. 22D).

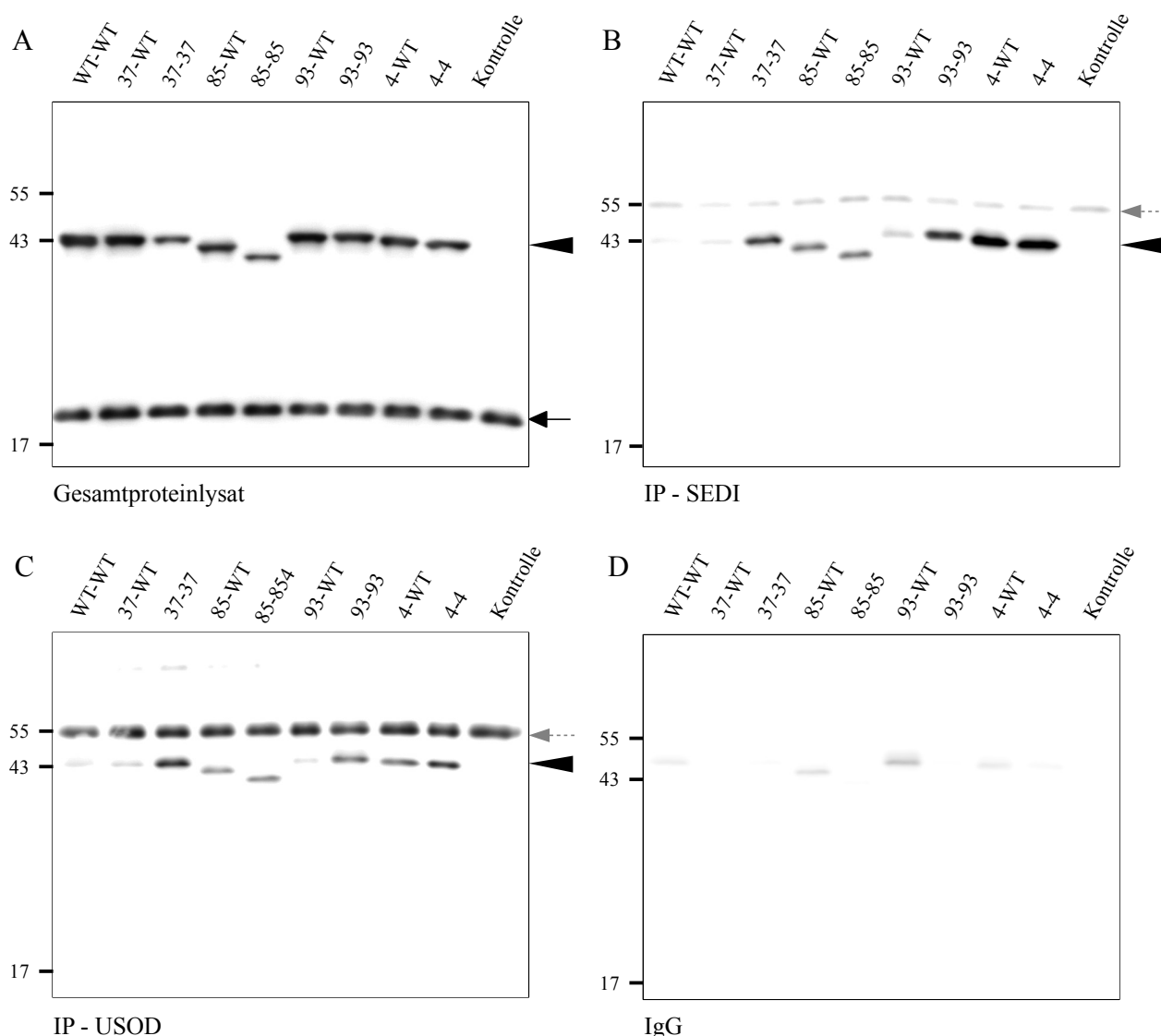


Abb. 22: IPs der rekombinanten SOD1 Homo- und Heterodimere mit SEDI und USOD Antikörpern

Für die IPs wurden *sod1* Dimerkonstrukte im pIRES-Vektor transient in HEK-293t Zellen exprimiert, die Zellen lysiert und mit den Antikörpern SEDI und USOD inkubiert. Nach den IPs wurden die Ansätze auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Sowohl endogene SOD1 (Pfeil) als auch die SOD1 Dimere (Pfeilkopf) wurden mit einem kommerziellen SOD1 Antikörper (*Epitomics*) detektiert. Der graue Pfeil markiert die Antikörperbande von SEDI oder USOD. Gezeigt sind repräsentative Western Blots.

A Zur Überprüfung der Expressionsrate der SOD1 Dimere in den HEK-293t Zellen wurden von jeder Probe 15 µg Gesamtproteinmenge auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem leeren pEGFP_N1-Vektor transfiziert.

B, C IPs der SOD1 Homo- und Heterodimere mit 2 µg der Antikörper SEDI und USOD zeigten, dass beide Antikörper eine hohe Affinität zu allen mutanten Homodimeren aufwiesen. Die wildtypische Untereinheit der SOD1 Heterodimere reduzierte die Fähigkeit der Antikörper an die Proteine zu binden. Das wildtypische Homodimer SOD1^{WT-WT} und die Heterodimere der Wildtyp-ähnlichen Mutationen G37R und G93C (SOD1^{37-WT} und SOD1^{93-WT}) zeigten die geringste Interaktion mit beiden Antikörpern, die endogene SOD1 der HEK-293t Zellen wurde durch die Antikörper nicht erkannt.

D Zur Überprüfung der Spezifität des SEDI und USOD Antikörpers wurde eine IP mit IgG durchgeführt. Die Immunpräzipitation wurde für jedes SOD1 Dimer in sechs unabhängigen Versuchen (n=6) durchgeführt.

4.11.4 Der Einfluss eines Anhangs auf die Struktur der SOD1 Dimere

Es sollte auch gezeigt werden, ob ein Anhang (tag) die Konformation der SOD1 Proteine beeinflussen könnte. In HEK-293t Zellen wurden *sod1* Dimerkonstrukte über den pEGFP-N1-Vektor und über den pEF-BOS-Vektor transient transfiziert. Hierdurch wurden SOD1 Dimere exprimiert, welche mit einer EGFP-Domäne bzw. mit einem sechsfachen Histidin-tag markiert waren. Wie zuvor beschrieben, wurden die Zelllysate mit je 2 µg SEDI, USOD oder IgG inkubiert und die Immunpräzipitation per Western Blot analysiert (Abb. 23). Es zeigte sich, dass SOD1^{WT-WT}-EGFP und SOD1^{37-WT}-EGFP die geringste Affinität zu SEDI und USOD aufwiesen, während alle anderen SOD1 Dimere von den Antikörpern detektiert wurden. Verglichen mit der Transfektionseffizienz (Abb. 23A) interagierten die EGFP-markierten mutanten Homodimere stärker mit SEDI und USOD als ihre korrespondierenden Heterodimere (Abb. 23B und C). Die endogene SOD1 der HEK-293t Zellen wurde weder von SEDI noch USOD detektiert. Als Kontrolle diente ein leerer pEGFP-N1-Vektor, welcher ausschließlich EGFP exprimierte. Für die Spezifität der Reaktion wurde eine weitere IP mit 2 µg IgG durchgeführt (Abb. 23D).

Die transiente Transfektion von HEK-293t Zellen mit *sod1* Dimerkonstrukten im pEF-BOS-Vektor führte zu der Expression von SOD1 Dimeren mit einem N-terminalen sechsfachen Histidin-tag. Diese wurden ebenfalls mit 2 µg SEDI, USOD oder IgG immunpräzipitiert. Die nachfolgenden Immunblots (Abb. 24) ließen erkennen, dass alle mutanten Homo- und Heterodimere mit den Antikörpern SEDI und USOD interagierten, sobald sie mit einem sechsfachen Histidin-tag versehen waren. Lediglich 6x-His-SOD1^{WT-WT} zeigte kaum eine Interaktion mit den Antikörpern. Verglichen mit der Transfektionseffizienz, detektierten SEDI und USOD auch hier mutante SOD1 Homodimere besser als SOD1 Heterodimere (Abb. 24B, C). Weiterhin wurde auch in diesem Versuch die endogene SOD1 der HEK-293t Zellen nicht durch die Antikörper immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurden Zellen ohne DNA transfiziert, eine IP mit 2 µg IgG (Abb. 24D) sollte die Spezifität der Reaktion verifizieren.

Die Spezifität der Interaktion der SOD1 Proteine mit SEDI und USOD sollte für IgG aus Maus (IgG M) und Kaninchen (IgG R) überprüft werden. Für die Dimere SOD1^{WT-WT}, SOD1^{37-WT} und SOD1³⁷⁻³⁷ wurden aus diesem Grund IPs durchgeführt und die einzelnen Proben jeweils nebeneinander im Gel aufgetragen. Es konnte somit gezeigt werden, dass bei gleicher Exposition der Proben bei beiden IgGs keine Banden im Immunblot auftraten (Abb. 25).

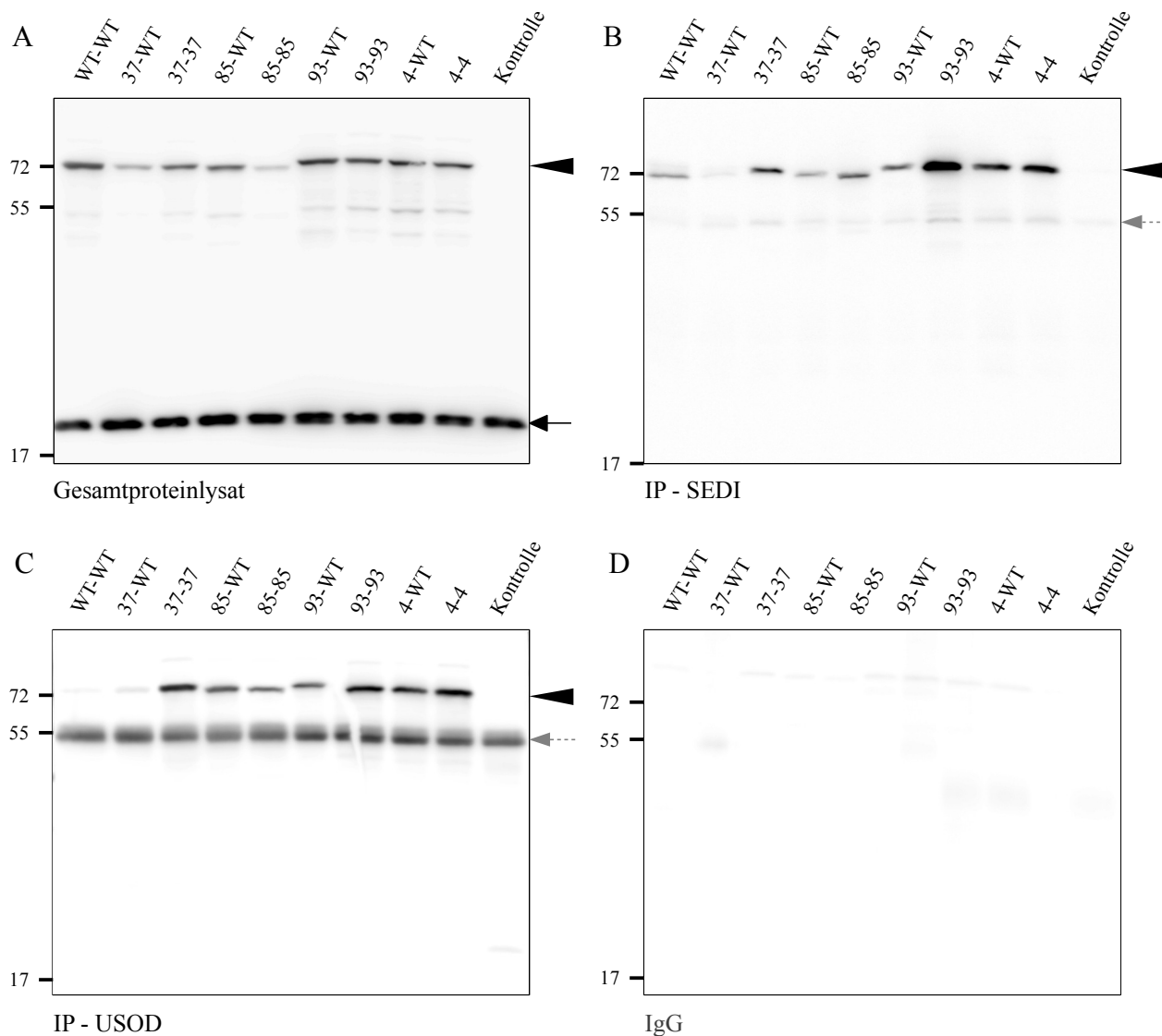


Abb. 23: IPs der rekombinanten mit EGFP-markierten SOD1 Homo- und Heterodimere mit SEDI und USOD Antikörpern

Für die IPs wurden *sod1* Dimerkonstrukte im pEGFP-N1-Vektor transient in HEK-293t Zellen exprimiert, die Zellen lysiert und mit den Antikörpern SEDI und USOD inkubiert. Nach den IPs wurden die Ansätze auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Sowohl endogene SOD1 (Pfeil) als auch die SOD1 Dimere (Pfeilkopf) wurden mit einem kommerziellen SOD1 Antikörper (*Epitomics*) detektiert. Der graue Pfeil markiert die Antikörperbande von SEDI oder USOD. Gezeigt sind repräsentative Western Blots.

A Zur Überprüfung der Expressionsrate der SOD1 Dimere in den HEK-293t Zellen wurden von jeder Probe 15 µg Gesamtproteinmenge auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem leeren pEGFP_N1-Vektor transfiziert.

B, C IPs der SOD1 Homo- und Heterodimere mit 2 µg der Antikörper SEDI und USOD zeigten, dass beide Antikörper mit den mutanten Dimeren interagierten. Eine geringere Interaktion wiesen SOD1^{WT-WT}-EGFP und das SOD1 Heterodimer der Wildtyp-ähnlichen Mutation SOD1^{G37R} (SOD1^{37-WT}-EGFP) auf. Verglichen mit den mutanten SOD1 Homodimeren verringerte eine wildtypische Untereinheit die Interaktion von SEDI und USOD mit dem korrespondierenden Heterodimer. Die endogene SOD1 der HEK-293t Zellen wurde durch die Antikörper nicht erkannt.

D Zur Überprüfung der Spezifität des SEDI und USOD Antikörpers wurde eine IP mit IgG durchgeführt.

Die Immunpräzipitation wurde für jedes SOD1 Dimer in vier unabhängigen Versuchen (n = 4) durchgeführt.

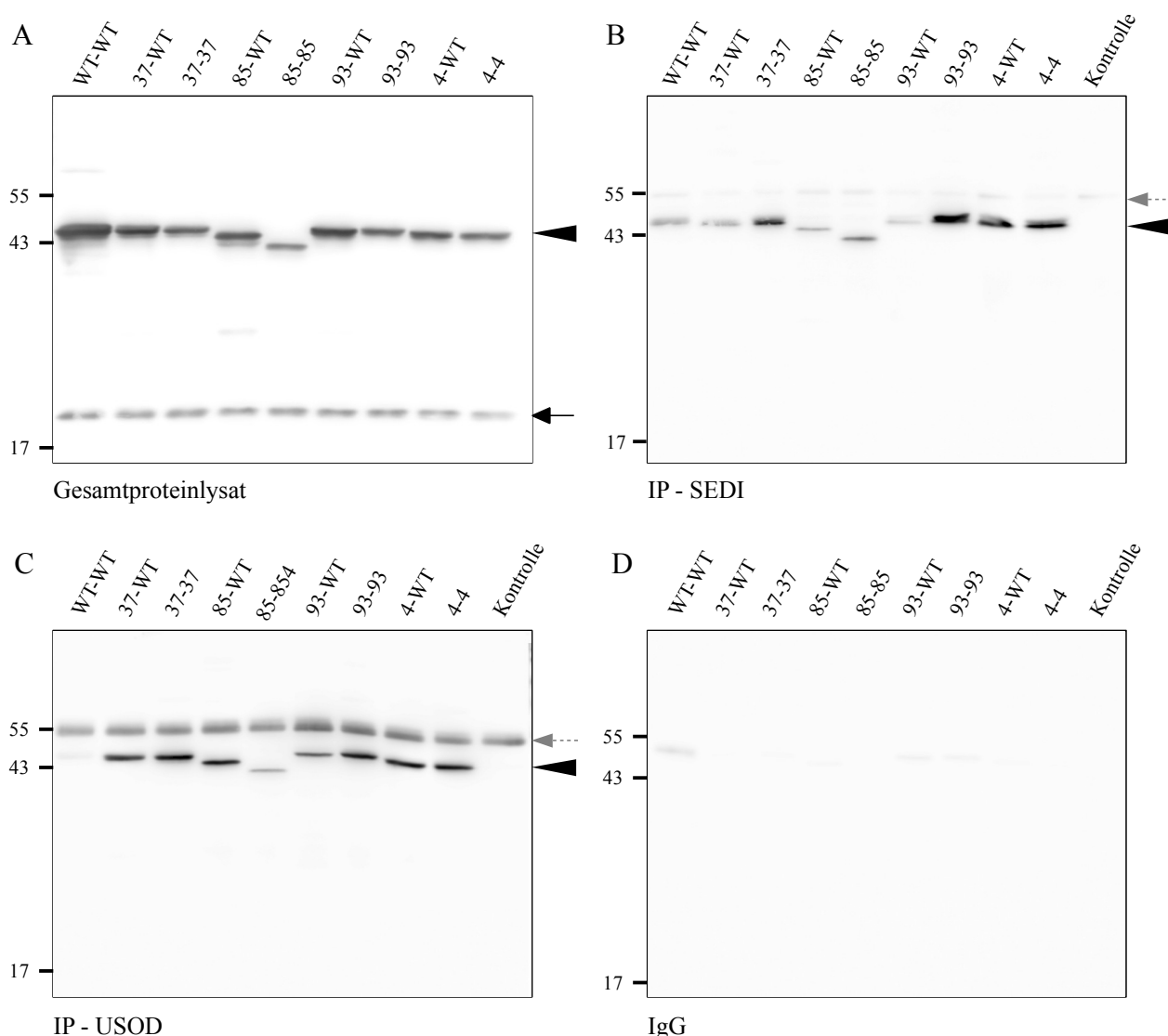


Abb. 24: IPs der rekombinanten mit einem sechsfachen Histidin-tag versehenen SOD1 Homo- und Heterodimere mit SEDI und USOD Antikörpern

Für die IPs wurden *sod1* Dimerkonstrukte im pEF-BOS-Vektor transient in HEK-293t Zellen exprimiert, die Zellen lysiert und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Nach den IPs wurden die Ansätze auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Sowohl endogene SOD1 (Pfeil) als auch die SOD1 Dimere (Pfeilkopf) wurden mit einem kommerziellen SOD1 Antikörper (*Epitomics*) detektiert. Der graue Pfeil markiert die Antikörperbande von SEDI oder USOD. Gezeigt sind repräsentative Western Blots.

A Zur Überprüfung der Expressionsrate der SOD1 Dimere in den HEK-293t Zellen wurden von jeder Probe 15 µg Gesamtproteinmenge auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne DNA transfiziert.

B, C IPs der SOD1 Homo- und Heterodimere mit 2 µg der Antikörper SEDI und USOD zeigten, dass beide Antikörper eine hohe Affinität zu allen mutanten Dimeren aufweisen. Das wildtypische Homodimer 6x-His-SOD1^{WT-WT} zeigte dagegen nur eine sehr geringe Interaktion mit beiden Antikörpern. Verglichen mit den Histidin-markierten mutanten SOD1 Homodimeren verringerte eine wildtypische Untereinheit die Interaktion von SEDI und USOD mit dem korrespondierenden Heterodimer. Die endogene SOD1 der HEK-293t Zellen wurde durch die Antikörper nicht erkannt.

D Zur Überprüfung der Spezifität des SEDI und USOD Antikörpers wurde eine IP mit IgG durchgeführt.

Die Immunpräzipitation wurde für jedes SOD1 Dimer in vier unabhängigen Versuchen (n = 4) durchgeführt.

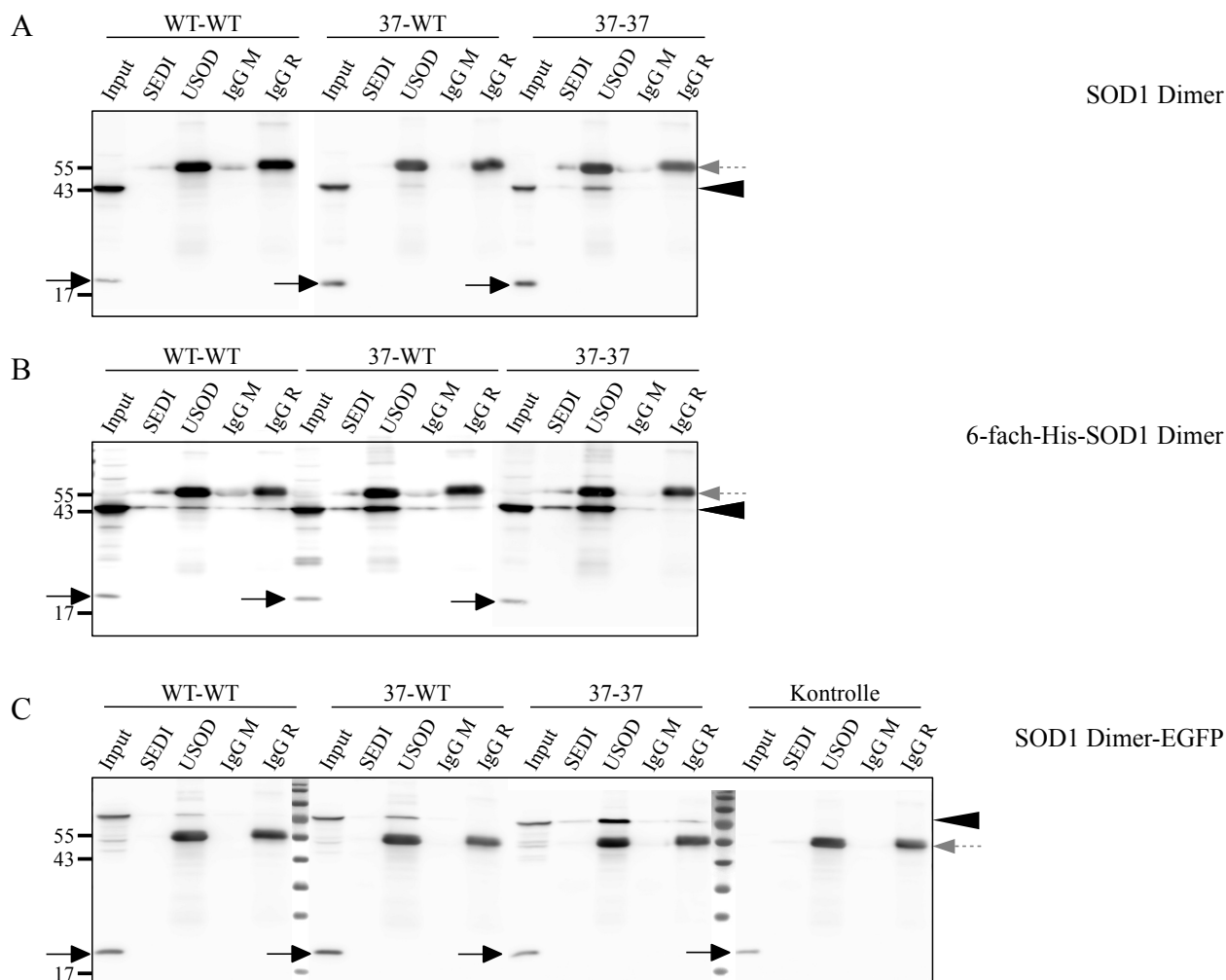


Abb. 25: Spezifität der IPs von SOD1 Homo- und Heterodimere exprimiert in HEK-293t Zellen mit SEDI und USDO

Für die IPs wurden die Zellen lysiert und mit 2 µg der Antikörper SEDI und USOD inkubiert. Nach den IPs wurden die Ansätze auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Sowohl endogene SOD1 (Pfeil) als auch die SOD1 Dimere (Pfeilkopf) wurden mit einem kommerziellen SOD1 Antikörper (*Epitomics*) detektiert. Der graue Pfeil markiert die Antikörperbande von SEDI oder USOD.

