

## Metaalvrije superoxide dismutase vormt oplosbare oligomeren in de fysiologische omstandigheden: Een mogelijk algemeen mechanisme voor familiale ALS.

Lucia Banci<sup>†</sup>, Ivano Bertini<sup>†</sup>, Armando Durazo<sup>§</sup>, Stefania Girotto<sup>\*</sup>, Edith Butler Gralla<sup>§</sup>, Manuele Martinelli<sup>†</sup>, Joan Selverstone Valentine<sup>‡§¶</sup>, Miguela Vieru<sup>¶</sup>, and Julian P. Whitelegge<sup>¶\*</sup>

<sup>†</sup>Magnetic Resonance Center (CERM) and Department of Chemistry, University of Florence, and <sup>‡</sup>FiorGen Foundation, Via Luigi Sacconi 6, 50019 Sesto Fiorentino, Italy; and <sup>§</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, <sup>\*</sup>Semel Institute for Neuroscience and Human Behavior, David Geffen School of Medicine, <sup>¶</sup>The Molecular Biology Institute, and <sup>¶</sup>The Brain Research Institute, University of California, Los Angeles, CA 90095

Contributed by Joan Selverstone Valentine, May 8, 2007 (sent for review March 13, 2007)

Amyotrofische Laterale Sclerose (ALS) is een progressieve neurondegeneratieve ziekte die selectief motorneuronen beïnvloedt; 90% van de totale gevallen zijn sporadisch, maar 2% wordt geassocieerd met veranderingen in de gencodage voor anti-oxyderende enzymen koper-zink superoxide dismutase (SOD1). De doodsoorzaken van de motorneuronen in ALS zijn in het algemeen slecht begrepen, maar voor SOD1 familiale ALS, is oligomerization van SOD1 mutantproteïnen sterk betrokken. In dit werk, tonen wij aan dat het wild-type menselijke SOD1, wanneer het niet heeft van beide metaalionen, grote, stabiele, oplosbare eiwitoligomeren met een gemiddelde moleculaire massa van  $\approx 650$  kDa onder fysiologische voorwaarden, d.w.z., 37°C, pH eiwitconcentratie 7.0, en 100  $\mu$ M vormt. Verder toont men hier dat de intermoleculaire bisulfidebanden tijdens oligomerization worden gevormd en dat cys-6 en cys-111 worden betrokken bij het plakken. De vorming van oplosbare oligomeren werd door hun capaciteit gecontroleerd om de fluorescentie van thioflavin T, een benzothiazolekleurstof te verbeteren die in fluorescentieintensiteit op het binden aan amyloid vezels, en door verstoring van deze band op toevoeging van het chaotropic agent guanidine waterstofchloride stijgt. Onze resultaten stellen een algemeen, verenigend beeld van SOD1 samenvoeging voor dat kan werken wanneer wild-type of mutant SOD1 de proteïnen hun metaalionen niet hebben. Hoewel wij andere mechanismen in SOD1 familiale ALS niet kunnen uitsluiten, hier voorgesteld heeft de sterkte van het verklaren van hoe een grote en diverse reeks SOD1 mutantproteïnen allen tot ziekte kon leiden door het zelfde mechanisme.

*amyloid / amyotrofische lateraal sclerose van de neurodegeneratie / eiwitsamenvoeging / het eiwit misfolding*