A Weder unmarkierte SOD1^{WT-WT} noch SOD1^{37-WT} wurden von den Antikörpern detektiert. Allein das Homodimer SOD1³⁷⁻³⁷ wurde in der IP-Fraktion angereichert. Es fand keine Reaktion mit den IgG-Kontrollen aus Kaninchen (IgG R) oder Maus (IgG M) statt. Von dem für die IP eingesetzten Gesamtlisat wurden 15 µg Protein als Input eingesetzt.

B Im pEF-BOS-Vektor exprimierte 6x-His-SOD1^{WT-WT}, 6x-His-SOD1^{37-WT} und 6x-His-SOD1³⁷⁻³⁷ Dimere waren N-terminal mit einem sechsfachen Histidin-Anhang markiert. Während 6x-His-SOD1^{WT-WT} von den Antikörpern nicht detektiert wurde, wurden sowohl das Hetero- als auch das mutante Homodimer in der IP-Fraktion angereichert. Es fand keine Reaktion mit den IgG-Kontrollen aus Kaninchen (IgG R) oder Maus (IgG M) statt. Von dem für die IP eingesetzten Gesamtlisat wurden 15 µg Protein als Input eingesetzt.

C Bei SOD1 Dimeren, die mit einer C-terminalen EGFP-Domäne versehenen waren, wurde das Homodimer SOD1³⁷⁻³⁷-EGFP sowohl von SEDI als auch von USOD erkannt, während das Heterodimer SOD1^{37-WT}-EGFP eine schwächere Interaktion mit USOD aufwies. Es fand keine Reaktion mit der Kontrolle SOD1^{WT-WT}-EGFP oder mit den IgG-Kontrollen aus Kaninchen (IgG R) oder Maus (IgG M) statt. Von dem für die IP eingesetzten Gesamtlisat wurden 15 µg Protein als Input eingesetzt.

4.12 Der Nematode *C. elegans* als *in vivo*-Modell für ALS

Die funktionellen Eigenschaften wildtypischer und mutanter SOD1 Dimere sollte nicht nur anhand aufgereinigter Proteine, sondern zusätzlich in einem *in vivo* Modell untersucht werden. Hierfür wurden die Dimere SOD1^{WT-WT}-EGFP, SOD1^{85-WT}-EGFP und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP unter die Kontrolle des *sra-6* Promotors gebracht. SRA-6 wird u.a. in den amphiden Neuronen ASH und ASI exprimiert (Troemel et al., 1995). Diese Neurone liegen anterior im Kopfbereich des Wurmes und stehen in direkter Verbindung zur Umwelt des Tieres. So können chemische oder osmotische Veränderung im Umkreis des Kopfes unmittelbar in elektrische Signale umgewandelt werden, wodurch das Tier schnell z.B. auf einen starken osmotischen Druck reagieren kann. Auch mechanische Reize werden von den ASH- und ASI-Neuronen weitergeleitet. Mutante SOD1 Proteine führen zu einer Degeneration von Motorneuronen von transgenen Mäusen (Gurney et al., 1994; Dal Canto and Gurney, 1995; Wong et al., 1995; Bruijn et al., 1997b). Ein toxischer Einfluss der SOD1 Dimere auf die ASH- und ASI-Neuronen sollte sich in einer gestörten Sensorik der Tiere gegenüber chemischen Veränderungen in ihrem unmittelbaren Umfeld äußern. Da die SOD1 Dimere mit einer EGFP-Domäne gekoppelt exprimiert wurden, konnte deren Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Abb. 26). Um einen Linieneffekt ausschließen zu können, wurden für jedes SOD1 Dimer zwei voneinander unabhängig hergestellte Wurmlinien untersucht.

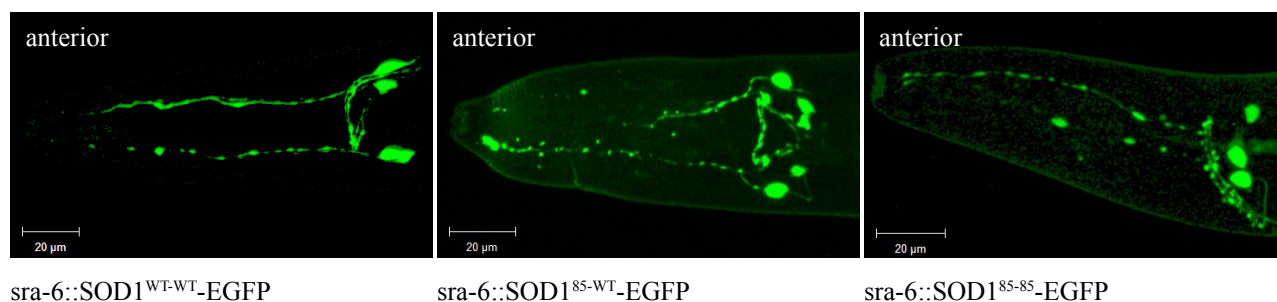


Abb. 26: SOD1^{WT-WT}-EGFP, SOD1^{85-WT}-EGFP, SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP unter der Kontrolle des *sra-6* Promotors

Unter der Kontrolle des *sra-6* Promotors wurden die *sod1* Dimerkonstrukte SOD1^{WT-WT}-EGFP, SOD1^{85-WT}-EGFP, SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP u.a. in den amphiden ASH- und ASI-Neuronen exprimiert. Diese Neurone stehen in direktem Kontakt mit der Umwelt des Wurms, sodass dieser möglichst schnell auf chemische, osmotische, aber auch auf mechanische Veränderungen reagieren kann. Durch die Kopplung der SOD1 Dimere mit EGFP konnte die Expression der Konstrukte in den ASH- und den ASI-Neuronen mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

In mikroskopischen Untersuchungen konnte kein visueller Unterschied in der Aggregatbildung zwischen Würmern beobachtet werden, welche SOD1^{85-WT}-EGFP oder SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP exprimierten. Es wurde jedoch beobachtet, dass Würmer, die SOD1^{85-WT}-EGFP oder SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP exprimierten, sich langsamer vermehrten als Würmer der nicht transgenen Kontrollgruppen N2 oder Tiere, welche das wildtypische Homodimer SOD1^{WT-WT}-EGFP exprimierten. Aus diesem Grund wurde zum einen die Eiablage dieser Würmer untersucht sowie eine Überlebensstudie durchgeführt.

4.12.1 Expression von SOD1^{85-WT}-EGFP und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP unter der Kontrolle des *sra-6* Promotors führt zu Eilegedefekten bei *C. elegans*

Für die Eiablage wurden jeweils gleichalte Würmer auf Platten mit einer Bakterienkultur vereinzelt und die Muttertiere nach 24 h wieder von den Platten entfernt. Die in diesem Zeitraum gelegten Eier wurden weiter inkubiert, bis die Würmer geschlüpft waren und gezählt werden konnten. Es konnte nachgewiesen werden, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der nicht transgenen N2 Linie und jenen Tieren gab, welche SOD1^{WT-WT}-EGFP exprimierten (Abb. 27). Die beiden Wurmlinien, welche das Heterodimer SOD1^{85-WT}-EGFP exprimierten, unterschieden sich untereinander nicht signifikant in ihrer Eiablage, allerdings zeigte SOD1^{85-WT}-EGFP_1 eine deutlich verringerte Nachkommenschaft, verglichen mit der N2- und den SOD1^{WT-WT}-EGFP exprimierenden Wurmlinien. Am stärksten war die Eiablage der SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP_1 beeinträchtigt. Der Unterschied in der Nachkommenschaft war bei dieser Linie gegenüber allen anderen Wurmlinien signifikant. Die zweite generierte Wurmlinie beider mutanter SOD1 Dimere wies ebenfalls eine verringerte Eiablage auf, die Unterschiede zu den Kontrolllinien SOD1^{WT-WT}-EGFP und N2 waren bei diesen Linien jedoch statistisch nicht signifikant.

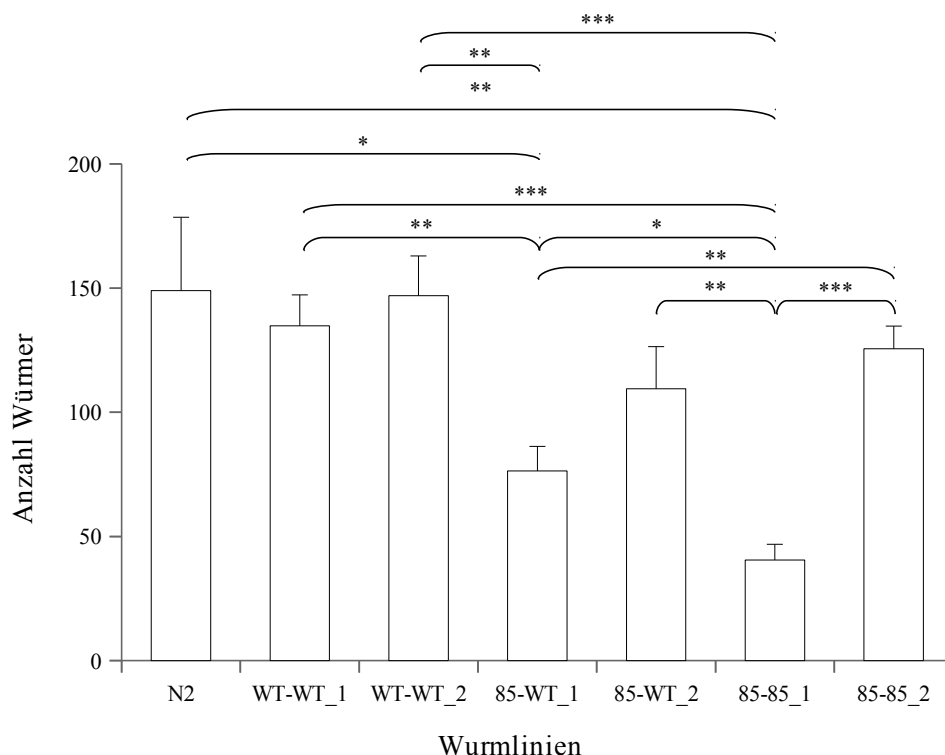


Abb. 27: Expression von SOD1^{85-WT}-EGFP und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP unter der Kontrolle des *sra-6* Promotors führt zu einer verringerten Nachkommenzahl bei *C. elegans*.

Jeweils eine Linie der SOD1^{85-WT}-EGFP und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP exprimierenden Würmer legte unter den gleichen Bedingungen signifikant weniger Eier als SOD1^{WT-WT}-EGFP exprimierende Tiere. Die zweite, unabhängig von der ersten Linie generierte Wurmlinie, zeigte dagegen nur eine leichte, aber nicht signifikant verringerte Nachkommenzahl. Als Kontrolle dienten nicht-transgene *C. elegans* (N2). Diese wiesen keinen signifikanten Unterschied zu den SOD1^{WT-WT}-EGFP exprimierenden Würmern auf. Den schwersten Eilegedefekt zeigten Würmer, die SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP_1 unter der Kontrolle des *sra-6* Promotors exprimierten.

Die Balken repräsentieren die Mittelwerte + Standardfehler aus fünf voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Zur statistischen Analyse wurde eine studentische t-Verteilung durchgeführt (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

4.12.2 Expression von SOD1^{85-WT}-EGFP und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP unter der Kontrolle des *sra-6* Promotors führt zu einer verringerten Lebensspanne bei *C. elegans*

Neben einem Eilegedefekt kann eine verminderte Lebensdauer von *C. elegans* zu einer reduzierten Anzahl an Würmern einer Linie führen. Die Lebensspanne der Tiere wurde bestimmt, indem pro Linie insgesamt jeweils 70 - 80 Würmer gleichen Alters über einen Zeitraum von 35 Tagen beobachtet und an jedem Tag die Anzahl der Tiere bestimmt wurde. Für jedes SOD1 Dimer wurden jeweils zwei Wurmlinien untersucht. Die Lebensspanne der Würmer wurde als Kaplan-Meier Kurve geplottet und die statistische Analyse mittels Log Rank (Mantel Cox) Test durchgeführt (Abb. 28). Es konnte hierbei nachgewiesen werden, dass die Expression von SOD1^{85-WT}-EGFP sowie

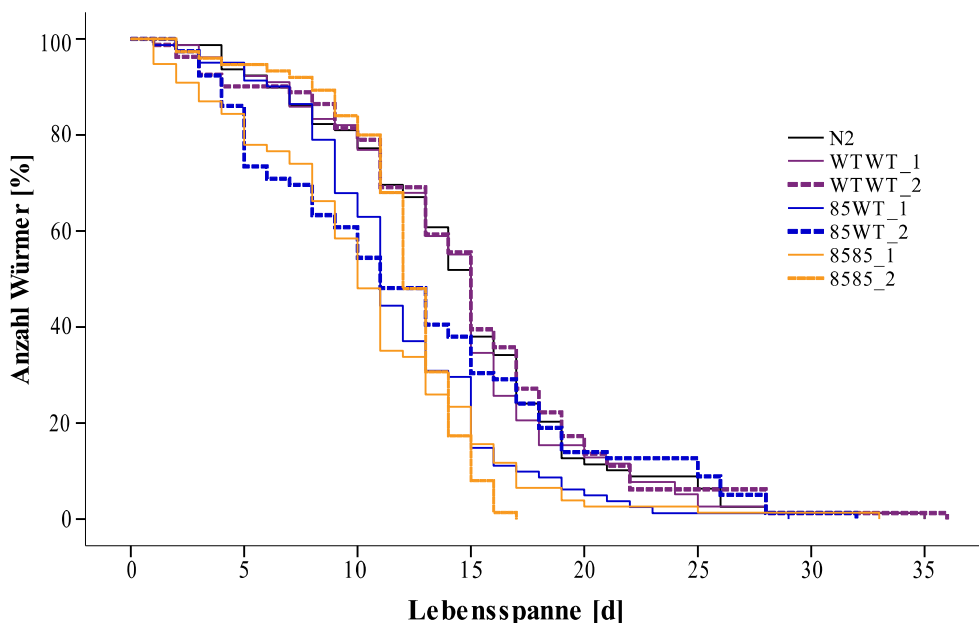


Abb. 28: Expression von SOD1^{85-WT}-EGFP und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP unter der Kontrolle des *sra-6* Promotors führt zu einer verringerten Lebensdauer bei *C. elegans*

SOD1^{85-WT}-EGFP und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP exprimierende Würmer zeigten eine verminderte Lebensspanne, verglichen mit SOD1^{WT-WT}-EGFP exprimierenden oder nicht transgenen Tieren (N2). Die Kontrolllinien N2 und SOD1^{WT-WT}-EGFP zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrer Lebensspanne. Die Lebensspanne der SOD1^{85-WT}-EGFP_1 Linie war statistisch signifikant verringert gegenüber den Kontrolllinien N2 ($p = 0,001$), SOD1^{WT-WT}-EGFP_1 ($p = 0,002$) und SOD1^{WT-WT}-EGFP_2 ($p < 0,001$). Dagegen lebten SOD1^{85-WT}-EGFP_2 Würmer nicht signifikant kürzer als die Kontrolllinien. Die Würmer beider SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP Linien wiesen aber eine signifikant kürzere Lebensspanne auf, verglichen mit allen Kontrolllinien (jeweils $p < 0,001$) sowie mit der SOD1^{85-WT}-EGFP_1 Linie (85-85_1: $p = 0,033$ und 85-85_2: $p = 0,026$).

SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP in *C. elegans* zu einer verminderten Lebensspanne führte. Gegenüber der nicht transgenen N2 Kontrollgruppe gab es keinen signifikanten Unterschied in der Lebensspanne von SOD1^{WT-WT}-EGFP exprimierenden Würmern, allerdings war die Lebensdauer der SOD1^{85-WT}-EGFP_1 Tiere statistisch signifikant kürzer gegenüber den Kontrolllinien N2 ($p = 0,001$), SOD1^{WT-WT}-EGFP_1 ($p = 0,002$) und SOD1^{WT-WT}-EGFP_2 ($p < 0,001$). Keine signifikant verkürzte Lebenszeit zeigten jedoch die Würmer der zweiten Linie SOD1^{85-WT}-EGFP_2. Jedoch lebten alle SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP exprimierende Würmer statistisch signifikant kürzer als die Tiere der Kontrolllinien (jeweils $p < 0,001$).

5. DISKUSSION

Zwei SOD1 Proteine lagern sich zu einem Dimer zusammen, um enzymatisch aktiv zu sein und Superoxidanionen dismutieren zu können. Besitzt ein ALS Patient ein mutantes und ein wildtypisches Allel des *sod1* Gens, kann sich solch ein Dimer aus zwei wildtypischen, zwei mutanten oder einer wildtypischen und einer mutanten Untereinheit zusammensetzen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass wildtypische SOD1 Proteine einen Einfluss auf den Ausbruch und die Progression der Krankheit bei transgenen Mäusen hatten (Jaarsma et al., 2000; Fukada et al., 2001; Deng et al., 2006; Wang et al., 2009b). In dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob die Heterodimerisierung eines mutanten und eines wildtypischen SOD1 Proteins diesen Effekt erklären könnte. Zudem sollte der Einfluss eines Anhangs auf die funktionellen Eigenschaften dieser Dimere untersucht werden.

5.1 Der Einfluss eines EGFP- oder Histidin-tags auf die Konformation der SOD1 Dimere

Die Antikörper SEDI und USOD detektieren Bereiche in der SOD1, die im korrekt gefalteten und zusammengelagerten Dimer in der Dimerisierungsdomäne und innerhalb des β -Faltblattzylinders verborgen liegen. Für die Interaktion mit einem SOD1 Dimer muss dieses in seiner Dimerisierung oder seiner Faltung gestört sein. Beide Antikörper interagieren spezifisch nur mit mutanten und missgefalteten, nicht aber mit wildtypischer SOD1 (Rakhit et al., 2007; Kerman et al., 2010; Prudencio and Borchelt, 2011). Übereinstimmend wurde in dieser Studie keine Interaktion des unmarkierten Dimers SOD1^{WT-WT} mit SEDI und USOD beobachtet, während die Antikörper alle mutanten SOD1 Homodimere mit hoher Affinität detektierten. Ein N-terminaler Histidin-tag oder eine C-terminale EGFP-Domäne führten jedoch zu einer veränderten Affinität der SOD1 Dimere zu den Antikörpern SEDI und USOD. So wurde das EGFP-gekoppelte SOD1^{93-WT}-EGFP von SEDI und USOD immunpräzipitiert, während das unmarkierte SOD1^{93-WT} keine Interaktion mit den Antikörpern aufwies. Die Kopplung mit EGFP induzierte in manchen Fällen sogar eine schwache Bindung von SOD1^{WT-WT} mit SEDI, nicht aber mit USOD. Die N-terminale Fusion eines sechsfachen Histidin-tags führte zu einer Interaktion aller mutanter Dimere mit SEDI und USOD. Da SEDI und USOD nur missgefaltete SOD1 Proteine detektieren, ist davon auszugehen, dass die Kopplung der SOD1 Dimere an ein Markerpeptid eine Konformationsänderung des Dimers nach sich zieht. Besonders die Wildtyp-ähnlichen Mutationen SOD1^{G37R} und SOD1^{G93A} waren von dieser strukturellen Veränderung betroffen.

In vielen Studien wird SOD1 als Fusionsprotein exprimiert und analysiert. Doch lässt sich ein 263 Aminosäuren langes GFP mit der 153 Aminosäuren langen SOD1 fusionieren, ohne die Eigenschaften des Enzyms zu beeinflussen? Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Kopplung von GFP an mutante SOD1^{G93A} die Enzymaktivität des Proteins reduzierte, während gleichzeitig die thermale Stabilität des Proteins erhöht wurde. Während unmarkierte mutante SOD1 Proteine unter destabilisierenden Bedingungen sich in Fibrillen zusammenlagerten, ging diese Eigenschaft bei GFP-gekoppelten SOD1^{G93A} Proteinen verloren. Eine Veränderung der Tertiärstruktur des Fusionsproteins, die vermutlich jedoch allein auf die Anwesenheit der GFP-Domäne zurückzuführen ist, konnte zusätzlich mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen werden (Stevens et al., 2010). Solch eine Konformationsänderung könnte nun auch die verstärkte Interaktionsfähigkeit der EGFP-markierten SOD1 Dimere mit den Antikörpern SEDI und USOD hervorrufen. Auch die Kopplung eines sechsfachen Histidin-tags könnte die Konformation der SOD1 Dimere verändern. Wechselwirkungen der positiv geladenen Imidazolgruppen des Histidins mit geladenen Seitenketten benachbarter Aminosäuren könnten eine strukturelle Veränderung des Proteins nach sich ziehen. Eine Auswirkung auf den Krankheitsverlauf konnte durch die Kopplung eines Fluoreszenzmarkers an SOD1 jedoch nicht nachgewiesen werden. So führte die Expression von SOD1^{G85R}-YFP (*yellow fluorescent protein*), nicht jedoch von SOD1^{WT}-YFP in transgenen Mäusen zu einer Interaktion der SOD1 mit dem Hitzeschockprotein HSC70, zu einer progressiven Ausbildung SOD1-positiver Aggregate im Rückenmark der Tiere und zum Ausbruch ALS-ähnlicher Symptome (Wang et al., 2009a). Weiter konnte keine aberrante Lokalisation GFP-markierter mutanter oder wildtypischer SOD1 Proteine in PC12 Zellen oder in primären Motoneuronen beobachtet werden (Stevens et al., 2010).

Auch in dieser Arbeit wurden EGFP-markierte SOD1 Dimere in dem Fadenwurm *C. elegans* exprimiert und der Einfluss der Fusionsproteine auf die Anzahl der Nachkommen und die Lebensdauer der Tiere untersucht.

5.2 Die Expression von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP in sensorischen Neuronen führt zu einer verminderten Lebensspanne des Fadenwurms *C. elegans*

Die Eigenschaften mutanter SOD1 Homo- und Heterodimere sollten in dem *in vivo*-Modell des Nematoden *C. elegans* untersucht werden. Um die Toxizität gezielt auf neuronaler Ebene untersuchen zu können, wurden die SOD1 Fusionsproteine SOD1^{WT-WT}-EGFP, SOD1^{85-WT}-EGFP und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP unter der Kontrolle des *sra-6* Promotors in den amphiden sensorischen Neuronen ASH und ASI und in dem Interneuron PVQ exprimiert.

Amphide Neurone sind nach außen geöffnete Nervenzellen, mit denen der Fadenwurm *C. elegans* in direktem Kontakt mit seiner Umwelt steht (Ward et al., 1975; Ware et al., 1975). Auf diese Weise kann der Wurm sowohl auf olfaktorische, gustatorische, thermische, osmotische, chemische und mechanische Veränderungen reagieren. Diese sensorische Wahrnehmung benötigt der Wurm, um Nahrung zu finden, schädliche Bedingungen zu vermeiden, aber auch um sich normal entwickeln und verpaaren zu können. Die Expression eines toxischen Proteins in diesen Neuronen könnte zu einer Verhaltensänderung der Tiere führen. Tatsächlich führte die Expression von SOD1^{85-WT}-EGFP und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP zu einer verminderten Eiablage bei den transgenen Tieren. Die Ergebnisse für diese beiden Linien waren hinsichtlich ihrer Signifikanz jedoch inkonsistent. Bei der statistisch signifikant verringerten Eiablage in den SOD1^{85-WT}-EGFP_1 und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP_1 könnte es sich um einen Linieneffekt handeln, der durch Schädigungen während der Integration des Konstrukts oder durch unterschiedlich hohe Expressionsspiegel in den amphiden Neuronen hervorgerufen wurde. Weitere Studien zur Charakterisierung dieser Wurmlinien sind demnach nötig. Des Weiteren führte die Expression von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP in den ASH und ASI Neuronen zu einer signifikant verringerten Lebensspanne der transgenen Würmer. In früheren Studien wurde jedoch umgekehrt gezeigt, dass die Pan-neuronale Expression von SOD1^{85-WT}-EGFP gegenüber der Expression von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP zu einer reduzierten Lebensspanne der transgenen Würmer nach einer Behandlung mit dem Herbizid Paraquat führte. Auch in Zellkulturexperimenten wurde SOD1^{85-WT} als die toxischere Spezies ausgewiesen (Witan et al., 2008).

Wie kann die Expression von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP in den amphiden Neuronen ASH und ASI zu einer verringerten Lebensdauer von *C. elegans* führen, während SOD1^{85-WT}-EGFP nur einen geringen Effekt auf die Lebensspanne der transgenen Würmer ausübt? ASH Neurone reagieren auf chemisch/osmotische und mechanische Reize (Bargmann and Horvitz, 1991b; Kaplan and Horvitz, 1993; Hilliard et al., 2002, 2004). ASI Neurone sind ebenfalls chemosensorisch und gehören zudem zu einer Klasse von Neuronen, die eine normale larvale Entwicklung fördern (Bargmann and Horvitz, 1991a, 1991b). Es wird angenommen, dass ASI Neurone das Nahrungsangebot und die Bevölkerungsdichte über abgegebene Pheromone anderer Würmer in ihrer unmittelbaren Umgebung wahrnehmen können. Ist die Bevölkerungsdichte zu hoch und das Nahrungsangebot zu klein, wird die larvale Entwicklung umgelenkt und die Tiere treten in das Dauerlavalstadium über, in welchem sie besonders resistent gegenüber umweltbedingten Stressreizen sind (Golden and Riddle, 1982, 1984). Die Wahrnehmung eines reichhaltiges Nahrungsangebot verhindert nicht nur die Entwicklung des Dauerlarvenstadiums; der Kontakt zu einer reichen Nahrungsquelle fördert zudem die Eiablage der Tiere (Horvitz et al., 1982; Schafer, 2005). Die Expression toxischer mutanter SOD1 Dimere in ASI Neuronen könnte demnach die Wahrnehmung des

Nahrungsangebots von *C. elegans* stören und somit auch die Eiablage der transgenen Würmer hemmen.

Nicht nur bei der larvalen Entwicklung, auch im adulten Wurm spielen ASI Neurone eine wichtige Rolle. Zum Beispiel verlängert die Ablation von ASI Neuronen die Lebensspanne von *C. elegans* (Alcedo and Kenyon, 2004). Es ist anzunehmen, dass die Expression mutanter SOD1 Dimerproteine in den ASH, ASI und PVQ Neuronen von *C. elegans* sich in erster Linie lebensverkürzend auswirkt. Möglicherweise kehrt sich dieser Effekt jedoch um, wenn hierbei die ASI Neurone besonders stark in Mitleidenschaft gezogen werden. In diesem Falle wäre SOD1⁸⁵⁻⁸⁵-EGFP toxisch genug, um die Lebensspanne transgener Würmer drastisch zu verkürzen, jedoch wäre nur das toxischere SOD1^{85-WT}-EGFP in der Lage, die ASI Neurone soweit zu beeinträchtigen, dass die Lebensdauer dieser transgenen Würmer insgesamt nicht beeinflusst wäre. Auch hier wären weitere Studien zu Klärung der Toxizität der SOD1 Heterodimere in dem *in vivo*-Modell *C. elegans* nötig.

5.3 Niedrige Temperaturen während der Expression mutanter SOD1 Homodimere in den Bakterienzellen BL21(DE3)pLysS verhindern die Einlagerung der Proteine in Einschlusskörperchen

Kupfer- und zinkhaltige Superoxiddismutase wird in allen eukaryotischen sowie in wenigen prokaryotischen Zellen exprimiert. So konnte z.B. für *E. coli* eine enzymatisch aktive CuZnSOD nachgewiesen werden (Benov and Fridovich, 1994; Battistoni and Rotilio, 1995). Die Expression von rekombinanten humanen SOD1 Proteinen in dem bakteriellen *E. coli* System BL21(DE3)pLysS wurde ebenfalls bereits mehrfach erfolgreich durchgeführt (Crow et al., 1997a; Sutter et al., 2000; Leinweber et al., 2004; Teilum et al., 2009). Für die Expression humaner SOD1 Proteine stellen BL21(DE3)pLysS Bakterien ein geeignetes System dar. In dieser Studie wurde beobachtet, dass mutante SOD1 Heterodimere und das SOD1^{WT-WT} in den Bakterien bei Raumtemperatur exprimiert werden konnten, ohne sich in Einschlusskörperchen einzulagern. Alle mutanten SOD1 Homodimer dagegen mussten über einen längeren Zeitraum bei einer niedrigeren Temperatur von 11 °C exprimiert werden, um diese Einschlüsse zu verhindern, die sonst nur in Harnstoff gelöst werden konnten. Diese Beobachtung korreliert mit der erhöhten Aggregationstendenz der mutanten SOD1 Homodimere in HEK-293t und N2A Zellen (Witan et al., 2008, 2009) sowie mit der verstärkten Lokalisation monomerer SOD1^{A4V} Proteine in den unlöslichen Inklusionen von BL21(DE3)pLysS bei Temperaturen über 23 °C (Leinweber et al., 2004). Monomere SOD1 konnte nach einer Aufreinigung sowohl denaturiert und anschließend wieder renaturiert (Leinweber et al., 2004) als

auch mit den Metallchelatoren EDTA oder EGTA behandelt und anschließend in einer kupfer- und zinkhaltigen Lösung wieder mit den Schwermetallen beladen werden (Crow et al., 1997a).

Dies war mit den SOD1 Dimeren nicht möglich, da die Proteine während der Renaturierung im Dialyseschlauch deutliche Makromoleküle bildeten (Abb. 29). Auch nativ aufgereinigte SOD1 Dimere, die keine sichtbaren Proteinablagerung bildeten, wiesen Anzeichen einer Quervernetzung auf. Zum Beispiel zeigten sich in Aktivitätsgelen zusätzliche Enzymaktivitätsbanden, die über der eigentlichen Höhe des SOD1 Dimers auftauchten (Abb. 8). Dies lässt darauf schließen, dass sich SOD1 Dimere zu Multimeren zusammenlagern können. Diese Multimere traten nicht mehr auf, sobald die Proben mit denaturierenden Reagenzien wie SDS oder Harnstoff versetzt wurden. Eine zusätzliche Behandlung mit einem Reduktionsmittel wie β -Mercaptoethanol war nicht nötig, um die Multimere zu lösen. Die Multimerisierung beruhte somit nicht auf der Bildung intermolekularer Disulfidbrücken, die nur durch reduzierende Reagenzien gelöst werden können. Wahrscheinlicher ist es, dass die kovalent verbundenen Untereinheiten der SOD1 Dimere nicht allein mit ihrem zugehörigen Partner dimerisierten, sondern sich auch mit den Untereinheiten benachbarter SOD1 Dimere quervernetzten. Aus diesem Grund wurde das Wachstumsmedium der Bakterien mit CuSO_4 und ZnSO_4 versetzt, um die Metalle für die Beladung der SOD1 Dimere in ausreichenden Mengen bereitzustellen und die Temperatur während der Expression der mutanten SOD1 Homodimere gesenkt. Die anschließende Aufreinigung unter möglichst milden Bedingungen resultierte somit in hohen Mengen gefalteter SOD1 Dimere. Der während der Aufreinigung benötigte sechsfache Histidin-tag musste über einen langen Zeitraum mit sehr hohen Mengen Thrombin behandelt werden, bevor Histidin-freie SOD1 Proteine nachgewiesen werden konnten. Um die aufgereinigten SOD1 Proteine vor dem Abbau durch Proteasen zu schützen, erfolgte die Inkubation mit Thrombin bei 4 °C. Eine Erhöhung der Thrombinmenge über 10 Einheiten pro 1 mg SOD1 Dimerprotein bewirkte keine verbesserte Abspaltung des Histidin-tags. Dagegen resultierte eine verlängerte Inkubationszeit unter diesen Bedingungen wiederum in einer erhöhten Menge Histidin-freier SOD1 Dimere. Es ist davon auszugehen, dass die Thrombinschnittstelle während der Expression und der Faltung der SOD1 Dimere für Thrombin nicht mehr zugänglich war. Das Dimerprotein befindet sich in Lösung in einem Gleichgewicht von dissoziierter und dimerisierter Form, wobei vermutlich die dimerisierte Form bevorzugt wird. Läge die Thrombinschnittstelle im Zustand der dissoziierten Form frei, könnte der Histidin-tag abgespalten werden. Bei 4 °C wechselte das Dimerprotein aufgrund der niedrigen Temperatur möglicherweise nur selten von der dimerisierten in die dissoziierte Form und eine längere Inkubationszeit mit Thrombin wurde nötig, um den Histidin-tag abzuspalten. Es konnte gezeigt werden, dass alle auf diese Weise aufgereinigten Dimere eine Dismutaseaktivität aufwiesen.

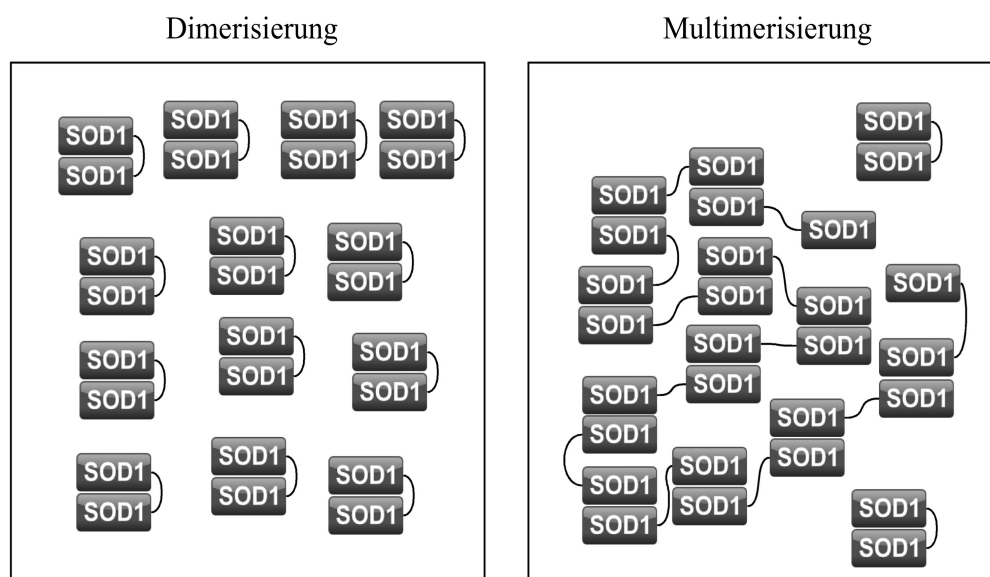


Abb. 29: Multimerisierung der SOD1 Dimere bei Renaturierung der Proteine

Für die korrekte Dimerisierung der SOD1 Homo- und Heterodimere ist eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen notwendig. Nach Denaturierung und während der anschließenden Renaturierung präzipitierten die Proteine in einer großen Proteinverbindung, vermutlich durch Quervernetzung zwischen den einzelnen Untereinheiten.

5.4 Die enzymatische Aktivität von SOD1^{G85R} wird durch H₂O₂ inhibiert

Obwohl die Mutation SOD1^{G85R} als enzymatisch inaktiv gilt (Borchelt et al., 1994; Cao et al., 2008), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bakteriell aufgereinigte SOD1^{G85R} Homo- und Heterodimere in der Lage waren Superoxid zu detoxifizieren. Eine enzymatische Aktivität des in Zellen exprimierten SOD1^{85-WT} Heterodimers wurde bereits in früheren Studien nachgewiesen. Diese ist vermutlich auf die wildtypische Untereinheit des Dimers zurückzuführen (Witan et al., 2008, 2009). Die Aktivität des aufgereinigten Heterodimers SOD1^{85-WT} ließ im Laufe der Dismutasereaktion etwas stärker nach als die Enzymaktivität der anderen SOD1 Dimere. Es zeigte sich zudem, dass die enzymatische Aktivität von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ im Laufe der Messung gänzlich verloren ging. Welche Faktoren könnten diese Inhibition des SOD1^{G85R} Proteins bewirken? Es ist bekannt, dass SOD1 durch sein eigenes Produkt (H₂O₂) gehemmt werden kann (Symonyan and Nalbandyan, 1972; Bray et al., 1974; Hodgson and Fridovich, 1975) und dass mutante SOD1 Proteine wie SOD1^{A4V} und SOD1^{G93A} eine höhere Affinität zu H₂O₂ aufweisen als wildtypische SOD1 (Wiedau-Pazos et al., 1996). Weiterhin könnte SOD1 auch durch sein eigenes Substrat gehemmt werden. Möglicherweise werden Superoxidanionen aufgrund der Mutation von SOD1^{G85R} nur relativ langsam umgesetzt, sodass es zu einer Anhäufung von Superoxid kommt. Das mutante

Dimer würde somit inaktiv erscheinen. Um die SOD1 Dimere auf eine Substrat- oder Produkthemmung zu untersuchen, wurden sie in dieser Studie vor der Aktivitätsmessung mit Riboflavin oder H_2O_2 inkubiert.

Riboflavin produziert unter Lichteinfall Superoxidanionen, die von SOD1 Dimeren jedoch wiederum zu H_2O_2 und Sauerstoff umgesetzt werden. Eine Produkthemmung kann durch die Inkubation mit Riboflavin allein also nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch sowohl die Inkubation mit Riboflavin als auch mit H_2O_2 zu einer Inhibition des aufgereinigten SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ Dimers führte, ist davon auszugehen, dass die Inaktivierung von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ auf eine Produkthemmung zurückzuführen ist. Die enzymatische Aktivität des wildtypischen Homodimers SOD1^{WT-WT} und des Heterodimers SOD1^{85-WT} wurde ebenfalls durch H_2O_2 leicht reduziert, jedoch nicht völlig inhibiert. Die Behandlung mit 2 μM H_2O_2 reduziert die enzymatische Aktivität von SOD1^{85-WT} stärker als von SOD1^{WT-WT}. Möglicherweise inhibiert H_2O_2 die mutante Untereinheit des Heterodimers, sodass nur die wildtypische Untereinheit Superoxid dismutieren kann.

In der Zelle fällt bei einer Reihe physiologischer Reaktionen H_2O_2 an. Dieses könnte zu einer konstanten Inhibition des in der Zelle exprimierten SOD1^{G85R} Proteins führen, während andere SOD1 Dimere bei physiologischen H_2O_2 Konzentrationen nicht in ihrer Aktivität gehemmt werden. Während der Aufreinigung der SOD1 Dimere könnte H_2O_2 als inhibierender Faktor verloren gehen und SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ seine enzymatische Aktivität zurückerlangen. Im Laufe der hier durchgeführten Aktivitätsmessung fiel H_2O_2 als Nebenprodukt ab und führte somit vermutlich zu der beobachteten Inhibition von SOD1⁸⁵⁻⁸⁵. Eine geringe enzymatische Aktivität rekombinanter SOD1^{G85R} Proteine wurde bereits früher beschrieben (Urushitani et al., 2002; Trumbull and Beckman, 2009). Zudem zeigten chemisch gekoppelte SOD1^{G85R} Dimere nach zusätzlicher Inkubation mit Kupfer und Zink eine deutliche Dismutaseaktivität sowie eine erhöhte Stabilität (Auclair et al., 2010).

Die enzymatische Aktivität der SOD1 korreliert unmittelbar mit ihrer Beladung mit dem katalytischen Kupferion. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Chaperon CCS, welches direkt mit SOD1 interagiert, um es mit Kupfer zu beladen und die intramolekulare Disulfidbrücke herzustellen (Culotta et al., 1997; Casareno et al., 1998; Furukawa et al., 2004). CCS scheint jedoch nicht die einzige Kupferquelle für wildtypische und mutante SOD1 Proteine darzustellen (Beckman et al., 2002). SOD1 Proteine CCS-depletierter Mäuse wiesen lediglich eine verringerte Beladung mit Kupfer und eine verminderte Dismutaseaktivität auf (Wong et al., 2000; Subramaniam et al., 2002). Es wurde beschrieben, dass verschiedene Mutationen die Affinität der SOD1 Dimeren zu Kupfer und Zink unterschiedlich stark verringern können und es wurde außerdem gezeigt, dass zink-defiziente SOD1 Proteine zytotoxische Eigenschaften entwickeln (Crow et al., 1997a; Estévez et al., 1999; Hayward et al., 2002; Cao et al., 2008; Mulligan et al., 2008; Trumbull and Beckman, 2009;

Ip et al., 2011). Die in dieser Arbeit aufgereinigten SOD1 Dimere wiesen allesamt eine Teilbeladung mit Zink und eine vollständig Beladung mit Kupfer auf. Im Gegensatz zu vielen anderen Studien wurden die hier untersuchten SOD1 Dimerproteine nicht denaturiert, um anschließend via Dialyse renaturiert und erneut mit Kupfer und Zink beladen zu werden. Dies könnte die Affinität der mutanten SOD1 Dimere zu den jeweiligen Metallen womöglich stark beeinflussen. Zwar besitzen *E. coli* Bakterien kein Chaperon zur Beladung von Kupferionen, dennoch könnte die Faltungsmaschinerie der Bakterien ausreichen, um auch die humanen SOD1 Dimere besser mit Kupfer und Zink zu beladen als dies durch reine Dialyse mit den Schwermetallen möglich wäre. Des Weiteren sind die Puffer von SOD1-beinhaltenden Proben häufig mit geringen Mengen des Metallchelators EDTA versetzt. Während EDTA in sehr geringen Konzentrationen keinen Einfluss auf wildtypische oder Wildtyp-ähnliche SOD1 Proteine ausübt, könnten diese Mengen bereits ausreichen, um bei Mutationen wie SOD1^{G85R} dem mutierten Protein die nur schwach gebundenen Metalle zu entziehen. Aus diesem Grund wurden während der Arbeit mit den aufgereinigten SOD1 Dimeren auf denaturierende oder reduzierende Agenzien sowie auf Metallchelatoren komplett verzichtet.

5.5 Erhöhte Stabilität mutanter SOD1 Heterodimere gegenüber Proteinase K Behandlung

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass in HEK-293t Zellen exprimierte SOD1 Homo- und Heterodimere der gleichen Mutation ungleichmäßig schnell von Proteinase K abgebaut werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass mutante SOD1 Proteine in unterschiedlichem Maße durch Proteinase K degradiert werden können (Ratovitski et al., 1999). Die Stabilität gegenüber Proteinase K ist ein Maß für die korrekte Faltung eines Proteins. Ist ein Protein fehlgefaltet oder denaturiert, bietet es der Protease mehr Angriffspunkte und wird schneller abgebaut. So erhöht eine Behandlung mit SDS oder Harnstoff den Abbau durch Proteinase K signifikant (Gross-Bellard et al., 1973; Hilz et al., 1975). Zink ist essentiell für die korrekte Konformation des SOD1 Proteins. Sowohl wildtypische als auch mutante zink-defiziente SOD1 Proteine zeigen eine stark verminderte Resistenz gegenüber Proteinase K (Li et al., 2010; Son et al., 2011).

Unabhängig von der jeweiligen Mutation wiesen in dieser Arbeit alle HEK-293t exprimierten SOD1 Heterodimere eine höhere Stabilität gegenüber Proteinase K auf als ihre korrespondierenden mutanten Homodimere. Die erhöhte proteolytische Resistenz konnte jedoch nicht für bakteriell exprimierte SOD1 Heterodimere gezeigt werden. Auch nach Aufreinigung der SOD1 Dimere aus Bakterien- oder HEK-293t Zellen (Weichert und Besemer et al., unveröffentlicht) wurde für die

SOD1 Heterodimere keine erhöhte Stabilität gegenüber dem proteolytischen Abbau beobachtet. Möglicherweise spielt ein eukaryotischer Ko-Expressionspartner hierbei eine wichtige Rolle. Die Interaktion mit dem SOD1 Heterodimer könnte dessen Fehlfaltung reduzieren und damit das Protein vor dem proteolytischen Abbau schützen (Abb. 30). Umgekehrt könnte ein Ko-Expressionsfaktor jedoch auch die Resistenz des mutanten SOD1 Homodimers stark verringern und somit den Abbau durch Proteinase K fördern (Abb. 31).

5.5.1 Erhöhte Stabilität mutanter SOD1 Heterodimere gegenüber Proteinase K durch potentielle Interaktion mit einem Ko-Expressionspartner

In HEK-293t Zellen transient exprimierte SOD1 Heterodimere zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K als ihr korrespondierendes Homodimer. Diese erhöhte Stabilität geht im Laufe der Aufreinigung der Proteine jedoch verloren. Ähnliche Unterschiede sind bereits für das Alzheimer assoziierte A β Protein beschrieben, das in Hirnlysaten von transgenen APP23 Mäusen eine höhere Proteinase K-Resistenz aufweist als synthetische, mit wildtypischen Hirnlysaten versetzte A β -Fibrillen. Auch hier wird ein stabilisierender Einfluss eines Interaktionspartners im Hirnlysat angenommen (Langer et al., 2011). Während der Expression der SOD1 Dimere in den HEK-293t Zellen könnte ein Faktor ko-exprimiert werden, welcher mit dem SOD1 Hetero-, nicht jedoch mit dem mutanten Homodimer interagiert. Die spezifische Interaktion mit dem Heterodimer könnte allein über die wildtypische Untereinheit oder über eine veränderte Struktur des gesamten Dimers durch die wildtypische Untereinheit geregelt sein. Die Bindung dieses Ko-Expressionspartners an das SOD1 Heterodimer könnte hierbei die Konformation des Dimers soweit verändern, dass es weniger Angriffspunkte für Proteinase K bietet als ein mutantes SOD1 Homodimer, welches durch die fehlende Interaktion mit diesem Faktor keine Konformationsänderung erfährt (Abb. 30). Dieser Ko-Expressionspartner geht nun jedoch möglicherweise während der Aufreinigung verloren. Wäre die interaktionsbedingte Konformationsänderung reversibel, würde sich das SOD1 Heterodimer nach Ablösung des Interaktionspartners anschließend strukturell nicht mehr von dem mutanten SOD1 Homodimer unterscheiden. Durch eine Behandlung mit Proteinase K würden demnach SOD1 Hetero- wie Homodimere gleich schnell abgebaut (Abb. 30). SOD1^{WT-WT} zeigte nach der Aufreinigung die gleiche Resistenz zu Proteinase K wie die mutanten SOD1 Dimere. Möglicherweise spielt auch hierbei der Interaktionspartner eine Rolle für die Stabilität des wildtypischen Homodimers. Nach Expression der SOD1 Dimere in Bakterienzellen und direkter Behandlung der Bakterienlysate mit Proteinase K zeigte SOD1^{WT-WT} eine bessere Resistenz gegenüber Proteinase K als die mutanten

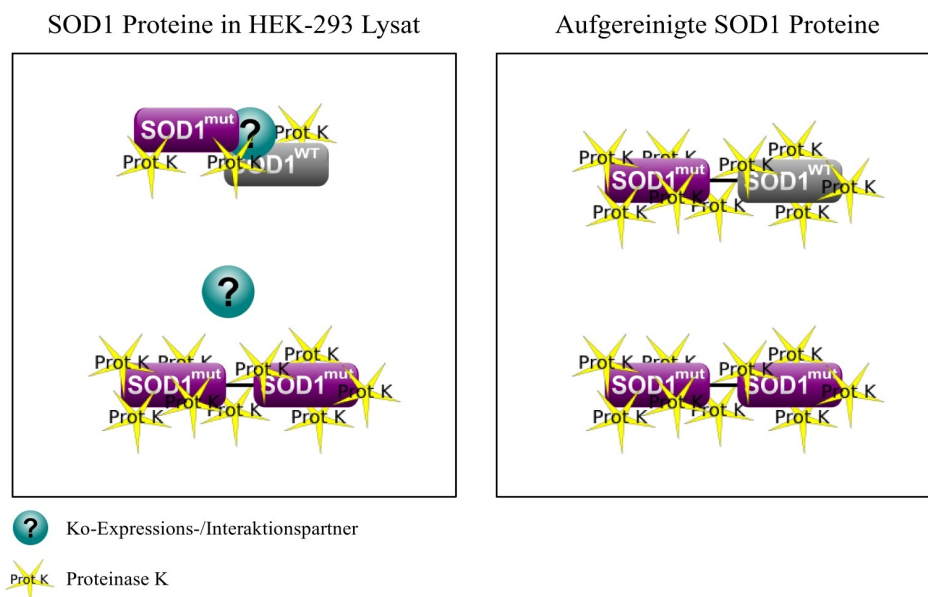


Abb. 30: Konformationsänderung der mutanten SOD1 Heterodimere durch Interaktion eines Ko-Expressionspartners mit der wildtypischen Untereinheit

Während der Expression der SOD1 Dimere in HEK-293t Zellen könnte ein Interaktionspartner an die wildtypische, nicht aber an die mutante Untereinheit des Heterodimers binden. Da keine Bindung an mutante SOD1 Proteine erfolgen kann, entsteht keine Interaktion mit den mutanten SOD1 Homodimeren. Die Wechselwirkung dieses Ko-Expressionspartners mit der wildtypischen Untereinheit führt zu einer Konformationsänderung des gesamten Heterodimers. Diese strukturelle Veränderung verringert die Sensitivität der mutanten SOD1 Heterodimer gegenüber Proteinase K verglichen mit den korrespondierenden mutanten SOD1 Homodimeren. Im Laufe der Aufreinigung der SOD1 Dimerproteine geht dieser Interaktionspartner möglicherweise verloren. Wäre die Konformationsänderung des Heterodimers hierbei reversibel, würde das mutante SOD1 Heterodimer wieder die gleiche Konformation annehmen wie das mutante SOD1 Homodimer. Auch die Zugabe nativen HEK-293t Zelllysats kann keine entsprechenden Bedingungen schaffen, in denen der Interaktionspartner wieder an die wildtypische Untereinheit des Heterodimers bindet. Durch die gleiche Konformation des mutanten SOD1 Hetero- und seines entsprechenden Homodimers zeigen beide Dimere eine ähnliche Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K.