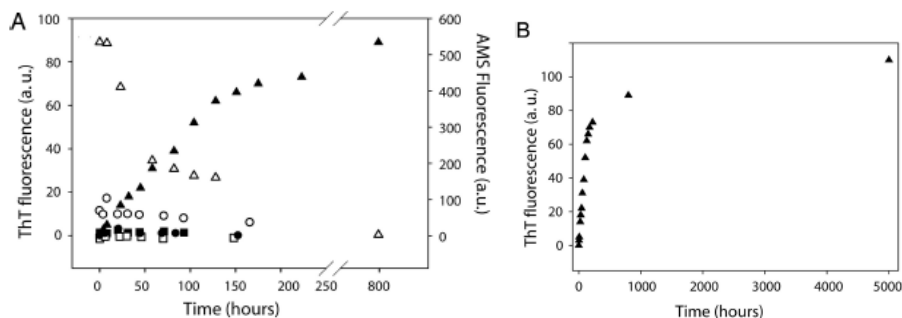
Eiwit oligomerization, de samenvoeging, en de vorming van onoplosbare amyloid stortingen worden algemeen waargenomen in neurondegeneratieve ziekten, maar de factoren die de abnormale eiwit-interactie in werking stellen die tot oligomerization leiden, blijven ontwijkend. De ionen van het metaal zijn vaak betrokken bij deze fenomenen, maar hoe precies zij geïmpliceerd zijn blijft onduidelijk. Meer dan 114 verschillende varianten van menselijke koper-zink superoxide dismutase ( $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD1}$ ) zijn verbonden met de neurondegeneratieve ziekte familiale ALS (FALS) door een aanwinst-van-functie mechanisme. Hoewel de nauwkeurige cellulaire plaatsen en de mechanismen van giftigheid onbekend zijn, is het afwijkende SOD1 eiwit sterk betrokken bij deze ziekte. Verscheidene recente publicaties hebben dwingend bewijsmateriaal dat het abnormale bisulfide cross-linking van ALS mutant SOD1 een rol in dit oligomerization speelt, en bisulfide-verbonden SOD1 multimers zijn ontdekt in neurale weefsels van transgenetische muizen voorgelegd SOD1-ALS die om componenten van hoog-moleculair-gewichtsoorten of tussenpersonen in hun vorming worden verondersteld te zijn. Het wild-type (WT) menselijke SOD1 is een uitzonderlijk stabiele proteïne in zijn holovorm en, hoewel enkele ALS-Mutant SOD1 de proteïnen streng door hun veranderingen destabiliseren, behouden anderen grotendeels stabiliteit of WT SOD1. In demetallated volledig (apo) de staten, enkele ALS-Mutant SOD1 proteïnen eigenlijk zijn stabiel dan apoWT SOD1. Het WT menselijke SOD1 bevat vier cysteïnes, cys-6, cys-57, cys-111, en cys-146. In rijp proteïne, een bisulfideband, een structurele eigenschap die voor een intracellulair proteïne die in het hoogst verminderende milieu van de cel ongebruikelijk is, verbindingen cys-57 en cys-146.

De abnormale eiwitopneming is waargenomen in neurale weefsels van de meeste SOD1-ALS transgenetische muismodellen, en men heeft in diverse gevallen getoond dat deze opneming amyloïd-ALS is, gebaseerd op hun reactiviteit met fluorescente kleurstoffen die worden gebruikt om de amyloïd opneming in hersenen van de patiënten van Alzheimer te visualiseren. Enkele van geïsoleerde ALS SOD1 proteïnen zijn oligomere *in vitro* veroorzaakt om complexe amyloïd-ALS te vormen, maar de voorwaarden die in elk geval worden gebruikt waren verre van fysiologisch, d.w.z., of zeer lage pH of uitgebreide metalcatalyzeerde oxydatie, voorstellend dat oligomerisatie slechts voorkwam als de SOD1 proteïne wezenlijk beschadigd of geopend was.

De huidige studie werd ondernomen om de tendens voor oligomerisatie van bisulfide-intact, WT menselijke SOD1 in de vrij milde omstandigheden te bepalen die waarschijnlijk zal ontmoet worden door eiwit levend en de rol van metallatie in het belemmeren van of het bevorderen van dergelijke oligomerisatie. Wij rapporteren dat menselijke SOD1 apoproteïne van het WT, met zijn intacte banden van het intrasubunitbisulfide, oplosbare thioflavine T (ThT) - positief, hoog-moleculair gewicht oligomere assemblage zeer op incubatie in oplossing bij voorwaarden dicht bij fysiologisch, d.w.z., bij pH 7.0, 37°C, en bij typische cellulaire concentraties vormt; dat deze assemblage opmerkelijk stabiel is, voortdurend in de oplosbare staat voor maanden; dat zij door noncovalente eiwit- interactie worden verbonden en verder gestabiliseerd door intermoleculaire bisulfide-band het impliceren van cys-6 en cys-111 cross-links; en dat metallatie met koper en zink, of zelfs met alleen zink, onderdrukt dit oligomerisatie totaal. Deze resultaten wijzen erop dat de metaal-vrije menselijke SOD1 proteïne van het WT aan samenvoeging onder vrij mild naar voren gebogen is voorwaarden, zelfs wanneer de band van het intrasubunitbisulfide intact is, voorstellend dat de aanwinst van giftige functie van SOD1 in ALS, en misschien zelfs in sporadische ALS (SALS), kan betrekking gehad hebben op het onvermogen van deze proteïne om te bereiken of te handhaven.