Dimere; es konnten aber auch hier keine Unterschiede in der Stabilität der mutanten SOD1 Homo- und Heterodimere nachgewiesen werden. Möglicherweise handelt es sich bei dem potentiellen Interaktionspartner also um einen eukaryotischen Faktor. Es wurde jedoch zusätzlich nachgewiesen, dass nicht nur aus Bakterien, sondern auch aus eukaryotischen HEK-293t Zellen aufgereinigte SOD1 Dimere gleichermaßen durch Proteinase K degradiert werden (Weichert and Besemer et al., unveröffentlicht). Die Aufreinigung der SOD1 Dimere aus einem eukaryotischen System führt demnach ebenfalls zu einer vergleichbaren Stabilität der mutanten SOD1 Homo- und Heterodimere gegenüber Proteinase K. CCS, das Chaperon, das mit SOD1 direkt interagiert, um es mit Kupfer zu beladen (Culotta et al., 1997; Casareno et al., 1998) wurde als möglicher Kandidat für die unterschiedliche Resistenz der verschiedenen SOD1 Dimere gegenüber Proteinase K untersucht. Hierfür wurde die Expression von CCS in HEK-293t Zellen herunterreguliert. Diese Zellen wurden

gleichzeitig mit *sod1* Dimerkonstrukten transient transfiziert und die Lysate mit Proteinase K behandelt. Auch hier zeigte sich, dass SOD1 Heterodimere eine höhere Resistenz gegenüber Proteinase K Behandlung aufwiesen als ihr korrespondierendes mutantes SOD1 Homodimer. CCS alleine scheint demnach keinen Einfluss auf die Stabilität der Proteine bei einer Behandlung mit Proteinase K zu haben. Ein weiterer Interaktionspartner wildtypischer SOD1 ist die Metallophosphatase Calcineurin, ein Regulationsprotein der Immunabwehr (Agbas et al., 2007). Sowohl wildtypische als auch mutante SOD1 binden zudem an den anti-apoptotisch wirkenden Faktor BCL-2 (Pasinelli et al., 2004).

5.5.2 Verminderte Stabilität mutanter SOD1 Homodimere gegenüber Proteinase K durch potentielle Interaktion mit einem Ko-Expressionspartner

Ein Interaktionspartner der SOD1 Heterodimere könnte eine erhöhte Stabilität der Proteine gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K erklären. Jedoch könnte auch die Interaktion eines eukaryotischen Ko-Expressionspartners mit den mutanten SOD1 Homodimeren mit einer verminderten proteolytischen Resistenz dieser Dimerproteine einhergehen. Es wird vermutet, dass zahlreiche Faktoren, die an mutante, nicht jedoch an wildtypische SOD1 binden, einen Einfluss auf die Pathogenese der ALS haben könnten. So ist bekannt, dass lösliche mutante SOD1 in transgenen Mäusen an Chaperone, wie das Hitzeschockprotein HSC70, binden (Zetterstrom et al., 2011). Hitzeschockproteine, wie HSP70 und HSC70, interagieren auch in Zellkulturexperimenten mit mutanter SOD1 (Shinder et al., 2001; Choi et al., 2004). HSP70 und HSP40 ko-lokalisieren außerdem in Zellkultur mit SOD1^{mut}-positiven Aggregaten (Takeuchi et al., 2002b). Auch Komponenten des Ubiquitin/Proteasomsystems interagieren mit mutanter SOD1. So werden mutante SOD1 Proteine durch die E3-Ubiquitin-Ligase Dorfin ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt (Niwa et al., 2002). Hierfür bilden mutante, nicht aber wildtypische SOD1 Proteine einen Komplex mit Dorfin, dem Ko-Chaperon CHIP (*carboxyl terminus of HSC70 interactivin protein*) sowie den Hitzeschockproteinen HSC70/HSP70 und HSP90 und binden anschließend an die S5a Untereinheit des 26S Proteasoms (Choi et al., 2004; Ishigaki et al., 2004, 2007). Weitere E3-Ligasen, die mutante SOD1 binden und ubiquitinieren, sind die hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimierte NEDL1 (*neuronal homologous to E6AP carboxyl terminus (HECT)-type ubiquitin-protein isopeptide ligase*) (Miyazaki et al., 2004), die ER-assoziierte E3-Ligase Gp78 (Ying et al., 2009) und die mitochondriale Ubiquitin-Ligase MITOL (Yonashiro et al., 2009). Die Akkumulation mutanter SOD1 im mitochondrialen Intermembranraum steht in einem engen Zusammenhang mit dem apoptotischen Zelltod (Takeuchi et al., 2002a). Apoptose wird auch

durch Veränderungen des mitochondrialen spannungsabhängigen Anionkanals (VDAC1) eingeleitet (Shoshan-Barmatz et al., 2010). Es wurde zudem eine direkte Interaktion mutanter SOD1 mit VDAC1 nachgewiesen, die zu der Störung der Leitfähigkeit für Kalzium und Chlorid, zu einer verminderten Aufnahme von ADP in Mitochondrien des Rückenmarks SOD1^{mut} transgener Ratten und zu einer verminderten Lebensspanne SOD1^{mut} transgener Mäuse führte (Israelson et al., 2010). Das anti-apoptotische Protein BCL-2 interagiert sowohl mit wildtypischer als auch mit mutanter SOD1, bindet mutante SOD1 jedoch an anderen Regionen und akkumuliert mit den mutierten Proteinen in unlöslichen Aggregaten (Pasinelli et al., 2004). Das BCL-2 assoziierte Ko-Chaperon BAG-3 (*BCL-2-associated athanogene 3*), dessen Spiegel bei einer Störung des Proteasoms erhöht werden, interagiert mit mutanter, aber nicht mit wildtypischer SOD1 über HSP70 und bindet das mutante Protein an das Transportprotein Dynein. Mutante SOD1 wird hierdurch zu Aggresomen transportiert, dort abgelagert und kann anschließend autophagosomal abgebaut werden (Gamerding et al., 2011). Mutante SOD1 Proteine interagieren *in vitro* sowie *in vivo* zudem verstärkt mit HOXB2 einem Transkriptionsfaktor der *hox* Genfamilie, der auch noch im adulten Hirn und Rückenmark exprimiert wird (Zhai et al., 2005). Des Weiteren interagieren mutante SOD1 Proteine mit Chromogranin, einem Faktor des neuroendokrinen Systems, der vermutlich über eine chaperon-ähnliche Funktion die Sekretion mutanter SOD1 aus der Zelle bewirkt. Eine Störung des Proteasoms begünstigt die ER/Golgi-vermittelte Sekretion der mutanten Proteine (Urushitani et al., 2006). Mutante SOD1 bindet weiter an das TAR DNA bindende Protein 43 (TDP-43) (Higashi et al., 2010) und die mitochondriale Lysyl tRNA Synthetase KARS (Kunst et al., 1997; Kawamata et al., 2008) und greift somit in die Transkriptions- und Translationsmaschinerie der Zelle ein. Neben Proteinen reagieren mutante SOD1 Proteine auch verstärkt mit freien Sauerstoffspezies, wie Peroxynitrit und H₂O₂, und könnten hierdurch ebenfalls in ihrer Konformation verändert werden (Beckman et al., 1993; Wiedau-Pazos et al., 1996; Yim et al., 1996; Zhang et al., 2002; Liochev and Fridovich, 2010).

Vor allem die Interaktion mutanter SOD1 mit Komponenten des Ubiquitin/Proteasomsystems, die das Protein auf seine Degradation vorbereiten, könnte zu einer erhöhten Sensitivität mutanter SOD1 Homodimere gegenüber Proteinase K führen (Abb. 31). Eine wildtypische Untereinheit könnte mutante SOD1 Heterodimere vor einem Abbau durch Proteinase K schützen, indem oben erwähnte Interaktionspartner nur an die mutante, nicht aber an die wildtypische Untereinheit binden. Das wildtypische SOD1 Protein könnte zudem einen Einfluss auf die Struktur der mutierten Untereinheit ausüben, so dass eine Interaktion mit einem SOD1^{mut} spezifischen Faktor verringert ist. Wird der potentielle Interaktionspartner während der Aufreinigung entfernt, könnte dies in einer vergleichbaren Stabilität der mutanten SOD1 Homo- und Heterodimere gegenüber Proteinase K

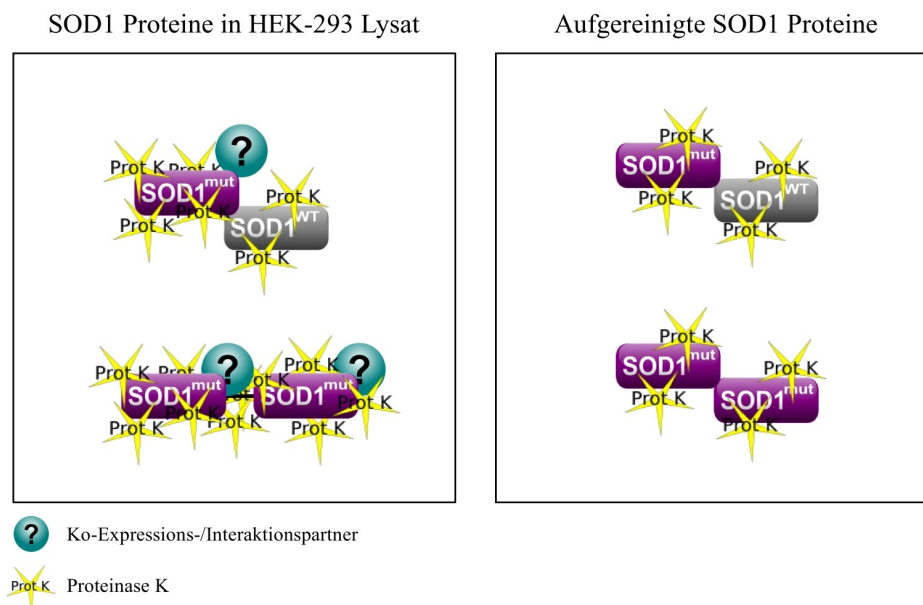


Abb. 31: Konformationsänderung der mutanten SOD1 Homodimere durch Interaktion mit einem Ko-Expressionspartners

Während der Expression der SOD1 Dimere in HEK-293t Zellen könnte ein Interaktionspartner an das mutante SOD1 Homodimere binden und dessen Konformation soweit verändern, dass die mutanten SOD1 Homodimere eine erhöhte Sensitivität gegenüber Proteinase K aufweisen als ihre korrespondierenden mutanten SOD1 Heterodimere. Der Interaktionspartner bindet nicht an die wildtypische Untereinheit der Heterodimere. Diese könnte zudem eine verminderte Affinität dieses Faktors an die mutante Untereinheit hervorrufen. Mutante SOD1 Heterodimere zeigen hierdurch eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K. Im Laufe der Aufreinigung der SOD1 Dimerproteine geht der Interaktionspartner der mutanten SOD1 Proteine und damit sein Einfluss auf die Konformation der Dimere jedoch möglicherweise verloren. Auch die Zugabe nativen HEK-293t Zelllysats kann keine entsprechenden Bedingungen schaffen, in denen der Interaktionspartner wieder an das mutante SOD1 Protein bindet. Hierdurch zeigen beide Dimere eine ähnliche Resistenz gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K.

resultieren (Abb. 31). Während der Behandlung mit Proteinase K konnte eine Zunahme an monomerer SOD1 im Laufe der Reaktion beobachtet werden. Offenbar wurden die SOD1 Dimere zu Monomeren degradiert, indem zunächst nur eine der beiden Untereinheiten durch Proteinase K abgebaut wurde. Ein Interaktionspartner, der allein an mutante SOD1 Proteine bindet und diese destabilisiert, würde eine Degradation der mutanten SOD1 Untereinheit der Heterodimere fördern und die wildtypische Untereinheit als monomeres Protein zurücklassen. Tatsächlich wurde in HEK-293t Zellen eine stärkere Zunahme monomerer, vermutlich wildtypischer, SOD1 bei transient exprimierten SOD1 Heterodimere beobachtet, während bei mutanten SOD1 Homodimeren beide Untereinheiten gleich schnell durch die Proteinase abgebaut wurden. Die stärkste Zunahme monomerer SOD1 erfolgte in SOD1^{WT-WT} transient transfizierten HEK-293t Zellen. Hier wurde womöglich die Peptidverbindung der beiden Untereinheiten durch Proteinase K gespalten und die wildtypischen Proteine monomerisiert. Geht der Interaktionspartner der mutanten SOD1 Proteine

durch die Aufreinigung verloren, werden die Untereinheiten der mutante SOD1 Homo- und Heterodimere im gleichen Maße abgebaut. Nach der Aufreinigung konnte tatsächlich kein signifikanter Unterschied in der SOD1 Monomermenge mehr beobachtet werden. Durch Strukturanalysen sollte nun geklärt werden, ob die hier beobachtete erhöhte Stabilität der mutanten SOD1 Heterodimere durch die wildtypische Untereinheit bzw. durch den Einfluss dieser Untereinheit auf die Konformation des gesamten Dimers bedingt wurde.

5.6 Strukturelle Veränderungen durch die wildtypische Untereinheit vermindern die Interaktion mutanter SOD1 Heterodimere mit Antikörpern gegen fehlgefaltete SOD1

Die Immunpräzipitation der SOD1 Dimere durch die Antikörper SEDI und USOD zeigte, dass mutante SOD1 Dimere mit beiden Antikörpern interagierten, wobei die SOD1 Heterodimere eine geringere Interaktionstendenz mit SEDI und USOD aufwiesen. Interessanterweise zeigten die Heterodimere der wildtyp-ähnlichen Mutationen SOD1^{G37R} und SOD1^{G93C} kaum eine Reaktion mit SEDI und USOD, SOD1³⁷⁻³⁷ und SOD1⁹³⁻⁹³ dagegen wurden mit sehr hoher Affinität von den Antikörpern immunpräzipitiert. Möglicherweise verändert die wildtypische Untereinheit die Struktur des mutanten Proteins soweit, dass auch diese von den Antikörpern nicht mehr erkannt wird.

Die Mutation SOD1^{A4V} liegt nahe der Dimerisierungsdomäne des Proteins (Schmidlin et al., 2009). In dieser Studie war die Affinität von SEDI, nicht aber die Affinität von USOD zu SOD1^{4-WT} und zu SOD1⁴⁻⁴ vergleichbar. Vermutlich kann auch die wildtypische Untereinheit nur schlecht an die gestörte Dimerisierungsstelle der SOD1^{A4V} Mutation binden. Die wildtypische Untereinheit scheint somit zumindest einen Einfluss auf die Tertiärstruktur der mutanten SOD1 Proteine auszuüben. Der Nachweis einer durch die wildtypische Untereinheit bedingten Änderung der Sekundärstruktur der mutanten Untereinheiten konnte hier nicht erbracht werden. Zwar erhöhte sich der Anteil an α -Helices in den SOD1^{WT} enthaltenden Heterodimeren gegenüber den korrespondierenden Homodimeren; der höchste α -Helices Anteil war jedoch in den wildtypischen Homodimeren zu finden. Ähnlich verhält es sich bei den β -Faltblattstrukturen, die mit 36,4 % am geringsten in den wildtypischen Homodimeren vertreten waren und die, verglichen mit den korrespondierenden Homodimeren, einen geringeren Anteil in allen mutanten SOD1 Heterodimeren ausmachten. Somit könnte ein Anstieg an α -Helices und die Abnahme an β -Faltblattstrukturen allein auf die Anwesenheit einer wildtypischen Untereinheit zurückzuführen sein. Das CD-Spektrum des wildtypischen Homodimers ist vergleichbar zu bisher gemessenen Spektren wildtypischer SOD1

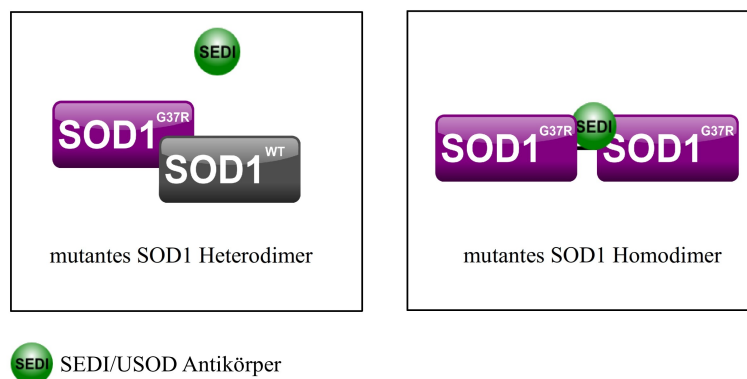


Abb. 32: Konformationsänderung durch die wildtypische Untereinheit vermindern die Interaktion mutanter SOD1 Heterodimere mit Antikörpern gegen fehlgefaltete SOD1

Der Einfluss der wildtypischen Untereinheit der mutanten SOD1 Heterodimere scheint die Konformation des gesamten Heterodimers soweit zu verändern, dass Antikörper gegen fehlgefaltete SOD1 (SEDI, USOD) das Heterodimer nur schlecht immunpräzipitieren können. Die Untereinheiten der mutanten SOD1 Homodimere müssen eine stärkere Störung ihrer Dimerisierungsdomäne und der β -Faltblattstruktur des Zylinders aufweisen, damit SEDI und USOD die Homodimere besser detektieren, als die korrespondierenden Heterodimere. Wie bei der unterschiedlichen Resistenz der Homo- und Heterodimere gegenüber Proteinase K könnte auch hier ein Interaktionspartner eine wichtige Rolle spielen.

(Arnesano et al., 2004; Banci et al., 2007; Potter et al., 2007; Rakhit et al., 2007; Hong et al., 2009; Stevens et al., 2010; Kitamura et al., 2011). Es konnte auch gezeigt werden, dass sich das Minimum des Spektrums bei denaturierter oder metalldefizienter SOD1 aufgrund einer Erhöhung ungeordneter Strukturen in den kurzwelligeren Bereich verschiebt (Arnesano et al., 2004; Potter et al., 2007; Kitamura et al., 2011). Diese Verschiebung wurde bei allen mutanten SOD1 Dimeren, jedoch nicht bei der Mutation SOD1^{G93C} beobachtet, welche zudem ähnliche Anteile an α -Helices und β -Faltblattstrukturen aufwies wie SOD1^{WT-WT}. Einen Unterschied zwischen Homo- und Heterodimeren wurde hierbei jedoch nicht deutlich.

Dennoch könnte eine durch die wildtypische Untereinheit eingeleitete Konformationsänderung der in HEK-293t Zellen exprimierten SOD1 Heterodimere nicht nur eine erhöhte Stabilität gegen Proteinase K, sondern auch die verminderte Interaktion der Dimere mit Antikörpern gegen fehlgefaltete SOD1 erklären. Auch hier spielt möglicherweise ein potentieller Interaktionspartner der mutanten SOD1 Hetero- oder Homodimere eine wichtige Rolle (Abb. 32).

5.7 Prionen-Hypothese

ALS ist gekennzeichnet durch eine progressive Ausbreitung der Symptome auf benachbarte Körperregionen. Wie es zu diesem Verlauf kommt, ist nicht geklärt, es wurde jedoch beschrieben, dass SOD1 Proteine in den extrazellulären Raum abgegeben werden können (Mondola et al., 1996, 1998, 2003; Urushitani et al., 2006). In Zellkulturexperimenten wurde weiter beobachtet, dass aggregierte mutante SOD1 Proteine aus dem Medium von den Zellen aufgenommen wurden und dort die Aggregation mutanter, nicht aber wildtypischer SOD1 induzierten (Münch et al., 2011). Aus diesem Grund wird vermutet, dass mutante SOD1 Prionen-ähnliche Eigenschaften besitzen (Hwang et al., 2010; Münch et al., 2011). Prionen sind potentiell pathogene Proteine mit infektiösen Eigenschaften (Prusiner, 1982). So liegen bei den Prionen-Krankheiten Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder der Traberkrankheit (Scrapie) einige der im zentralen Nervensystem, vor allem im Gehirn, vorkommende zelluläre Prionen Proteine (PrP^{C}) in einer veränderten, pathogenen Form (PrP^{Sc} ; Sc: Scrapie) vor. Trifft das missgefaltete PrP^{Sc} auf ein PrP^{C} , so ändert dieses seine physiologische zu einer pathogenen Konformation und akkumuliert. Hierdurch wird eine Neurodegeneration im betroffenen Gewebe ausgelöst (Colby and Prusiner, 2011). Es wird vermutet, dass weitere Proteine Prionen-ähnliche, infektiöse Eigenschaften besitzen. So wurde beobachtet, dass die Injektion A β -haltiger Extrakte von Morbus Alzheimer Patienten oder gealterter transgener APP Mäusen in das Gehirn oder den Bauchraum von jungen transgenen APP Mäusen zu einer Alzheimer ähnlichen Pathologie in diesen Tieren führte (Kane et al., 2000; Meyer-Luehmann et al., 2006; Eisele et al., 2009, 2010). Die Eigenschaft Missfaltung und Aggregation anderer Proteine zu induzieren wird auch Polyglutamin (Yang et al., 2002; Ren et al., 2009), Tau (Clavaguera et al., 2009; Frost et al., 2009) und α -Synuklein zugeschrieben (Li et al., 2008; Desplats et al., 2009); Proteinen, die mit Morbus Huntington, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson assoziiert werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass wildtypische SOD1 Proteine eine strukturelle Veränderung mutanter SOD1 Heterodimere herbeiführen. Dies könnte die pathogenen Eigenschaften der mutanten Untereinheiten verändern. Tatsächlich konnte eine erhöhte Toxizität der mutanten SOD1^{G85R} Heterodimeren bereits gezeigt werden (Witan et al., 2008). Die verstärkte Toxizität korrelierte hierbei nicht mit der Aggregationstendenz der Dimere, vielmehr wurde durch eine Heterodimerisierung die Aggregation sogar vermindert (Witan et al., 2008, 2009). Dies lässt darauf schließen, dass Aggregate selbst nicht toxisch sind, sondern im Gegenteil der Entfernung toxischer Komponenten aus dem Metabolismus der Zelle dienen könnten. Die Verhinderung der Aggregation mutanter SOD1 Proteine würde diesen somit ermöglichen, längere Zeit im Zytosol zu verweilen

und ihr toxisches Potential zu entfalten. Zudem wurde lange Zeit angenommen, dass eine erhöhte Resistenz gegenüber Proteasen wie Proteinase K eine wichtige Eigenschaft infektiöser Proteine sei (McKinley et al., 1983). Inzwischen ist bekannt, dass auch Proteinase K-sensitive Prionenakkumulationen infektiös sein können (Scott et al., 1997; Safar et al., 1998; Pastrana et al., 2006; Gambetti et al., 2008; Colby and Prusiner, 2011; Langer et al., 2011). Ob mutante SOD1 Proteine tatsächlich einen infektiösen Charakter haben, muss jedoch noch geklärt werden.

5.8 Schlussfolgerung

Nachdem bereits nachgewiesen wurde, dass die Toxizität mutanter SOD1 Dimere nicht mit ihrem Aggregationspotential korreliert, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ebenfalls keine Korrelation zwischen der Schwere der Fehlfaltung eines mutanten SOD1 Proteins und seiner Toxizität besteht. So wurde in früheren Studien gezeigt, dass SOD1^{85-WT} eine höhere Toxizität aufweist als SOD1⁸⁵⁻⁸⁵ (Witan et al., 2008), in dieser Arbeit wurde jedoch beobachtet, dass das Heterodimer schlechter durch Antikörper gegen fehlgefaltete SOD1 detektiert wurde. SOD1^{37-WT}, das in Zellkulturexperimenten einen vergleichbaren toxischen Einfluss ausübte wie SOD1³⁷⁻³⁷ (Witan et al., 2008), konnte im unmarkierten Zustand kaum noch von Antikörper gegen fehlgefaltete SOD1 immunpräzipitiert werden.

In HEK-293t Zellen transient exprimierte SOD1 Heterodimere wiesen nicht nur eine geringere Fehlfaltung, sondern zudem eine erhöhte Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau auf. Möglicherweise reicht also bereits eine geringe Missfaltung aus, um das toxische Potential eines mutanten SOD1 Proteins zu bewirken. Die gleichzeitig erhöhte Resistenz der SOD1 Heterodimere gegenüber proteolytischer Degradation könnte dabei in einer erhöhten Toxizität resultieren, da diese SOD1 Proteine ihre toxischen Eigenschaften in der Zelle länger entfalten können als ihre korrespondierenden mutanten Homodimere.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist gekennzeichnet durch eine progressive Degeneration der Motoneurone. Die hierdurch im Patienten hervorgerufene fortschreitende Paralyse kann von wenigen Wochen über Monate bis zu mehreren Jahren variieren. Im Durchschnitt beträgt die Krankheitsdauer 3 - 5 Jahre. Häufig führt respiratorische Insuffizienz letztendlich zum Tod des Patienten. ALS ist bis heute unheilbar. Etwa 10 % aller ALS Fälle zeigen einen familiären Hintergrund. Hiervon werden ~20 % durch Mutationen im Gen des antioxidativen Enzyms CuZnSuperoxiddismutase (SOD1) verursacht. Mehr als 150 Mutationen im Gen der SOD1 wurden bisher als Auslöser der ALS beschrieben. Durch die Mutation erlangen SOD1 Proteine zusätzliche, bisher jedoch unbekannte toxische Eigenschaften. Ein dismutaseaktives SOD1 Enzym setzt sich aus zwei SOD1 Untereinheiten zusammen. Aufgrund der autosomal dominanten Vererbung der Krankheit kann ein SOD1 Dimer im Patienten als wildtypisches Homodimer ($\text{SOD1}^{\text{WT-WT}}$), als mutantes Homodimer ($\text{SOD1}^{\text{mut-mut}}$) oder als Heterodimer ($\text{SOD1}^{\text{mut-WT}}$) vorliegen. In dieser Arbeit wurden SOD1 Dimere untersucht, deren Untereinheiten kovalent miteinander verbunden waren. Es konnte gezeigt werden, dass sich die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften mutanter SOD1 Heterodimere von mutanten SOD1 Homodimeren mit der gleichen Mutation unterschieden. Mutante SOD1 Heterodimere wiesen eine höhere Resistenz gegen einen Abbau durch Proteinase K auf als ihre korrespondierenden Homodimere. Des Weiteren verminderte eine wildtypische Untereinheit die Interaktion der Heterodimere mit Antikörpern gegen fehlgefaltete SOD1. Die Sekundärstruktur der mutanten SOD1 Heterodimere unterschied sich hierbei nicht auffällig von der Sekundärstruktur ihrer zugehörigen Homodimere. Eine wildtypische Untereinheit verändert somit möglicherweise die Tertiärstruktur seiner kovalent gebundenen mutanten SOD1 Untereinheit und/oder die Konformation des gesamten Dimerproteins. Durch die Mutation bedingte Missfaltungen werden hierdurch reduziert, die Stabilität des Dimers gegenüber proteolytischem Abbau erhöht. Nach der Aufreinigung der Dimerproteine wies das mutanten SOD1 Heterodimer diese Eigenschaften nicht mehr auf. Ein potentieller Interaktionspartner, der eine verminderte Fehlfaltung des Heterodimers oder eine verstärkte Missfaltung des Homodimers fördert, könnte hierbei während der Aufreinigungsprozedur verlorengegangen sein. Die hier nachgewiesene Konformationsänderung könnte über einen Prionen-ähnlichen Effekt übertragen werden und die erhöhte Stabilität das mutante, toxische Protein vor Degradation schützen. Dies korreliert mit der Beobachtung früherer Studien, in denen nachgewiesen wurde, dass mutante SOD1 Heterodimere potentiell toxischer sind als ihre korrespondierenden Homodimere.

7. SUMMARY

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease causing the loss of motor neurons. This leads to a progressive paralysis in the patient with a disease course varying from a few weeks to several years. After 3 - 5 years on average, patients die due to respiratory insufficiency. Until now, no cure for ALS is known. About 10 % of all ALS cases show a familial background. 20 % of these familial cases are caused by mutations in the gene for the antioxidative enzyme CuZn superoxid dismutase (SOD1). More than 150 mutations in the *sod1* gene are known which lead to an unspecified toxic gain of function of the protein. A dismutase active SOD1 enzyme is composed of two SOD1 subunits. Since SOD1 mediated ALS is inherited autosomal dominantly, SOD1 dimers in patients can exist as wildtype homodimers (SOD1^{WT-WT}), mutant homodimers (SOD1^{mut-mut}) or heterodimers (SOD1^{mut-WT}). In this study SOD1 dimers with covalently joined subunits were analysed. It could be shown that biochemical and biophysical properties of mutant SOD1 heterodimers differed from mutant SOD1 homodimers with the same mutation. Mutant SOD1 heterodimers showed an increased resistance to proteinase K digest compared to their corresponding homodimers. In addition, a wildtype subunit decreased the affinity of the heterodimer to antibodies detecting misfolded SOD1. Secondary structure was not significantly changed in mutant SOD1 heterodimers compared with mutant homodimers. A wildtype subunit seems rather to change the tertiary structure of the covalently joined mutant subunit and/or the conformation of the whole dimer protein. Misfolded structures caused by the mutation would be diminished and stability against proteolytic degradation increased. After purification, these features of the mutant SOD1 heterodimer were lost. A possible interaction partner which promotes a proper folding of the heterodimer or an increased misfolding of the homodimer seems to be removed during purification. The determined structural changes and increased stability of the heterodimeric protein could be transferred from one subunit to the other by a prion-like mode and protect the toxic mutant SOD1 protein from degradation. This correlates with earlier studies in which an increased toxicity of a mutant SOD1 heterodimer compared with its corresponding homodimer was observed.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- AGBAS, A., HUI, D., WANG, X., TEK, V., ZAIDI, A. & MICHAELIS, E.K. (2007) Activation of brain calcineurin (Cn) by Cu-Zn superoxide dismutase (SOD1) depends on direct SOD1-Cn protein interactions occurring in vitro and in vivo. *The Biochemical Journal*, 405, 51–59.
- AGUIRRE, T., MATTHIJS, G., ROBBERECHT, W., TILKIN, P. & CASSIMAN, J.J. (1999) Mutational analysis of the Cu/Zn superoxide dismutase gene in 23 familial and 69 sporadic cases of amyotrophic lateral sclerosis in Belgium. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 7, 599–602.
- ALCEDO, J. & KENYON, C. (2004) Regulation of *C. elegans* longevity by specific gustatory and olfactory neurons. *Neuron*, 41, 45–55.
- AL-CHALABI, A., ANDERSEN, P.M., NILSSON, P., CHIOZA, B., ANDERSSON, J.L., RUSS, C., ET AL. (1999) Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 8, 157–164.
- ALVAREZ, B., FERRER-SUETA, G., FREEMAN, B.A. & RADI, R. (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 842–848.
- ALVAREZ, B. & RADI, R. (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids*, 25, 295–311.
- ANDERSEN, P.M., NILSSON, P., ALA-HURULA, V., KERÄNEN, M.L., TARVAINEN, I., HALTIA, T., ET AL. (1995) Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nature Genetics*, 10, 61–66.
- ANDROUTSOPOULOS, V.P., KANAVOURAS, K. & TSATSAKIS, A.M. (2011) Role of paraoxonase 1 (PON1) in organophosphate metabolism: implications in neurodegenerative diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256, 418–424.
- ARNESANO, F., BANCİ, L., BERTINI, I., MARTINELLI, M., FURUKAWA, Y. & O'HALLORAN, T.V. (2004) The unusually stable quaternary structure of human Cu,Zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 47998–48003.
- ATKIN, J.D., FARG, M.A., TURNER, B.J., TOMAS, D., LYSAGHT, J.A., NUNAN, J., ET AL. (2006) Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 30152–30165.
- AUCLAIR, J.R., BOGGIO, K.J., PETSKE, G.A., RINGE, D. & AGAR, J.N. (2010) Strategies for stabilizing superoxide dismutase (SOD1), the protein destabilized in the most common form of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 21394–21399.
- BANCİ, L., BERTINI, I., CRAMARO, F., DEL CONTE, R., ROSATO, A. & VIEZZOLI, M.S. (2000) Backbone dynamics of human Cu,Zn superoxide dismutase and of its monomeric F50E/G51E/E133Q mutant: the influence of dimerization on mobility and function. *Biochemistry*, 39, 9108–9118.

- BANCI, L., BERTINI, I., DURAZO, A., GIROTTI, S., GRALLA, E.B., MARTINELLI, M., ET AL. (2007) Metal-free superoxide dismutase forms soluble oligomers under physiological conditions: A possible general mechanism for familial ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 11263–11267.
- BARGMANN, C.I. & HORVITZ, H.R. (1991a) Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 251, 1243–1246.
- BARGMANN, C.I. & HORVITZ, H.R. (1991b) Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron*, 7, 729–742.
- BARRA, D., MARTINI, F., BANNISTER, J.V., SCHININÀ, M.E., ROTILIO, G., BANNISTER, W.H. & BOSSA, F. (1980) The complete amino acid sequence of human Cu/Zn superoxide dismutase. *FEBS Letters*, 120, 53–56.
- BASSO, M., SAMENGO, G., NARDO, G., MASSIGNAN, T., D’ALESSANDRO, G., TARTARI, S., ET AL. (2009) Characterization of detergent-insoluble proteins in ALS indicates a causal link between nitritative stress and aggregation in pathogenesis. *PloS One*, 4, e8130.
- BATTISTONI, A. & ROTILIO, G. (1995) Isolation of an active and heat-stable monomeric form of Cu,Zn superoxide dismutase from the periplasmic space of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 374, 199–202.
- BATULAN, Z., TAYLOR, D.M., AARONS, R.J., MINOTTI, S., DOROUDCHI, M.M., NALBANTOGLU, J. & DURHAM, H.D. (2006) Induction of multiple heat shock proteins and neuroprotection in a primary culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 24, 213–225.
- BEAL, M.F., FERRANTE, R.J., BROWNE, S.E., MATTHEWS, R.T., KOWALL, N.W. & BROWN, R.H., JR (1997) Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 42, 644–654.
- BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. (1970) A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 245, 4641–4646.
- BECKMAN, J.S. (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chemical Research in Toxicology*, 9, 836–844.
- BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A. & FREEMAN, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1620–1624.
- BECKMAN, J.S., CARSON, M., SMITH, C.D. & KOPPENOL, W.H. (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature*, 364, 584.
- BECKMAN, J.S., ESÉTVÉZ, A.G., BARBEITO, L. & CROW, J.P. (2002) CCS knockout mice establish an alternative source of copper for SOD in ALS. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, 1433–1435.

- BECKMAN, J.S., ISCHIROPOULOS, H., ZHU, L., VAN DER WOERD, M., SMITH, C., CHEN, J., ET AL. (1992) Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 298, 438–445.
- BEERS, D.R., HENKEL, J.S., XIAO, Q., ZHAO, W., WANG, J., YEN, A.A., ET AL. (2006) Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 16021–16026.
- BELZIL, V.V., DAOUD, H., DESJARLAIS, A., BOUCHARD, J.-P., DUPRÉ, N., CAMU, W., ET AL. (2011) Analysis of OPTN as a causative gene for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*, 32, 555.e13–14.
- BELZIL, V.V., VALDMANIS, P.N., DION, P.A., DAOUD, H., KABASHI, E., NOREAU, A., ET AL. (2009) Mutations in FUS cause FALS and SALS in French and French Canadian populations. *Neurology*, 73, 1176–1179.
- BENCE, N.F., SAMPAT, R.M. & KOPITO, R.R. (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science (New York, N.Y.)*, 292, 1552–1555.
- BENOV, L.T. & FRIDOVICH, I. (1994) Escherichia coli expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 25310–25314.
- BENSIMON, G., LACOMBLEZ, L. & MEININGER, V. (1994) A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 330, 585–591.
- BERGEMALM, D., FORSBERG, K., SRIVASTAVA, V., GRAFFMO, K.S., ANDERSEN, P.M., BRÄNNSTRÖM, T., ET AL. (2010) Superoxide dismutase-1 and other proteins in inclusions from transgenic amyotrophic lateral sclerosis model mice. *Journal of Neurochemistry*, 114, 408–418.
- BIELSKI, B.H.J. & ALLEN, A.O. (1977) Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals. *J. Phys. Chem.*, 81, 1048–1050.
- VAN BLITTERSWIJK, M., VAN VUGHT, P.W.J., VAN ES, M.A., SCHELHAAS, H.J., VAN DER KOOI, A.J., DE VISSER, M., ET AL. (2011) Novel optineurin mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiology of Aging*.
- BLOUGH, N.V. & ZAFIRIOU, O.C. (1985) Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg. Chem.*, 24, 3502–3504.
- BOILLÉE, S., VANDE VELDE, C. & CLEVELAND, D.W. (2006a) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, 52, 39–59.
- BOILLÉE, S., YAMANAKA, K., LOBSIGER, C.S., COPELAND, N.G., JENKINS, N.A., KASSIOTIS, G., ET AL. (2006b) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science (New York, N.Y.)*, 312, 1389–1392.
- BORCHELT, D.R., LEE, M.K., SLUNT, H.S., GUARNIERI, M., XU, Z.S., WONG, P.C., ET AL. (1994) Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 8292–8296.

- DEL BO, R., TILOCA, C., PENSATO, V., CORRADO, L., RATTI, A., TICOZZI, N., ET AL. (2011) Novel optineurin mutations in patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 82, 1239–1243.
- BOWLING, A.C., SCHULZ, J.B., BROWN, R.H., JR & BEAL, M.F. (1993) Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 61, 2322–2325.
- BRAY, R.C., COCKLE, S.A., FIELDEN, E.M., ROBERTS, P.B., ROTILIO, G. & CALABRESE, L. (1974) Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*, 139, 43–48.
- BRENNER, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77, 71–94.
- BRISTOL, L.A. & ROTHSTEIN, J.D. (1996) Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Annals of Neurology*, 39, 676–679.
- BROCKINGTON, A., KIRBY, J., EGGITT, D., SCHOFIELD, E., MORRIS, C., LEWIS, C.E., ET AL. (2005) Screening of the regulatory and coding regions of vascular endothelial growth factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics*, 6, 101–104.
- BROWNE, S.E., BOWLING, A.C., BAIK, M.J., GURNEY, M., BROWN, R.H., JR & BEAL, M.F. (1998) Metabolic dysfunction in familial, but not sporadic, amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 71, 281–287.
- BRUENING, W., ROY, J., GIASSEN, B., FIGLEWICZ, D.A., MUSHYNSKI, W.E. & DURHAM, H.D. (1999) Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 72, 693–699.
- BRUIJN, L.I., BEAL, M.F., BECHER, M.W., SCHULZ, J.B., WONG, P.C., PRICE, D.L. & CLEVELAND, D.W. (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 7606–7611.
- BRUIJN, L.I., BECHER, M.W., LEE, M.K., ANDERSON, K.L., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., 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., HOUSEWEART, M.K., KATO, S., ANDERSON, K.L., ANDERSON, S.D., OHAMA, E., ET AL. (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science (New York, N.Y.)*, 281, 1851–1854.
- BUNINA, T.L. (1962) On intracellular inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Zhurnal Nevropatologii I Psikhiatrii Imeni S.S. Korsakova (Moscow, Russia: 1952)*, 62, 1293–1299.
- DAL CANTO, M.C. & GURNEY, M.E. (1994) Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *The American Journal of Pathology*, 145, 1271–1279.

- DAL CANTO, M.C. & GURNEY, M.E. (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 Research*, 676, 25–40.
- CANTON, T., BÖHME, G.A., BOIREAU, A., BORDIER, F., MIGNANI, S., JIMONET, P., ET AL. (2001) RPR 119990, a novel alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid antagonist: synthesis, pharmacological properties, and activity in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299, 314–322.
- CAO, X., ANTONYUK, S.V., SEETHARAMAN, S.V., WHITSON, L.J., TAYLOR, A.B., HOLLOWAY, S.P., ET AL. (2008) Structures of the G85R variant of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 16169–16177.
- CARPENTER, S. (1968) Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurology*, 18, 841–851.
- CARRI, M.T., FERRI, A., BATTISTONI, A., FAMHY, L., GABBIANELLI, R., POCCIA, F. & ROTILIO, G. (1997) Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Letters*, 414, 365–368.
- CASARENO, R.L., WAGGONER, D. & GITLIN, J.D. (1998) The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 23625–23628.
- CHANG, L.Y., SLOT, J.W., GEUZE, H.J. & CRAPO, J.D. (1988) Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *The Journal of Cell Biology*, 107, 2169–2179.
- CHEN, C.A. & OKAYAMA, H. (1988) Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques*, 6, 632–638.
- CHEN, D., SHEN, L., WANG, L., LU, A., ZHANG, H., ZHANG, X., ET AL. (2007) Association of polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene with the age of onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 8, 144–149.
- CHEN, Y.-Z., BENNETT, C.L., HUYNH, H.M., BLAIR, I.P., PULS, I., IROBI, J., ET AL. (2004) DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *American Journal of Human Genetics*, 74, 1128–1135.
- CHERONI, C., MARINO, M., TORTAROLO, M., VEGLIANESE, P., DE BIASI, S., FONTANA, E., ET AL. (2009) Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 18, 82–96.
- CHOI, J.-S., CHO, S., PARK, S.G., PARK, B.C. & LEE, D.H. (2004) Co-chaperone CHIP associates with mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins linked to familial amyotrophic lateral sclerosis and promotes their degradation by proteasomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321, 574–583.

- CHOU, S.M. & NORRIS, F.H. (1993) Amyotrophic lateral sclerosis: lower motor neuron disease spreading to upper motor neurons. *Muscle & Nerve*, 16, 864–869.
- CHOW, C.Y., LANDERS, J.E., BERGREN, S.K., SAPP, P.C., GRANT, A.E., JONES, J.M., ET AL. (2009) Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *American Journal of Human Genetics*, 84, 85–88.
- CHUNG, C.T., NIEMELA, S.L. & MILLER, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 2172–2175.
- CHUNG, M.J. & SUH, Y.-L. (2002) Ultrastructural changes of mitochondria in the skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastructural Pathology*, 26, 3–7.
- CLAVAGUERA, F., BOLMONT, T., CROWTHER, R.A., ABRAMOWSKI, D., FRANK, S., PROBST, A., ET AL. (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature Cell Biology*, 11, 909–913.
- CLEMENT, A.M., NGUYEN, M.D., ROBERTS, E.A., GARCIA, M.L., BOILLÉE, S., RULE, M., ET AL. (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science (New York, N.Y.)*, 302, 113–117.
- COLBY, D.W. & PRUSINER, S.B. (2011) Prions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, a006833.
- CORCIA, P., CAMU, W., HALIMI, J.-M., VOURC'H, P., ANTAR, C., VEDRINE, S., ET AL. (2006) SMN1 gene, but not SMN2, is a risk factor for sporadic ALS. *Neurology*, 67, 1147–1150.
- CORCIA, P., MAYEUX-PORTAS, V., KHORIS, J., DE TOFFOL, B., AUTRET, A., MÜH, J.-P., ET AL. (2002) Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 51, 243–246.
- CRAPO, J.D., OURY, T., RABOUILLE, C., SLOT, J.W. & CHANG, L.Y. (1992) Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 10405–10409.
- CROW, J.P., SAMPSON, J.B., ZHUANG, Y., THOMPSON, J.A. & BECKMAN, J.S. (1997a) Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *Journal of Neurochemistry*, 69, 1936–1944.
- CROW, J.P., YE, Y.Z., STRONG, M., KIRK, M., BARNES, S. & BECKMAN, J.S. (1997b) Superoxide dismutase catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L. *Journal of Neurochemistry*, 69, 1945–1953.
- CULOTTA, V.C., KLOMP, L.W., STRAIN, J., CASARENO, R.L., KREMS, B. & GITLIN, J.D. (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 23469–23472.
- DAMIANO, M., STARKOV, A.A., PETRI, S., KIPIANI, K., KIAEI, M., MATTIAZZI, M., ET AL. (2006) Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *Journal of Neurochemistry*, 96, 1349–1361.

- VAN DAMME, P., BOGAERT, E., DEWIL, M., HERSMUS, N., KIRALY, D., SCHEVENEELS, W., ET AL. (2007) Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 14825–14830.
- VAN DAMME, P., BRAEKEN, D., CALLEWAERT, G., ROBBERECHT, W. & VAN DEN BOSCH, L. (2005) GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64, 605–612.
- VAN DAMME, P., LEYSSEN, M., CALLEWAERT, G., ROBBERECHT, W. & VAN DEN BOSCH, L. (2003) The AMPA receptor antagonist NBQX prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 343, 81–84.
- DAOUD, H. & ROULEAU, G.A. (2011) A role for ubiquilin 2 mutations in neurodegeneration. *Nature Reviews. Neurology*, 7, 599–600.
- DAOUD, H., VALDMANIS, P.N., KABASHI, E., DION, P., DUPRÉ, N., CAMU, W., ET AL. (2009) Contribution of TARDBP mutations to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Medical Genetics*, 46, 112–114.
- DEJESUS-HERNANDEZ, M., MACKENZIE, I.R., BOEVE, B.F., BOXER, A.L., BAKER, M., RUTHERFORD, N.J., ET AL. (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72, 245–256.
- DELISLE, M.B. & CARPENTER, S. (1984) Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 63, 241–250.
- DENG, H.-X., CHEN, W., HONG, S.-T., BOYCOTT, K.M., GORRIE, G.H., SIDDIQUE, N., ET AL. (2011) Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, advance online publication.
- DENG, H.X., HENTATI, A., TAINER, J.A., IQBAL, Z., CAYABYAB, A., HUNG, W.Y., ET AL. (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science (New York, N.Y.)*, 261, 1047–1051.
- DENG, H.-X., SHI, Y., FURUKAWA, Y., ZHAI, H., FU, R., LIU, E., ET AL. (2006) Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 7142–7147.
- DESPLATS, P., LEE, H.-J., BAE, E.-J., PATRICK, C., ROCKENSTEIN, E., CREWS, L., ET AL. (2009) Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 13010–13015.
- DICKSON, D.W., JOSEPHS, K.A. & AMADOR-ORTIZ, C. (2007) TDP-43 in differential diagnosis of motor neuron disorders. *Acta Neuropathologica*, 114, 71–79.
- DUPUIS, L., DI SCALA, F., RENE, F., DE TAPIA, M., OUDART, H., PRADAT, P.-F., ET AL. (2003) Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17, 2091–2093.