## RESULTATEN

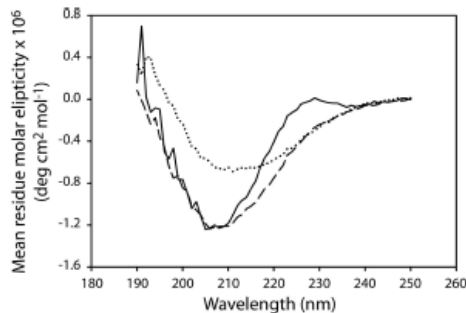
SOD1 is geschat aanwezig te zijn in cellen bij concentraties van  $\approx 100 \mu\text{M}$  (15-17). Om de voorwaarden zo dicht mogelijk na te bootsen die door eiwit levend worden ervaren, bereidden wij 100 eiwitoplossingen  $\mu\text{M}$  bij pH 7.0 voor en broedden hen bij veranderingen 37°C. In de secundaire structuur werden ze gecontroleerd door de CD spectroscopie, en de graad van oligomerisatie staat werd gecontroleerd door gel-filtratie chromatografie en fluorescentie van ThT, een benzothiazole kleurstof die verhogingen van fluorescentie intensiteit op het binden aan amyloïd vezels toont. De oplossingen van volledig metallated  $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD1}$  waren onveranderd na incubatie bij 37°C meer dan 1 maand, en hetzelfde was waar voor het koper-vrije derivaat,  $\text{E}_2\text{Zn}_2\text{SOD1}$  (E duidt leeg aan). In tegenstelling, het gedrag van de volledig uitgeputte proteïne was dramatisch verschillend. Uitgebroed en in aanwezigheid van ThT, toonde het een progressieve verhoging van fluorescentie, met een snel proces in eerste 230 h van incubatie, dat na 1 maand vertraagde en toen een plateau in de volgende 4 maanden bereikte (Fig.1). Geen troebelheid werd ontdekt tijdens de volledige tijdsduur.



**Fig. 1.** De vorming van ThT-Bindende structuren komt gelijktijdig met verdwijning van vrije cysteïnes voor wanneer apo SOD1 bij (a) Verlaten als 37°C. wordt uitgebroed: Fluorescentie die door ThT wordt die bindt aan SOD1 veroorzaakt [die als willekeurige eenheden (a.u. wordt voorgesteld)]

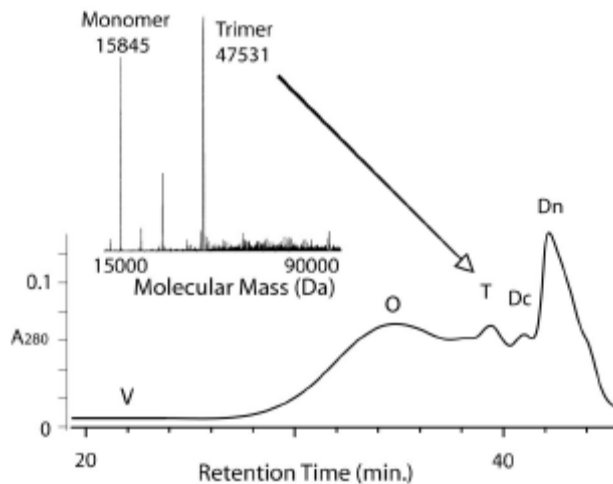
want SOD1 (●), volledig apo SOD1 (▲), koper-vrij SOD1 (○), apo ALS SOD1 (□), metallated en volledig ALS SOD1 (■) tijdens de incubatie van de steekproeven bij Juiste as 37°C. metallated: De fluorescentie of AMS bound to van Change in vrije cysteines van de steekproef van het apoSOD1 WT (Δ) tijdens zijn incubatie bij (b) thT-Bindende fluorescentie 37°C. van de apoSOD1 eiwit meer dan 7 maanden van incubatie.

De opsporing van bindende ThT fluorescentie is een duidelijke aanwijzing van de vorming van oligomeric assemblage, en het heft de mogelijkheid dat deze op assemblage structurele eigenschappen met amyloid kan delen. Het tarief van ThT fluorescentieverhoging hing sterk van temperatuur af: hoe hoger de temperatuur, hoe sneller het tarief van samenvoeging. De verschillende pH voorwaarden beïnvloedden ook de reactie: alle andere dingen die gelijk zijn, het tarief verdubbelden bij pH 5 met betrekking tot pH 7. Deze verhoging van tarief kan aan de verminderde repulsieve negatieve last toe te schrijven zijn aangezien de oplossing pH p<sub>i</sub> van de proteïne nadert.



**Fig. 2.** CD analyse. CD spectrums van metallated de proteïne van het WT SOD1 (—), volledig het apoWT SOD1 (- - -), en de bijeengevoegde soorten die van de chromatografische kolom van het uitgebreede apoWT SOD1 (.....) worden uitgewassen. Het hogere percentage van  $\beta$  secundaire structuur in de steekproef van het apoWT SOD1 na incubatie wordt blijk gegeven van door de verhoogde bijdrage tot het algemene CD spectrum van de negatieve band bij 218 NM, die van  $\beta$ -sheetstructuur kenmerkend is.