- DYKENS, J.A. (1994) Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : implications for neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 63, 584–591.
- EBELING, W., HENNRICH, N., KLOCKOW, M., METZ, H., ORTH, H.D. & LANG, H. (1974) Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 47, 91–97.
- EISELE, Y.S., BOLMONT, T., HEIKENWALDER, M., LANGER, F., JACOBSON, L.H., YAN, Z.-X., ET AL. (2009) Induction of cerebral beta-amyloidosis: intracerebral versus systemic A β inoculation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 12926–12931.
- EISELE, Y.S., OBERMÜLLER, U., HEILBRONNER, G., BAUMANN, F., KAESER, S.A., WOLBURG, H., ET AL. (2010) Peripherally applied A β -containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science (New York, N.Y.)*, 330, 980–982.
- ELBASHIR, S.M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. & TUSCHL, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494–498.
- ELCHURI, S., OBERLEY, T.D., QI, W., EISENSTEIN, R.S., JACKSON ROBERTS, L., VAN REMMEN, H., ET AL. (2005) CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*, 24, 367–380.
- ELDEN, A.C., KIM, H.-J., HART, M.P., CHEN-PLOTKIN, A.S., JOHNSON, B.S., FANG, X., ET AL. (2010) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*, 466, 1069–1075.
- ESTÉVEZ, A.G., CROW, J.P., SAMPSON, J.B., REITER, C., ZHUANG, Y., RICHARDSON, G.J., ET AL. (1999) Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science (New York, N.Y.)*, 286, 2498–2500.
- FERRANTE, R.J., SHINOBU, L.A., SCHULZ, J.B., MATTHEWS, R.T., THOMAS, C.E., KOWALL, N.W., ET AL. (1997) Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Annals of Neurology*, 42, 326–334.
- FIELD, L.S., FURUKAWA, Y., O'HALLORAN, T.V. & CULOTTA, V.C. (2003) Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 28052–28059.
- FIGLEWICZ, D.A., KRIZUS, A., MARTINOLI, M.G., MEININGER, V., DIB, M., ROULEAU, G.A. & JULIEN, J.P. (1994) Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 3, 1757–1761.
- FORMAN, H.J. & FRIDOVICH, I. (1973) On the stability of bovine superoxide dismutase. The effects of metals. *The Journal of Biological Chemistry*, 248, 2645–2649.
- FRIDOVICH, I. (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, 239–257.
- FRIDOVICH, I. (1986) Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 58, 61–97.

- FRIDOVICH, I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 7761–7764.
- FROST, B., JACKS, R.L. & DIAMOND, M.I. (2009) Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 12845–12852.
- FUKADA, K., NAGANO, S., SATOH, M., TOHYAMA, C., NAKANISHI, T., SHIMIZU, A., 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. *The European Journal of Neuroscience*, 14, 2032–2036.
- FURUKAWA, Y., TORRES, A.S. & O'HALLORAN, T.V. (2004) Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *The EMBO Journal*, 23, 2872–2881.
- GALIÑANES, M. & MATATA, B.M. (2002) Protein nitration is predominantly mediated by a peroxynitrite-dependent pathway in cultured human leucocytes. *The Biochemical Journal*, 367, 467–473.
- GAMBETTI, P., DONG, Z., YUAN, J., XIAO, X., ZHENG, M., ALSHEKHLEE, A., ET AL. (2008) A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Annals of Neurology*, 63, 697–708.
- GAMERDINGER, M., KAYA, A.M., WOLFRUM, U., CLEMENT, A.M. & BEHL, C. (2011) BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Reports*, 12, 149–156.
- GANEL, R., HO, T., MARAGAKIS, N.J., JACKSON, M., STEINER, J.P. & ROTHSTEIN, J.D. (2006) Selective up-regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporter GLT1 by a neuroimmunophilin ligand results in neuroprotection. *Neurobiology of Disease*, 21, 556–567.
- GELLER, B.L. & WINGE, D.R. (1982) Rat liver Cu,Zn-superoxide dismutase. Subcellular location in lysosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 257, 8945–8952.
- GOLDEN, J.W. & RIDDLE, D.L. (1982) A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 218, 578–580.
- GOLDEN, J.W. & RIDDLE, D.L. (1984) The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental Biology*, 102, 368–378.
- GONG, Y.H., PARSADANIAN, A.S., ANDREEVA, A., SNIDER, W.D. & ELLIOTT, J.L. (2000) Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrogliosis but does not cause motoneuron degeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20, 660–665.
- GOW, A.J., DURAN, D., MALCOLM, S. & ISCHIROPOULOS, H. (1996) Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Letters*, 385, 63–66.
- GREENWAY, M.J., ALEXANDER, M.D., ENNIS, S., TRAYNOR, B.J., CORR, B., FROST, E., ET AL. (2004) A novel candidate region for ALS on chromosome 14q11.2. *Neurology*, 63, 1936–1938.

- GREENWAY, M.J., ANDERSEN, P.M., RUSS, C., ENNIS, S., CASHMAN, S., DONAGHY, C., ET AL. (2006) ANG mutations segregate with familial and “sporadic” amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 38, 411–413.
- GROS-LOUIS, F., LARIVIÈRE, R., GOWING, G., LAURENT, S., CAMU, W., BOUCHARD, J.-P., ET AL. (2004) A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 45951–45956.
- GROSS-BELLARD, M., OUDET, P. & CHAMBON, P. (1973) Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 36, 32–38.
- GUO, H., LAI, L., BUTCHBACH, M.E.R., STOCKINGER, M.P., SHAN, X., BISHOP, G.A. & LIN, C.G. (2003) Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Human Molecular Genetics*, 12, 2519–2532.
- GURNEY, M.E., PU, H., CHIU, A.Y., DAL CANTO, M.C., POLCHOW, C.Y., ALEXANDER, D.D., ET AL. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science (New York, N.Y.)*, 264, 1772–1775.
- HALLIWELL, B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 59, 1609–1623.
- HALLIWELL, B. (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97, 1634–1658.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. (1985) Oxygen radicals and the nervous system. *Trends in Neurosciences*, 8, 22–26.
- HALLIWELL, B. & WHITEMAN, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231–255.
- HAN, D., WILLIAMS, E. & CADENAS, E. (2001) Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *The Biochemical Journal*, 353, 411–416.
- HARRIS, J.I., AUFFRET, A.D., NORTHROP, F.D. & WALKER, J.E. (1980) Structural comparisons of superoxide dismutases. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 106, 297–303.
- HAYWARD, L.J., RODRIGUEZ, J.A., KIM, J.W., TIWARI, A., GOTO, J.J., CABELLI, D.E., ET AL. (2002) Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 15923–15931.
- HEELIS, P.F. (1982) The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines). *Chem. Soc. Rev.*, 11, 15–39.
- HENTATI, A., BEJAOU, K., PERICAK-VANCE, M.A., HENTATI, F., SPEER, M.C., HUNG, W.Y., ET AL. (1994) Linkage of recessive familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 2q33-q35. *Nature Genetics*, 7, 425–428.

- HIGASHI, S., TSUCHIYA, Y., ARAKI, T., WADA, K. & KABUTA, T. (2010) TDP-43 physically interacts with amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant CuZn superoxide dismutase. *Neurochemistry International*, 57, 906–913.
- HIGGINS, C.M.J., JUNG, C., DING, H. & XU, Z. (2002) Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22, RC215.
- HILLIARD, M.A., BARGMANN, C.I. & BAZZICALUPO, P. (2002) *C. elegans* responds to chemical repellents by integrating sensory inputs from the head and the tail. *Current Biology: CB*, 12, 730–734.
- HILLIARD, M.A., BERGAMASCO, C., ARBUCCI, S., PLASTERK, R.H. & BAZZICALUPO, P. (2004) Worms taste bitter: ASH neurons, QUI-1, GPA-3 and ODR-3 mediate quinine avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*, 23, 1101–1111.
- HILZ, H., WIEGERS, U. & ADAMIETZ, P. (1975) Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of “masked” proteins. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 56, 103–108.
- HIRANO, A., DONNENFELD, H., SASAKI, S. & NAKANO, I. (1984) Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 43, 461–470.
- HODGSON, E.K. & FRIDOVICH, I. (1973) Reversal of the superoxide dismutase reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 54, 270–274.
- HODGSON, E.K. & FRIDOVICH, I. (1975) The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry*, 14, 5294–5299.
- HOFFMAN, E.K., WILCOX, H.M., SCOTT, R.W. & SIMAN, R. (1996) Proteasome inhibition enhances the stability of mouse Cu/Zn superoxide dismutase with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 139, 15–20.
- HOLLMANN, M., HARTLEY, M. & HEINEMANN, S. (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA--gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science (New York, N.Y.)*, 252, 851–853.
- HONG, S., CHOI, I., LEE, S., YANG, Y.I., KANG, T. & YI, J. (2009) Sensitive and colorimetric detection of the structural evolution of superoxide dismutase with gold nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 81, 1378–1382.
- HORVITZ, H.R., CHALFIE, M., TRENT, C., SULSTON, J.E. & EVANS, P.D. (1982) Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 216, 1012–1014.
- HOSLER, B.A., SAPP, P.C., BERGER, R., O’NEILL, G., BEJAOU, K., HAMIDA, M.B., ET AL. (1998) Refined mapping and characterization of the recessive familial amyotrophic lateral sclerosis locus (ALS2) on chromosome 2q33. *Neurogenetics*, 2, 34–42.
- HOSLER, B.A., SIDDIQUE, T., SAPP, P.C., SAILOR, W., HUANG, M.C., HOSSAIN, A., ET AL. (2000) Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 284, 1664–1669.

- HOUGH, M.A., GROSSMANN, J.G., ANTONYUK, S.V., STRANGE, R.W., DOUCETTE, P.A., RODRIGUEZ, J.A., ET AL. (2004) Dimer destabilization in superoxide dismutase may result in disease-causing properties: structures of motor neuron disease mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 5976–5981.
- HOWLAND, D.S., LIU, J., SHE, Y., GOAD, B., MARAGAKIS, N.J., KIM, B., ET AL. (2002) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 1604–1609.
- HUIE, R.E. & PADMAJA, S. (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Research Communications*, 18, 195–199.
- HURTLEY, S.M. & HELENIUS, A. (1989) Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Cell Biology*, 5, 277–307.
- HWANG, Y.-M., STATHOPOULOS, P.B., DIMMICK, K., YANG, H., BADIEL, H.R., TONG, M.S., ET AL. (2010) Nonamyloid aggregates arising from mature copper/zinc superoxide dismutases resemble those observed in amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 41701–41711.
- HYUN, D.-H., LEE, M., HALLIWELL, B. & JENNER, P. (2003) Proteasomal inhibition causes the formation of protein aggregates containing a wide range of proteins, including nitrated proteins. *Journal of Neurochemistry*, 86, 363–373.
- HYUN, D.-H., LEE, M.-H., HALLIWELL, B. & JENNER, P. (2002) Proteasomal dysfunction induced by 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal, an end-product of lipid peroxidation: a mechanism contributing to neurodegeneration? *Journal of Neurochemistry*, 83, 360–370.
- ILIEVA, H., POLYMENIDOU, M. & CLEVELAND, D.W. (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of Cell Biology*, 187, 761–772.
- IP, P., MULLIGAN, V.K. & CHAKRABARTTY, A. (2011) ALS-causing SOD1 mutations promote production of copper-deficient misfolded species. *Journal of Molecular Biology*, 409, 839–852.
- ISCHIROPOULOS, H., ZHU, L., CHEN, J., TSAI, M., MARTIN, J.C., SMITH, C.D. & BECKMAN, J.S. (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 298, 431–437.
- ISHIGAKI, S., HISHIKAWA, N., NIWA, J., IEMURA, S., NATSUME, T., HORI, S., ET AL. (2004) Physical and functional interaction between Dornfin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 51376–51385.
- ISHIGAKI, S., NIWA, J., YAMADA, S., TAKAHASHI, M., ITO, T., SONE, J., ET AL. (2007) Dornfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiology of Disease*, 25, 331–341.
- ISLINGER, M., LI, K.W., SEITZ, J., VÖLKL, A. & LÜERS, G.H. (2009) Hitchhiking of Cu/Zn superoxide dismutase to peroxisomes--evidence for a natural piggyback import mechanism in mammals. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10, 1711–1721.

- ISRAELSON, A., ARBEL, N., DA CRUZ, S., ILIEVA, H., YAMANAKA, K., SHOSHAN-BARMATZ, V. & CLEVELAND, D.W. (2010) Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *Neuron*, 67, 575–587.
- JAARSMA, D., HAASDIJK, E.D., GRASHORN, J.A., HAWKINS, R., VAN DUIJN, W., VERSPAGET, H.W., 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. *Neurobiology of Disease*, 7, 623–643.
- JAARSMA, D., TEULING, E., HAASDIJK, E.D., DE ZEEUW, C.I. & HOOGENRAAD, C.C. (2008) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28, 2075–2088.
- JABUSCH, J.R., FARB, D.L., KERSCHENSTEINER, D.A. & DEUTSCH, H.F. (1980) Some sulfhydryl properties and primary structure of human erythrocyte superoxide dismutase. *Biochemistry*, 19, 2310–2316.
- JOHNSON, J.O., MANDRIOLI, J., BENATAR, M., ABRAMZON, Y., VAN DEERLIN, V.M., TROJANOWSKI, J.Q., ET AL. (2010) Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*, 68, 857–864.
- JONES, C.T., SHAW, P.J., CHARI, G. & BROCK, D.J. (1994) Identification of a novel exon 4 SOD1 mutation in a sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient. *Molecular and Cellular Probes*, 8, 329–330.
- JONSSON, P.A., BÄCKSTRAND, A., ANDERSEN, P.M., JACOBSSON, J., PARTON, M., SHAW, C., ET AL. (2002) CuZn-superoxide dismutase in D90A heterozygotes from recessive and dominant ALS pedigrees. *Neurobiology of Disease*, 10, 327–333.
- JONSSON, P.A., ERNHILL, K., ANDERSEN, P.M., BERGEMALM, D., BRÄNNSTRÖM, T., GREDAL, O., ET AL. (2004) Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 127, 73–88.
- JUNG, C., HIGGINS, C.M.J. & XU, Z. (2002) A quantitative histochemical assay for activities of mitochondrial electron transport chain complexes in mouse spinal cord sections. *Journal of Neuroscience Methods*, 114, 165–172.
- KABASHI, E., AGAR, J.N., TAYLOR, D.M., MINOTTI, S. & DURHAM, H.D. (2004) Focal dysfunction of the proteasome: a pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 89, 1325–1335.
- KANEKURA, K., SUZUKI, H., AISO, S. & MATSUOKA, M. (2009) ER stress and unfolded protein response in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 39, 81–89.
- KANE, M.D., LIPINSKI, W.J., CALLAHAN, M.J., BIAN, F., DURHAM, R.A., SCHWARZ, R.D., ET AL. (2000) Evidence for seeding of beta -amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta -amyloid precursor protein-transgenic mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20, 3606–3611.

- KAPLAN, J.M. & HORVITZ, H.R. (1993) A dual mechanosensory and chemosensory neuron in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 2227–2231.
- KAWAMATA, H., MAGRANÉ, J., KUNST, C., KING, M.P. & MANFREDI, G. (2008) Lysyl-tRNA synthetase is a target for mutant SOD1 toxicity in mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 28321–28328.
- KAWAMATA, H. & MANFREDI, G. (2010) Import, maturation, and function of SOD1 and its copper chaperone CCS in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13, 1375–1384.
- KAWAMATA, T., AKIYAMA, H., YAMADA, T. & MCGEER, P.L. (1992) Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *The American Journal of Pathology*, 140, 691–707.
- KEILIN, D. & HARTREE, E.F. (1938) On the Mechanism of the Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 124, 397–405.
- KELLER, G.A., WARNER, T.G., STEIMER, K.S. & HALLEWELL, R.A. (1991) Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7381–7385.
- KERMAN, A., LIU, H.-N., CROUL, S., BILBAO, J., ROGAEVA, E., ZINMAN, L., ET AL. (2010) Amyotrophic lateral sclerosis is a non-amyloid disease in which extensive misfolding of SOD1 is unique to the familial form. *Acta Neuropathologica*, 119, 335–344.
- KHORIS, J., MOULARD, B., BRILOTTI, V., HAYER, M., DURIEUX, A., CLAVELLOU, P., ET AL. (2000) Coexistence of dominant and recessive familial amyotrophic lateral sclerosis with the D90A Cu,Zn superoxide dismutase mutation within the same country. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 7, 207–211.
- KIKUCHI, H., ALMER, G., YAMASHITA, S., GUÉGAN, C., NAGAI, M., XU, Z., ET AL. (2006) Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 6025–6030.
- KIRBY, J., HEWAMADDUMA, C.A.A., HARTLEY, J.A., NIXON, H.C., EVANS, H., WADHWA, R.R., ET AL. (2007) Mutations in VAPB are not associated with sporadic ALS. *Neurology*, 68, 1951–1953.
- KITAMURA, F., FUJIMAKI, N., OKITA, W., HIRAMATSU, H. & TAKEUCHI, H. (2011) Structural instability and Cu-dependent pro-oxidant activity acquired by the apo form of mutant SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemistry*, 50, 4242–4250.
- KOZUTSUMI, Y., SEGAL, M., NORMINGTON, K., GETHING, M.J. & SAMBROOK, J. (1988) The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 332, 462–464.

- KRUMAN, I.I., PEDERSEN, W.A., SPRINGER, J.E. & MATTSON, M.P. (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. *Experimental Neurology*, 160, 28–39.
- KUNST, C.B., MEZEY, E., BROWNSTEIN, M.J. & PATTERSON, D. (1997) Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. *Nature Genetics*, 15, 91–94.
- KWIATKOWSKI, T.J., JR, BOSCO, D.A., LECLERC, A.L., TAMRAZIAN, E., VANDERBURG, C.R., RUSS, C., ET AL. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 323, 1205–1208.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- LAMB, A.L., TORRES, A.S., O'HALLORAN, T.V. & ROSENZWEIG, A.C. (2001) Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nature Structural Biology*, 8, 751–755.
- LANGER, F., EISELE, Y.S., FRITSCHI, S.K., STAUFENBIEL, M., WALKER, L.C. & JUCKER, M. (2011) Soluble A β seeds are potent inducers of cerebral β -amyloid deposition. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31, 14488–14495.
- LEE, T., LI, Y.R., INGRE, C., WEBER, M., GREHL, T., GREDAL, O., ET AL. (2011) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Human Molecular Genetics*, 20, 1697–1700.
- LEINWEBER, B., BAROFSKY, E., BAROFSKY, D.F., ERMILOV, V., NYLIN, K. & BECKMAN, J.S. (2004) Aggregation of ALS mutant superoxide dismutase expressed in Escherichia coli. *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 911–918.
- LEUNG, C.L., HE, C.Z., KAUFMANN, P., CHIN, S.S., NAINI, A., LIEM, R.K.H., ET AL. (2004) A pathogenic peripherin gene mutation in a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 14, 290–296.
- LI, H.-T., JIAO, M., CHEN, J. & LIANG, Y. (2010) Roles of zinc and copper in modulating the oxidative refolding of bovine copper, zinc superoxide dismutase. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 42, 183–194.
- LI, J.-Y., ENGLUND, E., HOLTON, J.L., SOULET, D., HAGELL, P., LEES, A.J., ET AL. (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature Medicine*, 14, 501–503.
- LINO, M.M., SCHNEIDER, C. & CARONI, P. (2002) Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22, 4825–4832.
- LIOCHEV, S.I. & FRIDOVICH, I. (2010) Mechanism of the peroxidase activity of Cu, Zn superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine*, 48, 1565–1569.

- LIU, J., LILLO, C., JONSSON, P.A., VANDE VELDE, C., WARD, C.M., MILLER, T.M., ET AL. (2004) Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron*, 43, 5–17.
- LIU, J., SHINOBU, L.A., WARD, C.M., YOUNG, D. & CLEVELAND, D.W. (2005) Elevation of the Hsp70 chaperone does not effect toxicity in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 93, 875–882.
- LIU, R., LI, B., FLANAGAN, S.W., OBERLEY, L.W., GOZAL, D. & QIU, M. (2002) Increased mitochondrial antioxidative activity or decreased oxygen free radical propagation prevent mutant SOD1-mediated motor neuron cell death and increase amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mouse survival. *Journal of Neurochemistry*, 80, 488–500.
- LOBSIGER, C.S., BOILLÉE, S. & CLEVELAND, D.W. (2007) Toxicity from different SOD1 mutants dysregulates the complement system and the neuronal regenerative response in ALS motor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 7319–7326.
- LOBSIGER, C.S., BOILLÉE, S., McALONIS-DOWNES, M., KHAN, A.M., FELTRI, M.L., YAMANAKA, K. & CLEVELAND, D.W. (2009) Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 4465–4470.
- MÄÄTTÄNEN, P., GEHRING, K., BERGERON, J.J.M. & THOMAS, D.Y. (2010) Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21, 500–511.
- MAIER, C.M. & CHAN, P.H. (2002) Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 8, 323–334.
- MARKLUND, S.L. (1982) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 7634–7638.
- MARKLUND, S.L. (1984) Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *The Biochemical Journal*, 222, 649–655.
- MARTIN, B.L., WU, D., JAKES, S. & GRAVES, D.J. (1990) Chemical influences on the specificity of tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 7108–7111.
- MARUYAMA, H., MORINO, H., ITO, H., IZUMI, Y., KATO, H., WATANABE, Y., ET AL. (2010) Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 465, 223–226.
- MATTIAZZI, M., D'AURELIO, M., GAJEWSKI, C.D., MARTUSHOVA, K., KIAEI, M., BEAL, M.F. & MANFREDI, G. (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 29626–29633.
- MCCORD, J.M. & FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049–6055.

- McKINLEY, M.P., BOLTON, D.C. & PRUSINER, S.B. (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, 35, 57–62.
- MENZIES, F.M., COOKSON, M.R., TAYLOR, R.W., TURNBULL, D.M., CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z.M.A., DONG, L., ET AL. (2002) Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 125, 1522–1533.
- MEYER-LUEHMANN, M., COOMARASWAMY, J., BOLMONT, T., KAESER, S., SCHAEFER, C., KILGER, E., ET AL. (2006) Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science (New York, N.Y.)*, 313, 1781–1784.
- MEYER, M.A. & POTTER, N.T. (1995) Sporadic ALS and chromosome 22: evidence for a possible neurofilament gene defect. *Muscle & Nerve*, 18, 536–539.
- MILLECAMPS, S., DA BARROCA, S., CAZENEUVE, C., SALACHAS, F., PRADAT, P.-F., DANIEL-BRUNAUD, V., ET AL. (2010) Questioning on the role of D amino acid oxidase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, E107; author reply E108.
- MILLER, R.G., MITCHELL, J.D., LYON, M. & MOORE, D.H. (2007) Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, CD001447.
- MILLER, T.M., KIM, S.H., YAMANAKA, K., HESTER, M., UMAPATHI, P., ARNSON, H., ET AL. (2006) Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 19546–19551.
- MILLS, G.C. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of Biological Chemistry*, 229, 189–197.
- MITCHELL, J., PAUL, P., CHEN, H.-J., MORRIS, A., PAYLING, M., FALCHI, M., ET AL. (2010) Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 7556–7561.
- MIYAZAKI, K., FUJITA, T., OZAKI, T., KATO, C., KUROSE, Y., SAKAMOTO, M., ET AL. (2004) NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 11327–11335.
- MIZUSAWA, H., NAKAMURA, H., WAKAYAMA, I., YEN, S.H. & HIRANO, A. (1991) Skein-like inclusions in the anterior horn cells in motor neuron disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 105, 14–21.
- MONDOLA, P., ANNELLA, T., SANTILLO, M. & SANTANGELO, F. (1996) Evidence for secretion of cytosolic CuZn superoxide dismutase by Hep G2 cells and human fibroblasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28, 677–681.

- MONDOLA, P., ANNELLA, T., SERÙ, R., SANTANGELO, F., IOSSA, S., GIOIELLI, A. & SANTILLO, M. (1998) Secretion and increase of intracellular CuZn superoxide dismutase content in human neuroblastoma SK-N-BE cells subjected to oxidative stress. *Brain Research Bulletin*, 45, 517–520.
- MONDOLA, P., RUGGIERO, G., SERÙ, R., DAMIANO, S., GRIMALDI, S., GARBI, C., ET AL. (2003) The Cu,Zn superoxide dismutase in neuroblastoma SK-N-BE cells is exported by a microvesicles dependent pathway. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 110, 45–51.
- MULLIGAN, V.K., KERMAN, A., HO, S. & CHAKRABARTTY, A. (2008) Denaturational stress induces formation of zinc-deficient monomers of Cu,Zn superoxide dismutase: implications for pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Molecular Biology*, 383, 424–436.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, 263–273.
- MÜNCH, C., O'BRIEN, J. & BERTOLOTTI, A. (2011) Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 3548–3553.
- MÜNCH, C., ROSENBOHM, A., SPERFELD, A.-D., UTTNER, I., RESKE, S., KRAUSE, B.J., ET AL. (2005) Heterozygous R1101K mutation of the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD. *Annals of Neurology*, 58, 777–780.
- MÜNCH, C., SEDLMEIER, R., MEYER, T., HOMBERG, V., SPERFELD, A.D., KURT, A., ET AL. (2004) Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology*, 63, 724–726.
- MUNOZ, D.G., GREENE, C., PERL, D.P. & SELKOE, D.J. (1988) Accumulation of phosphorylated neurofilaments in anterior horn motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 47, 9–18.
- MURAYAMA, S., OOKAWA, Y., MORI, H., NAKANO, I., IHARA, Y., KUZUHARA, S. & TOMONAGA, M. (1989) Immunocytochemical and ultrastructural study of Lewy body-like hyaline inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 78, 143–152.
- NAGAMI, H., YOSHIMOTO, N., UMAKOSHI, H., SHIMANOUCHI, T. & KUBOI, R. (2005) Liposome-assisted activity of superoxide dismutase under oxidative stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 423–428.
- NAKAGAWA, T., ZHU, H., MORISHIMA, N., LI, E., XU, J., YANKNER, B.A. & YUAN, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403, 98–103.
- NATERA, J., MASSAD, W.A. & GARCÍA, N.A. (2011) Vitamin B1 as a Scavenger of Reactive Oxygen Species Photogenerated by Vitamin B2. *Photochemistry and Photobiology*, 87, 317–323.
- NEUMANN, M., SAMPATHU, D.M., KWONG, L.K., TRUAX, A.C., MICSENYI, M.C., CHOU, T.T., ET AL. (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 314, 130–133.

- NEUSCH, C., BÄHR, M. & SCHNEIDER-GOLD, C. (2007) Glia cells in amyotrophic lateral sclerosis: new clues to understanding an old disease? *Muscle & Nerve*, 35, 712–724.
- NISHIMURA, A.L., MITNE-NETO, M., SILVA, H.C.A., RICHIERI-COSTA, A., MIDDLETON, S., CASCIO, D., ET AL. (2004) A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *American Journal of Human Genetics*, 75, 822–831.
- NISHITOH, H., KADOWAKI, H., NAGAI, A., MARUYAMA, T., YOKOTA, T., FUKUTOMI, H., ET AL. (2008) ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes & Development*, 22, 1451–1464.
- NIWA, J.-I., ISHIGAKI, S., HISHIKAWA, N., YAMAMOTO, M., DOYU, M., MURATA, S., ET AL. (2002) Dofin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 36793–36798.
- OKADO-MATSUMOTO, A. & FRIDOVICH, I. (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 38388–38393.
- OLIVER HOBERT (2002) PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*. *BioTechniques*, 32, 728–730.
- OOSTHUYSE, B., MOONS, L., STORKEBAUM, E., BECK, H., NUYENS, D., BRUSSELMANS, K., ET AL. (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nature Genetics*, 28, 131–138.
- PASINELLI, P., BELFORD, M.E., LENNON, N., BACSKAI, B.J., HYMAN, B.T., TROTTI, D. & BROWN, R.H., JR (2004) Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron*, 43, 19–30.
- PASTRANA, M.A., SAJNANI, G., ONISKO, B., CASTILLA, J., MORALES, R., SOTO, C. & REQUENA, J.R. (2006) Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrPSc fraction. *Biochemistry*, 45, 15710–15717.
- PERLSON, E., JEONG, G.-B., ROSS, J.L., DIXIT, R., WALLACE, K.E., KALB, R.G. & HOLZBAUR, E.L.F. (2009) A switch in retrograde signaling from survival to stress in rapid-onset neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29, 9903–9917.
- POTTER, S.Z., ZHU, H., SHAW, B.F., RODRIGUEZ, J.A., DOUCETTE, P.A., SOHN, S.H., ET AL. (2007) Binding of a single zinc ion to one subunit of copper-zinc superoxide dismutase apoprotein substantially influences the structure and stability of the entire homodimeric protein. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 4575–4583.
- PRAMATAROVA, A., LAGANIÈRE, J., ROUSSEL, J., BRISEBOIS, K. & ROULEAU, G.A. (2001) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21, 3369–3374.
- PRUDENCIO, M. & BORCHELT, D.R. (2011) Superoxide dismutase 1 encoding mutations linked to ALS adopts a spectrum of misfolded states. *Molecular Neurodegeneration*, 6, 77.

- PRUSINER, S.B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, N.Y.)*, 216, 136–144.
- PULS, I., JONNAKUTY, C., LAMONTE, B.H., HOLZBAUR, E.L.F., TOKITO, M., MANN, E., ET AL. (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nature Genetics*, 33, 455–456.
- PUTTAPARTHI, K., WOJCIK, C., RAJENDRAN, B., DEMARTINO, G.N. & ELLIOTT, J.L. (2003) Aggregate formation in the spinal cord of mutant SOD1 transgenic mice is reversible and mediated by proteasomes. *Journal of Neurochemistry*, 87, 851–860.
- RABANI, J. & NIELSEN, S.O. (1969) Absorption spectrum and decay kinetics of O₂- and HO₂ in aqueous solutions by pulse radiolysis. *J. Phys. Chem.*, 73, 3736–3744.
- RADI, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 4003–4008.
- RAKHIT, R., ROBERTSON, J., VANDE VELDE, C., HORNE, P., RUTH, D.M., GRIFFIN, J., ET AL. (2007) An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. *Nature Medicine*, 13, 754–759.
- RALPH, G.S., RADCLIFFE, P.A., DAY, D.M., CARTHY, J.M., LEROUX, M.A., LEE, D.C.P., ET AL. (2005) Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nature Medicine*, 11, 429–433.
- RAO, R.V., HERMEL, E., CASTRO-OBREGON, S., DEL RIO, G., ELLERBY, L.M., ELLERBY, H.M. & BREDESEN, D.E. (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 33869–33874.
- RATOVITSKI, T., CORSON, L.B., STRAIN, J., WONG, P., CLEVELAND, D.W., CULOTTA, V.C. & BORCHELT, D.R. (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. *Human Molecular Genetics*, 8, 1451–1460.
- REAUME, A.G., ELLIOTT, J.L., HOFFMAN, E.K., KOWALL, N.W., FERRANTE, R.J., SIWEK, D.F., ET AL. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genetics*, 13, 43–47.
- REN, P.-H., LAUCKNER, J.E., KACHIRSKAIA, I., HEUSER, J.E., MELKI, R. & KOPITO, R.R. (2009) Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nature Cell Biology*, 11, 219–225.
- RENTON, A.E., MAJOUNIE, E., WAITE, A., SIMÓN-SÁNCHEZ, J., ROLLINSON, S., GIBBS, J.R., ET AL. (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72, 257–268.
- RICHARDSON, J., THOMAS, K.A., RUBIN, B.H. & RICHARDSON, D.C. (1975) Crystal structure of bovine Cu,Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 1349–1353.

- RIPPS, M.E., HUNTLEY, G.W., HOF, P.R., MORRISON, J.H. & GORDON, J.W. (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 689–693.
- ROE, J.A., BUTLER, A., SCHOLLER, D.M., VALENTINE, J.S., MARKY, L. & BRESLAUER, K.J. (1988) Differential scanning calorimetry of Cu,Zn-superoxide dismutase, the apoprotein, and its zinc-substituted derivatives. *Biochemistry*, 27, 950–958.
- ROSEN, D.R., SIDDIQUE, T., PATTERSON, D., FIGLEWICZ, D.A., SAPP, P., HENTATI, A., ET AL. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362, 59–62.
- ROTHSTEIN, J.D. (2009) Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 65 Suppl 1, S3–9.
- ROTHSTEIN, J.D., DYKES-HOBERG, M., PARDO, C.A., BRISTOL, L.A., JIN, L., KUNCL, R.W., ET AL. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16, 675–686.
- ROTHSTEIN, J.D., VAN KAMMEN, M., LEVEY, A.I., MARTIN, L.J. & KUNCL, R.W. (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 38, 73–84.
- ROTHSTEIN, J.D., MARTIN, L.J. & KUNCL, R.W. (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 326, 1464–1468.
- ROTHSTEIN, J.D., PATEL, S., REGAN, M.R., HAENGGELI, C., HUANG, Y.H., BERGLES, D.E., ET AL. (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, 433, 73–77.
- ROTHSTEIN, J.D., TSAI, G., KUNCL, R.W., CLAWSON, L., CORNBATH, D.R., DRACHMAN, D.B., ET AL. (1990) Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 28, 18–25.
- ROULEAU, G.A., CLARK, A.W., ROOKE, K., PRAMATAROVA, A., KRIZUS, A., SUCHOWERSKY, O., ET AL. (1996) SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 39, 128–131.
- SAEED, M., SIDDIQUE, N., HUNG, W.Y., USACHEVA, E., LIU, E., SUFIT, R.L., ET AL. (2006) Paraoxonase cluster polymorphisms are associated with sporadic ALS. *Neurology*, 67, 771–776.
- SAFAR, J., WILLE, H., ITRI, V., GROTH, D., SERBAN, H., TORCHIA, M., ET AL. (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nature Medicine*, 4, 1157–1165.
- SAID AHMED, M., HUNG, W.Y., ZU, J.S., HOCKBERGER, P. & SIDDIQUE, T. (2000) Increased reactive oxygen species in familial amyotrophic lateral sclerosis with mutations in SOD1. *Journal of the Neurological Sciences*, 176, 88–94.
- SARGSYAN, S.A., MONK, P.N. & SHAW, P.J. (2005) Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*, 51, 241–253.

- SASAKI, S. & IWATA, M. (1996) Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 204, 53–56.
- SASAKI, S. & IWATA, M. (1999) Ultrastructural change of synapses of Betz cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 268, 29–32.
- SASAKI, S., KAMEI, H., YAMANE, K. & MARUYAMA, S. (1988) Swelling of neuronal processes in motor neuron disease. *Neurology*, 38, 1114–1118.
- SASAKI, S. & MARUYAMA, S. (1991) Immunocytochemical and ultrastructural studies of hyaline inclusions in sporadic motor neuron disease. *Acta Neuropathologica*, 82, 295–301.
- SASAKI, S., MARUYAMA, S., YAMANE, K., SAKUMA, H. & TAKEISHI, M. (1990) Ultrastructure of swollen proximal axons of anterior horn neurons in motor neuron disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 97, 233–240.
- SASAKI, S., WARITA, H., MURAKAMI, T., ABE, K. & IWATA, M. (2004) Ultrastructural study of mitochondria in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathologica*, 107, 461–474.
- SCHAFER, W.R. (2005) Egg-laying. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–7.
- SCHMIDLIN, T., KENNEDY, B.K. & DAGGETT, V. (2009) Structural changes to monomeric CuZn superoxide dismutase caused by the familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutation A4V. *Biophysical Journal*, 97, 1709–1718.
- SCHRÖDER, M. & KAUFMAN, R.J. (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 739–789.
- SCHWARTZ, A.L. & CIECHANOVER, A. (1992) Ubiquitin-mediated protein modification and degradation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 7, 463–468.
- SCOTT, M.R., GROTH, D., TATZELT, J., TORCHIA, M., TREMBLAY, P., DEARMOND, S.J. & PRUSINER, S.B. (1997) Propagation of prion strains through specific conformers of the prion protein. *Journal of Virology*, 71, 9032–9044.
- SHINDER, G.A., LACOURSE, M.C., MINOTTI, S. & DURHAM, H.D. (2001) Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins have altered solubility and interact with heat shock/stress proteins in models of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 12791–12796.
- SHOSHAN-BARMATZ, V., DE PINTO, V., ZWECKSTETTER, M., RAVIV, Z., KEINAN, N. & ARBEL, N. (2010) VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 227–285.
- SLOWIK, A., TOMIK, B., PARTYKA, D., TURAJ, W., PERA, J., DZIEDZIC, T., ET AL. (2006) Paraoxonase-1 Q192R polymorphism and risk of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Genetics*, 69, 358–359.
- SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., ET AL. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76–85.

- SON, M., SRIKANTH, U., PUTTAPARTHI, K., LUTHER, C. & ELLIOTT, J.L. (2011) Biochemical properties and in vivo effects of the SOD1 zinc-binding site mutant (H80G). *Journal of Neurochemistry*, 118, 891–901.
- SPREUX-VAROQUAUX, O., BENSIMON, G., LACOMBLEZ, L., SALACHAS, F., PRADAT, P.F., LE FORESTIER, N., ET AL. (2002) Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 193, 73–78.
- STEINMAN, H.M. & HILL, R.L. (1973) Sequence homologies among bacterial and mitochondrial superoxide dismutases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 3725–3729.
- STEVENS, J.C., CHIA, R., HENDRIKS, W.T., BROS-FACER, V., VAN MINNEN, J., MARTIN, J.E., ET AL. (2010) Modification of Superoxide Dismutase 1 (SOD1) Properties by a GFP Tag – Implications for Research into Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *PLoS ONE*, 5, e9541.
- STIEBER, A., GONATAS, J.O. & GONATAS, N.K. (2000a) Aggregation of ubiquitin and a mutant ALS-linked SOD1 protein correlate with disease progression and fragmentation of the Golgi apparatus. *Journal of the Neurological Sciences*, 173, 53–62.
- STIEBER, A., GONATAS, J.O. & GONATAS, N.K. (2000b) 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. *Journal of the Neurological Sciences*, 177, 114–123.
- STURTZ, L.A., DIEKERT, K., JENSEN, L.T., LILL, R. & CULOTTA, V.C. (2001) A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 38084–38089.
- SUBRAMANIAM, J.R., LYONS, W.E., LIU, J., BARTNIKAS, T.B., ROTHSTEIN, J., PRICE, D.L., ET AL. (2002) Mutant SOD1 causes motor neuron disease independent of copper chaperone-mediated copper loading. *Nature Neuroscience*, 5, 301–307.
- SULSTON, J.E. & HORVITZ, H.R. (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 56, 110–156.
- SULSTON, J.E., SCHIERENBERG, E., WHITE, J.G. & THOMSON, J.N. (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100, 64–119.
- SUTTER, B., BOUNDS, P.L. & KOPPENOL, W.H. (2000) The preparation of apo-Cu,Zn superoxide dismutase by ion-exchange chromatography on iminodiacetic acid-sepharose. *Protein Expression and Purification*, 19, 53–56.
- SYMONYAN, M.A. & NALBANDYAN, R.M. (1972) Interaction of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from erythrocytes. *FEBS Letters*, 28, 22–24.
- SZABÓ, C., ISCHIROPOULOS, H. & RADI, R. (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6, 662–680.

- TAINER, J.A., GETZOFF, E.D., BEEM, K.M., RICHARDSON, J.S. & RICHARDSON, D.C. (1982) Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of Molecular Biology*, 160, 181–217.
- TAKEUCHI, H., KOBAYASHI, Y., ISHIGAKI, S., DOYU, M. & SOBUE, G. (2002a) Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 50966–50972.
- TAKEUCHI, H., KOBAYASHI, Y., YOSHIHARA, T., NIWA, J., DOYU, M., OHTSUKA, K. & SOBUE, G. (2002b) Hsp70 and Hsp40 improve neurite outgrowth and suppress intracytoplasmic aggregate formation in cultured neuronal cells expressing mutant SOD1. *Brain Research*, 949, 11–22.
- TEILUM, K., SMITH, M.H., SCHULZ, E., CHRISTENSEN, L.C., SOLOMENTSEV, G., OLIVEBERG, M. & AKKE, M. (2009) Transient structural distortion of metal-free Cu/Zn superoxide dismutase triggers aberrant oligomerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 18273–18278.
- THOMAS, K.A., RUBIN, B.H., BIER, C.J., RICHARDSON, J.S. & RICHARDSON, D.C. (1974) The crystal structure of bovine Cu²⁺,Zn²⁺ superoxide dismutase at 5.5-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 5677–5683.
- TOBISAWA, S., HOZUMI, Y., ARAWAKA, S., KOYAMA, S., WADA, M., NAGAI, M., ET AL. (2003) Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303, 496–503.
- TOHGI, H., ABE, T., YAMAZAKI, K., MURATA, T., ISHIZAKI, E. & ISOBE, C. (1999) Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 46, 129–131.
- TOMONAGA, M., SAITO, M., YOSHIMURA, M., SHIMADA, H. & TOHGI, H. (1978) Ultrastructure of the Bunina bodies in anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 42, 81–86.
- TROEMEL, E.R., CHOU, J.H., DWYER, N.D., COLBERT, H.A. & BARGMANN, C.I. (1995) Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell*, 83, 207–218.
- TROTTI, D., DANBOLT, N.C. & VOLTERRA, A. (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends in Pharmacological Sciences*, 19, 328–334.
- TROTTI, ROLFS, DANBOLT, BROWN & HEDIGER (1999) SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nature Neuroscience*, 2, 848.
- TRUMBULL, K.A. & BECKMAN, J.S. (2009) A role for copper in the toxicity of zinc-deficient superoxide dismutase to motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 1627–1639.

- TUMMALA, H., JUNG, C., TIWARI, A., HIGGINS, C.M.J., HAYWARD, L.J. & XU, Z. (2005) Inhibition of chaperone activity is a shared property of several Cu,Zn-superoxide dismutase mutants that cause amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 17725–17731.
- URUSHITANI, M., KURISU, J., TATENO, M., HATAKEYAMA, S., NAKAYAMA, K.-I., KATO, S. & TAKAHASHI, R. (2004) CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. *Journal of Neurochemistry*, 90, 231–244.
- URUSHITANI, M., KURISU, J., TSUKITA, K. & TAKAHASHI, R. (2002) Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 83, 1030–1042.
- URUSHITANI, M., SIK, A., SAKURAI, T., NUKINA, N., TAKAHASHI, R. & JULIEN, J.-P. (2006) Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 9, 108–118.
- VALENTINE, J.S., DOUCETTE, P.A. & ZITTIN POTTER, S. (2005) Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 563–593.
- VECHIO, J.D., BRUIJN, L.I., XU, Z., BROWN, R.H., JR & CLEVELAND, D.W. (1996) Sequence variants in human neurofilament proteins: absence of linkage to familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 40, 603–610.
- VELDINK, J.H., KALMIJN, S., VAN DER HOUT, A.H., LEMMINK, H.H., GROENEVELD, G.J., LUMMEN, C., ET AL. (2005) SMN genotypes producing less SMN protein increase susceptibility to and severity of sporadic ALS. *Neurology*, 65, 820–825.
- VIELHABER, S., WINKLER, K., KIRCHES, E., KUNZ, D., BÜCHNER, M., FEISTNER, H., ET AL. (1999) Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 169, 133–139.
- VLEMINCKX, V., VAN DAMME, P., GOFFIN, K., DELYE, H., VAN DEN BOSCH, L. & ROBBERECHT, W. (2002) Upregulation of HSP27 in a transgenic model of ALS. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61, 968–974.
- DE VOS, K.J., CHAPMAN, A.L., TENNANT, M.E., MANSER, C., TUDOR, E.L., LAU, K.-F., ET AL. (2007) Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Human Molecular Genetics*, 16, 2720–2728.
- WANDERS, R.J. & DENIS, S. (1992) Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1115, 259–262.
- WANG, J., FARR, G.W., ZEISS, C.J., RODRIGUEZ-GIL, D.J., WILSON, J.H., FURTAK, K., ET AL. (2009a) Progressive aggregation despite chaperone associations of a mutant SOD1-YFP in transgenic mice that develop ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 1392–1397.
- WANG, J., SLUNT, H., GONZALES, V., FROMHOLT, D., COONFIELD, M., COPELAND, N.G., ET AL. (2003) Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature. *Human Molecular Genetics*, 12, 2753–2764.

- WANG, L., DENG, H.-X., GRISOTTI, G., ZHAI, H., SIDDIQUE, T. & ROOS, R.P. (2009b) Wild-type SOD1 overexpression accelerates disease onset of a G85R SOD1 mouse. *Human Molecular Genetics*, 18, 1642–1651.
- WANG, L., SHARMA, K., GRISOTTI, G. & ROOS, R.P. (2009c) The effect of mutant SOD1 dismutase activity on non-cell autonomous degeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 35, 234–240.
- WANG, Q., JOHNSON, J.L., AGAR, N.Y.R. & AGAR, J.N. (2008) Protein aggregation and protein instability govern familial amyotrophic lateral sclerosis patient survival. *PLoS Biology*, 6, e170.
- WARD, S., THOMSON, N., WHITE, J.G. & BRENNER, S. (1975) Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Comparative Neurology*, 160, 313–337.
- WARE, R.W., CLARK, D., CROSSLAND, K. & RUSSELL, R.L. (1975) The nerve ring of the nematode *Caenorhabditis elegans*: Sensory input and motor output. *The Journal of Comparative Neurology*, 162, 71–110.
- WATANABE, M., DYKES-HOBERG, M., CULOTTA, V.C., PRICE, D.L., WONG, P.C. & ROTHSTEIN, J.D. (2001) Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiology of Disease*, 8, 933–941.
- WEISIGER, R.A. & FRIDOVICH, I. (1973) Superoxide dismutase. Organelle specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 248, 3582–3592.
- WEISSMAN, A.M., SHABEK, N. & CIECHANOVER, A. (2011) The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12, 605–620.
- WHITMORE, L. & WALLACE, B.A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, 32, W668–673.
- WHITMORE, L. & WALLACE, B.A. (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, 89, 392–400.
- WIEDAU-PAZOS, M., GOTO, J.J., RABIZADEH, S., GRALLA, E.B., ROE, J.A., LEE, M.K., ET AL. (1996) Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 271, 515–518.
- WILLIAMSON, T.L. & CLEVELAND, D.W. (1999) Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nature Neuroscience*, 2, 50–56.
- WITAN, H., GORLOVOY, P., KAYA, A.M., KOZIOLLEK-DRECHSLER, I., NEUMANN, H., BEHL, C. & CLEMENT, A.M. (2009) Wild-type Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) does not facilitate, but impedes the formation of protein aggregates of amyotrophic lateral sclerosis causing mutant SOD1. *Neurobiology of Disease*, 36, 331–342.

- WITAN, H., KERN, A., KOZIOLLEK-DRECHSLER, I., WADE, R., BEHL, C. & CLEMENT, A.M. (2008) Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation. *Human Molecular Genetics*, 17, 1373–1385.
- WONG, P.C., PARDO, C.A., BORCHELT, D.R., LEE, M.K., COPELAND, N.G., JENKINS, N.A., 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.
- WONG, P.C., WAGGONER, D., SUBRAMANIAM, J.R., TESSAROLLO, L., BARTNIKAS, T.B., CULOTTA, V.C., ET AL. (2000) Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 2886–2891.
- WOOTZ, H., HANSSON, I., KORHONEN, L., NÄPÄNKANGAS, U. & LINDHOLM, D. (2004) Caspase-12 cleavage and increased oxidative stress during motoneuron degeneration in transgenic mouse model of ALS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322, 281–286.
- XIAO, S., MCLEAN, J. & ROBERTSON, J. (2006) Neuronal intermediate filaments and ALS: a new look at an old question. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1762, 1001–1012.
- YAMANAKA, K., BOILLEE, S., ROBERTS, E.A., GARCIA, M.L., MCALONIS-DOWNES, M., MIKSE, O.R., ET AL. (2008a) Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 7594–7599.
- YAMANAKA, K., CHUN, S.J., BOILLEE, S., FUJIMORI-TONOU, N., YAMASHITA, H., GUTMANN, D.H., ET AL. (2008b) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 11, 251–253.
- YANG, W., DUNLAP, J.R., ANDREWS, R.B. & WETZEL, R. (2002) Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Human Molecular Genetics*, 11, 2905–2917.
- YIM, M.B., CHOCK, P.B. & STADTMAN, E.R. (1990) Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 5006–5010.
- YIM, M.B., KANG, J.H., YIM, H.S., KWAK, H.S., CHOCK, P.B. & STADTMAN, E.R. (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 K_m for hydrogen peroxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 5709–5714.
- YING, Z., WANG, H., FAN, H., ZHU, X., ZHOU, J., FEI, E. & WANG, G. (2009) Gp78, an ER associated E3, promotes SOD1 and ataxin-3 degradation. *Human Molecular Genetics*, 18, 4268–4281.
- YONASHIRO, R., SUGIURA, A., MIYACHI, M., FUKUDA, T., MATSUSHITA, N., INATOME, R., ET AL. (2009) Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 4524–4530.

- ZELKO, I.N., MARIANI, T.J. & FOLZ, R.J. (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 Radical Biology & Medicine*, 33, 337–349.
- ZETTERSTROM, P., GRAFFMO, K.S., ANDERSEN, P.M., BRANNSTROM, T. & MARKLUND, S.L. (2011) Proteins that bind to misfolded mutant superoxide dismutase-1 in spinal cords from transgenic ALS model mice. *The Journal of Biological Chemistry*.
- ZHAI, J., LIN, H., CANETE-SOLER, R. & SCHLAEPFER, W.W. (2005) HoxB2 binds mutant SOD1 and is altered in transgenic model of ALS. *Human Molecular Genetics*, 14, 2629–2640.
- ZHANG, B., TU, P., ABTAHIAN, F., TROJANOWSKI, J.Q. & LEE, V.M. (1997) Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *The Journal of Cell Biology*, 139, 1307–1315.
- ZHANG, H., JOSEPH, J., GURNEY, M., BECKER, D. & KALYANARAMAN, B. (2002) Bicarbonate enhances peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. Role of carbonate anion radical and scavenging of carbonate anion radical by metalloporphyrin antioxidant enzyme mimetics. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 1013–1020.
- ZHAO, Z., CHEN, W.-Z., WU, Z., WANG, N., ZHAO, G., CHEN, W. & MURONG, S. (2009) A novel mutation in the senataxin gene identified in a Chinese patient with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 10, 118–122.
- ZOCCOLELLA, S., SANTAMATO, A. & LAMBERTI, P. (2009) Current and emerging treatments for amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 5, 577–595.

Internetquellen

http://alsod.iop.kcl.ac.uk/mutations/mutationsFoundGeneOnly.aspx?gene_id=SOD1
<http://www.als-charite.de/>
<http://www.alsmndalliance.org/>
<http://www.dgm.org/>

9. ANHANG

9.1 Abkürzungsverzeichnis

·OH	Hydroxylradikal
°C	Grad Celsius
37	G37R
4	A4V
85	G85R
93	G93C
Abb.	Abbildung
ad	Latein: bis
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	<i>Binding immunoglobulin Protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCS	<i>Copper Chaperone for SOD1</i> ; Kupfer Chaperon der SOD1
CD	<i>Circular Dichroism</i> ; Zirkulärer Dichroismus
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> ; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cu	Kupfer
CuSO ₄	Kupfersulfat
Cys	Cystein

d	Tag
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
EAAT2	Exzitatorischer Aminosäuretransporter 2
EC	<i>extra cellular</i> ; extrazellulär
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> ; grün fluoreszierendes Protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Degradation
et al.	et alteres (Latein: und andere)
fALS	familiäre Form der ALS
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; Fötales Kälberserum
Fe	<i>Ferrum</i> ; Eisen
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GLT-1	Glutamattransporter-1
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HEK	human embryonic kidney
His	Histidin
hSOD1	humane SOD1

HSP	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IgG M	IgG aus Maus
IgG R	IgG aus Kaninchen
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Lösliche Fraktion
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	Mol
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
Mn	Mangan
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mSOD1	murine SOD1
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazolium Chlorid
NF	Neurofilament
ng	Nanogramm
NGM	<i>nematode growth medium</i> ; Nematoden Wachstumsmedium
Ni	Nickel
nm	Nanometer

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NP-40	IGEPAL® CA-630
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i> ; Nitrilotriessigsäure
MCS	<i>multiple cloning site</i> ; multiple Klonierungsstelle
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OD	optische Dichte
OH ⁻	Hydroxidion
ONOO ⁻	Peroxinitrit
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	4-(2-Pyridylazo)resorcinol
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit TWEEN
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PEG	Polythylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPB	<i>potassium phosphate buffer</i> ; Kaliumphosphatpuffer
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygene species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
sALS	sporadische ALS
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde

SEDI	<i>SOD1 Exposed Dimer Interface</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOD	Superoxiddismutase
SOD1 ^{mut}	mutante SOD1
sra-6	<i>Serpentine Receptor, class A (alpha)</i>
T	Totallysat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TOM	<i>Translocator of the Outer Membrane</i>
TSS	<i>Transformation & Storage Solution</i>
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
Tyr	Tyrosin
U	<i>Units; Einheiten</i>
u.a.	unter anderem
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
USOD	<i>unfolded SOD1</i>
UV	Ultraviolett
WST-1	2-(4-Iodophenyl)- 3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, Mononatriumsalz
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink
ZnSO ₄	Zinksulfat
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

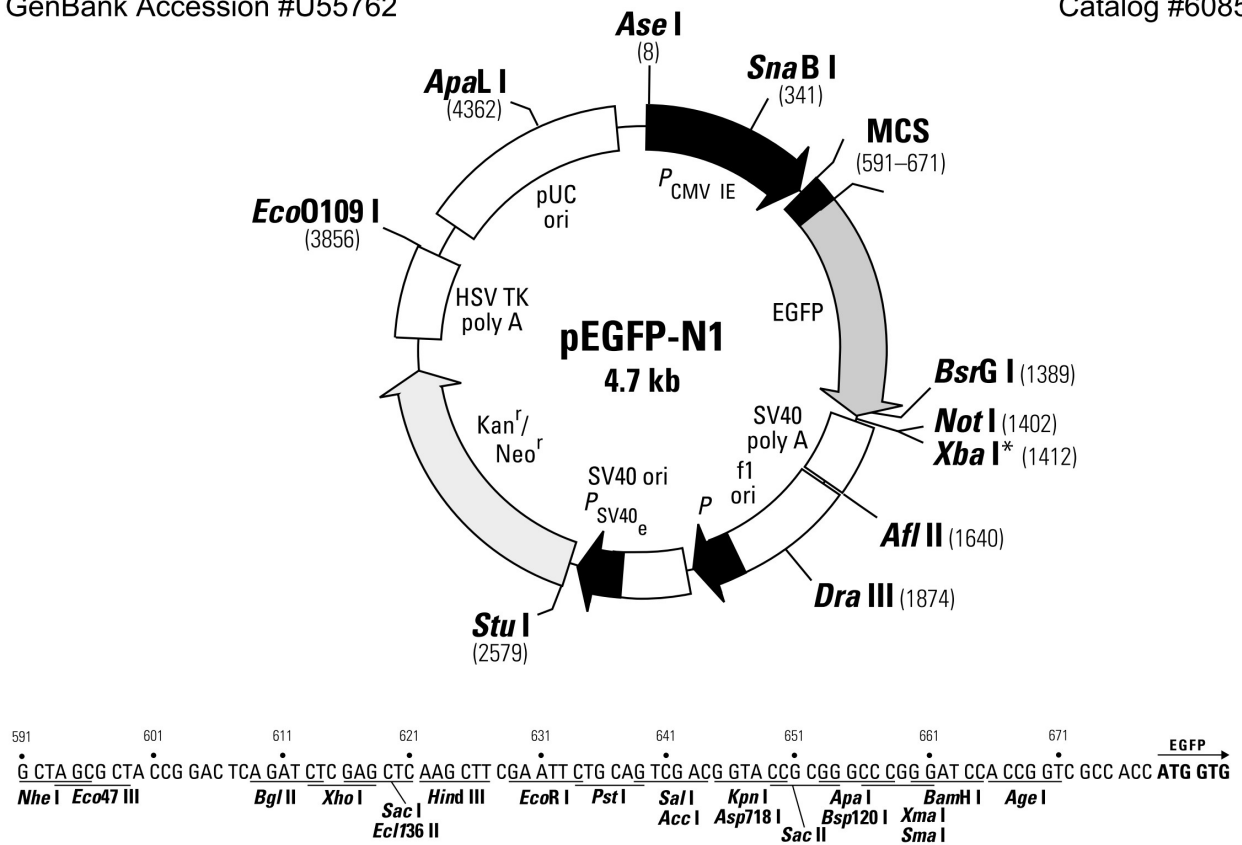
9.2 Vektoren

pEGFP-N1 Vector Information

GenBank Accession #U55762

PT3027-5

Catalog #6085-1



Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pEGFP-N1 Vector. (Unique restriction sites are in bold.) The *Not I* site follows the EGFP stop codon. The *Xba I* site (*) is methylated in the DNA provided by CLONTECH. If you wish to digest the vector with this enzyme, you will need to transform the vector into a *dam⁻* and make fresh DNA.

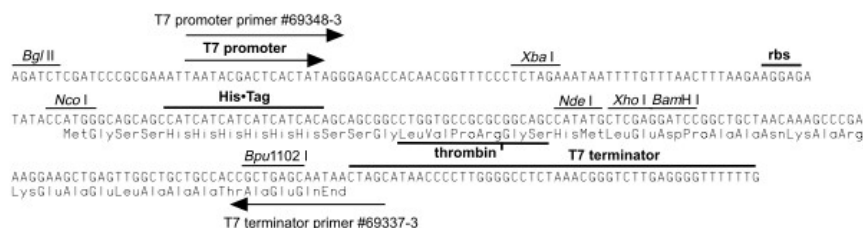
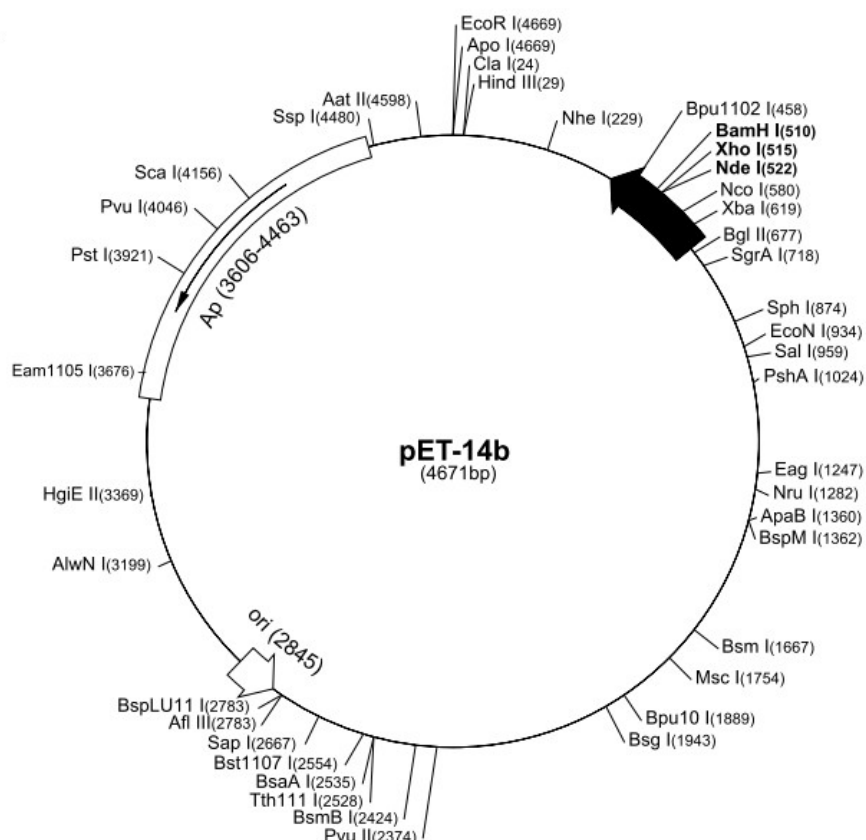
pET-14b Vector

TB044 12/98

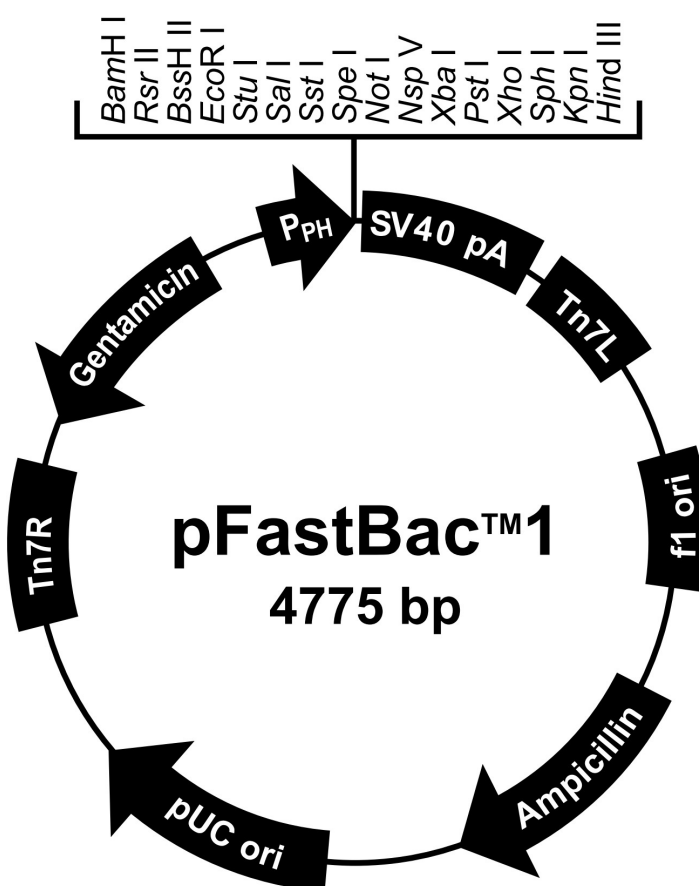
The pET-14b vector (Cat. No. 69660-3) carries an N-terminal His•Tag® sequence followed by a thrombin site and three cloning sites. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below.

pET-14b sequence landmarks

T7 promoter	646-662
T7 transcription start	645
His•Tag coding sequence	554-571
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	510-526
T7 terminator	404-450
pBR322 origin	2845
<i>bla</i> coding sequence	3606-4463



pET-14b cloning/expression region



Comments for pFastBac™1
4775 nucleotides

f1 origin: bases 2-457

Ampicillin resistance gene: bases 589-1449

pUC origin: bases 1594-2267

Tn7R: bases 2511-2735

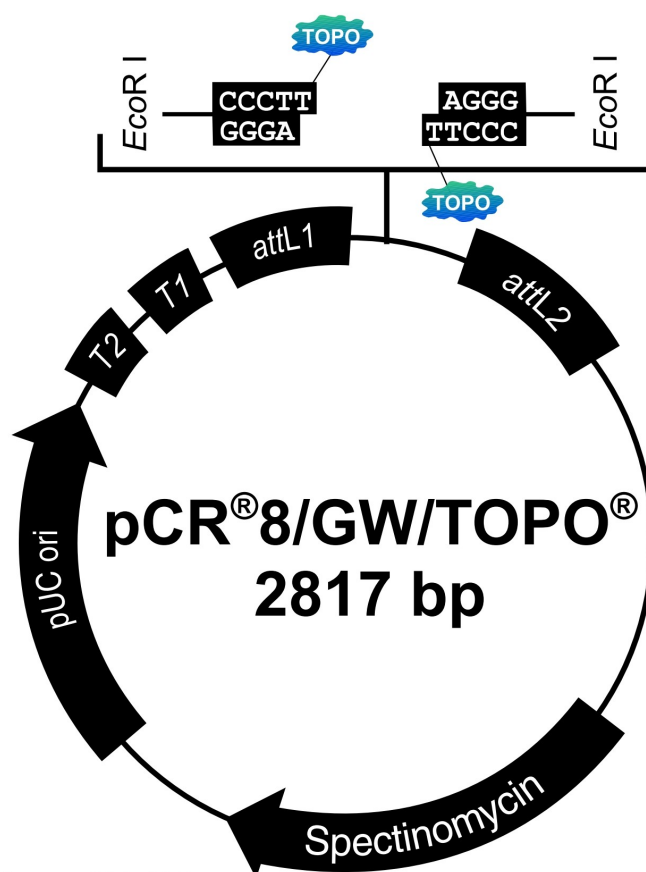
Gentamicin resistance gene: bases 2802-3335 (complementary strand)

Polyhedrin promoter (P_{PH}): bases 3904-4032

Multiple cloning site: bases 4037-4142

SV40 polyadenylation signal: bases 4160-4400

Tn7L: bases 4429-4594



**Comments for pCR®8/GW/TOPO®
2817 nucleotides**

rrnB T2 transcription termination sequence: bases 268-295

rrnB T1 transcription termination sequence: bases 427-470

M13 forward (-20) priming site: bases 537-552

attL1: bases 569-668

GW1 priming site: bases 607-631

TOPO® recognition site 1: bases 678-682

TOPO® recognition site 2: bases 683-687

attL2: bases 696-795

GW2 priming site: bases 733-757

T7 Promoter/priming site: 812-831 (c)

M13 reverse priming site: bases 836-852

Spectinomycin promoter: bases 930-1063

Spectinomycin resistance gene (*Spn*^R): 1064-2074

pUC origin: bases 2141-2814

(c) = complementary sequence

Tabelle 19: Mit ALS assoziierte Gene

Gen	Locus	Protein & Funktion	Besonderheiten	Referenz
<i>SOD1</i>	<i>21q22.11</i>	<i>SOD1</i> ; Dismutase von Superoxid Radikalen	• Vererbung überwiegend autosomal dominant • über 160 bekannte Mutationen • Mutationen hauptsächlich in fALS aber auch in sALS Fällen nachgewiesen • heterogener Verlauf bei einzelnen Patienten • Mutationen lösen ALS über eine neu erworbene toxische Eigenschaft des Proteins, nicht über eine verminderte Dismutaseaktivität aus	(Rosen et al., 1993; Jones et al., 1994; Aguirre et al., 1999)
<i>Alsin</i>	<i>2q33.2</i>	<i>Alsin</i> ; Rab 5 und Rac 1 Guanin Nukleotid Austausch Faktor	• Vererbung autosomal rezessiv • nur in fALS Fällen nachgewiesen • Ausbruch der Krankheit in juvenilem Alter	(Hentati et al., 1994; Hosler et al., 1998)
<i>SETX</i>	<i>9q34.13</i>	<i>Senataxin</i> ; DNA/RNA Helikase, RNA Prozessierung	• Vererbung autosomal dominant • Mutationen treten hauptsächlich in fALS aber auch in wenigen sALS Fällen auf • Ausbruch der Krankheit in juvenilem Alter	(Chen et al., 2004; Zhao et al., 2009)
<i>FUS</i>	<i>16p11.2</i>	<i>Fused In Sarcoma (FUS)</i> ; DNA/RNA bindendes Protein	• Vererbung autosomal rezessiv • Mutationen in sALS und fALS Fällen nachgewiesen • Verbindung zu frontotemporaler Demenz (FTD)	(Belzil et al., 2009; Kwiatkowski et al., 2009)
<i>VAPB</i>	<i>20q13.33</i>	<i>Vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein B (VAPB)</i> ; Teil des <i>SNARE</i> Protein-komplexes in Vesikeln	• Vererbung autosomal dominant • Mutationen in sALS und fALS Fällen nachgewiesen	(Nishimura et al., 2004; Kirby et al., 2007)
<i>DCTN1</i>	<i>2p13</i>	<i>Dynactin</i> ; Protein des axonalen Transports	• Mutationen der p150^{Glued} Untereinheit führen zu fALS • Vererbung autosomal dominant	(Puls et al., 2003; Münch et al., 2004, 2005)

Tabelle 19: Mit ALS assoziierte Gene - Fortsetzung

Gen	Locus	Protein & Funktion	Besonderheiten	Referenz
<i>TARDPB</i>	<i>1p36.22</i>	<i>TAR DNA binding protein (TDP-43);</i> DNA/RNA bindendes Protein, Regulationsprotein des RNA Spleißens	• Mutationen in sALS und fALS Fällen nachgewiesen • Verbindung zu frontotemporaler Demenz (FTD)	(Neumann et al., 2006; Dickson et al., 2007; Daoud et al., 2009)
<i>ANG</i>	<i>14q11.1</i>	<i>Angiogenin;</i> Angiogenese, Ribonuklease Aktivität; stimuliert rRNA Transkription	• Mutationen in sALS und fALS Fällen nachgewiesen • Risikofaktor für ALS	(Greenway et al., 2004, 2006)
<i>FIG4</i>	<i>6q21</i>	<i>FIG4 (SAC3);</i> Lipidphosphatase, Regulation des Signalpeptids endosomaler Vesikel Phosphatidylinositol PI(3,5)P ₂	• Mutationen führen zu einer schweren Form der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT4J) • Mutationen in einigen wenigen ALS Fällen nachgewiesen	(Chow et al., 2009)
<i>OPTN</i>	<i>10p13</i>	<i>Optineurin;</i> Aufrechterhaltung des Golgi Komplexes, Membrantransport, Exocytose; Inhibition der NFκB Aktivierung	• Mutationen in sALS und fALS Fällen nachgewiesen • Vererbung autosomal dominant und rezessiv	(Maruyama et al., 2010; Belzil et al., 2011; Del Bo et al., 2011; van Blitterswijk et al., 2011)
<i>C9ORF72</i>	<i>9p21.2</i>	<i>nicht kodierend</i>	• Assoziation der Wiederholungsrate der Sequenz GGGGCC mit ALS einhergehend mit frontotemporaler Demenz (FTD) • in sALS und fALS Fällen nachgewiesen • mit 23,5 % die häufigste genetische Abnormalität bei ALS	(Hosler et al., 2000; DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011)
<i>UBQN2</i>	<i>Xp11.21</i>	<i>Ubiquilin 2, ubiquitin-like protein 2;</i> Regulation der Degradation von ubiquitinierten Proteinen	• Vererbung X-chromosomal dominant • Mutationen mit ALS einhergehend mit Demenz assoziiert • Mutationen in sALS und fALS Fällen nachgewiesen • Störung des Ubiquitin/Proteasom-systems nachgewiesen	(Deng et al., 2011; Daoud and Rouleau, 2011)

Tabelle 19: Mit ALS assoziierte Gene - Fortsetzung

Gen	Locus	Protein & Funktion	Besonderheiten	Referenz
SMN1/2	5q13.2	<i>Survival Motor Neuron Protein 1/2</i> ; RNA Prozessierung, an der Zusammensetzung von snRNPs beteiligt	• Deletionen und Mutationen sind mit Spinaler Muskelatrophie (SMA) assoziiert • abnormale Kopienanzahl von SMN1 gilt als Risikofaktor für ALS	(Corcia et al., 2002, 2006; Veldink et al., 2005)
NEFH	22q12.1-q13.1	<i>Neurofilament (schwere Untereinheit)</i> ; Intermediärfilament in Neuronen, Komponente des Zytoskeletts	• C-terminale Deletionen der schweren Untereinheit gelten als Risikofaktor für ALS	(Figlewicz et al., 1994; Meyer and Potter, 1995; Vechio et al., 1996; Al-Chalabi et al., 1999)
PRPH	12q12	<i>Peripherin</i> ; Intermediärfilament in Neuronen,	• verstärkte Expression und Aggregation in sALS und fALS Fällen beobachtet • Risikofaktor für ALS	(Gros-Louis et al., 2004; Leung et al., 2004; Xiao et al., 2006)
ATXN2	12q23-q24.1	<i>Ataxin-2</i> ; RNA Prozessierung, Interaktion mit TDP-43	• repetitive Polyglutaminsequenz führt zu Spinocerebellärer Ataxie • Polyglutaminlänge mit verstärkter Toxizität von TDP-43 assoziiert • Risikofaktor für ALS	(Elden et al., 2010; Lee et al., 2011)
PON1	7q21.3	<i>Paraoxonase</i> ; Hydrolyse (Detoxifikation) von Phosphorsäureestern (u.a. Pestizide und Nervengase)	• Polymorphismen gelten als Risikofaktor für sALS • Ausbruch der Krankheit mit Pestiziden assoziiert	(Saeed et al., 2006; Slowik et al., 2006; Androusooulos et al., 2011)
VCP	9p13	<i>Valosin-Containing Protein</i> ; Beteiligung an Ubiquitin-abhängiger Proteindegradation	• Mutationen mit Frontotemporaler Demenz (FTD), Einschlusskörpermyositis und Morbus Paget assoziiert • Mutationen in wenigen fALS Fällen nachgewiesen	(Johnson et al., 2010)
DAO	12q24	<i>D-Amino Acid Oxidase</i> ; Regelung der Spiegel von D-Serin	• Mutationen in fALS Fällen nachgewiesen • Mutationen mit der Bildung ubiquitinerter Aggregate und der Anreicherung von D-Serin assoziiert	(Millecamps et al., 2010; Mitchell et al., 2010)

Tabelle 19: Mit ALS assoziierte Gene - Fortsetzung

Gen	Locus	Protein & Funktion	Besonderheiten	Referenz
VEGFA	6p12	<i>Vascular endothelial growth factor</i> ; Wachstumsfaktor, neurotropher Faktor, Angiogenese, Vaskulogenese	• Expression wird durch Hypoxie induziert • Polymorphismen, die die Induktion von VEGFA verhindern könnten gelten als Risikofaktor für sALS	(Oosthuysen et al., 2001; Brockington et al., 2005; Chen et al., 2007)

9.3 Lebenslauf

9.4 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

Anna Weichert

9.5 Danksagung