Na incubatie van 5 dagen of meer bij 37°C, toonden de apoSOD1 steekproeven bij pH 7 een heterogene bevolking van staten voor SOD1, gaande van dimeer tot een brede band van hoog-molecuul gewichtsoorten, zoals die door gel-filtratie chromatografie wordt getoond. De analyse van de fracties door zich multiangle licht-te verspreiden toonde aan dat de brede hoog-molecuul gewichtband uit een mengsel van soorten bestond die een gemiddeld molecule gewicht hebben dat met de incubatietijd steeg. Na 7 maanden van incubatie, strekte de moleculaire massa zich tussen 430 en 750 kDa, met een gemiddelde waarde van  $\approx$ 650 kDa (SOD1 monomeren  $\approx$ 25-45) uit. De CD analyses van de hoog-molecuul gewichtsfraction wijzen erop dat de oligomeric assemblage een beduidend hoger percentage (58%) van  $\beta$  secundaire structuur dan de vers voorbereide apo steekproef heeft (39%) (Fig.2). Het oligomeric materiaal zelf, hoewel duidelijk oplosbaar, ioniseerde niet in de spectrometrie van de electrospray-ionisatiemassa (esi-MS) onder het denatureren, non-reducing voorwaarden. Nochtans, werden de covalente SOD1 dimeer en de trimeer ontdekt, wat van covalente tussenpersonen die in worden gevormd suggestief was aanvankelijke stadia van samenvoeging (Fig.3). Toevoeging van de verminderende agent DTT aan alle experimentele steekproeven en aan de controles, die door analyse in dezelfde omstandigheden wordt de gevolgd, resulteerde in de verschijning van een sterk signaal voor monomeric SOD1 en de verdwijning van de signalen die voor om het even welke hoog-ordesoorten voorstellen, dat de intermoleculaire bisulfidebanden structureel zijn bezit van de complexen. Deze conclusie wordt gesteund verder door de observaties dat de incubatie van apoWT SOD1 in aanwezigheid van een verminderende agent, het waterstofchloride of van de tris (2-carboxyethyl) fosfine (TCEP) of DTT, in geen verbeterde fluorescentie in aanwezigheid van ThT resulteerde en slechts de monomeric staat door gel-filtratie chromatografie werd waargenomen, zoals wordt verwacht voor bisulfide-verminderde apo SOD1.



**Fig. 3.** Grootte-uitsluiting chromatografie en massa spectrometrische opsporing van covalente oligomeren van WT SOD1 tijdens samenvoeging. De sizeexclusionchromatografie werd van Nondenaturating gebruikt om een steekproef van SOD1 apoproteïne na een incubatie van 5 dagen bij 37°C te analyseren. De steekproef stelt een brede gecentreerde piek tentoon ≈34 min, dat aan een moleculaire massa van ≈400 kDa (geëtiketteerd O, oligomer), met meekunde suggestief van een heterogene waaier van soorten, zo groot wat zoals 1 MDa. Het nietige volume wordt geëtiketteerd V. Control SOD1 is met twee delen (42 min, niet getoond chromatogram), en een bevolking wordt gezien in de steekproef van 5 dagen (geëtiketteerd Dn, noncovalent dimeer). De steekproef van 5 dagen toont ook bewijsmateriaal van middenabsorberingspieken bij 39 min (geëtiketteerd T, trimeer) en 40 min (geëtiketteerd Gelijkstroom, covalent dimeer) die tussenpersonen in het oligomerization proces zouden kunnen zijn. De fracties (O, T, Gelijkstroom, en Dn) werden later geanalyseerd door ESI-MS in het denatureren de omstandigheden vóór of na vermindering. Het ESI massaspectrum dat in nonreducing het denatureren omstandigheden wordt geregistreerd die een covalente trimeric vorm van SOD1 van de 39 min fractie hierboven tonen. Getoond wordt het covalente profiel van de molecule na het nul-last ontrollen met monomeric en trimeric vormen van de proteïne. De vermindering van alle vier fracties (O, T, Gelijkstroom, en Dn) resulteert in opsporing van monomeric slechts soorten.

De inhoud van vrij-cysteïne in apo SOD1 kan door veranderingen in de zure fluorescentie 4 acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonate (van AMS) bij de zijn wijziging van vrije thiol worden gecontroleerd.

Vers voorbereid heeft SOD1 twee vrije cysteïnes per monomeer. Het aantal vrije thiol werd waargenomen om gelijktijdig met eiwitsamenvoeging (die door ThT fluorescentie wordt gecontroleerd) te verminderen (Fig. 1), met de twee processen na de zelfde tijdscursus: zij zijn aanvankelijk snel, en zij hoofdzakelijk plateau na 9 tot 10 dagen. Toen twee vrije cysteïnes tot noncysteïneresidu's werden veranderd, of als enige veranderingen (niet getoonde gegevens) of als dubbele verandering (C6A/C111S SOD1, hierna wordt geroepen die ALS SOD1) (Fig. 1), werd geen gezamenlijke vorming waargenomen tijdens incubatie; slechts werden de soorten met twee delen ontdekt, zelfs daarna 7 maanden van incubatie. Dit gedrag is een demonstratie van de betrokkenheid van zowel twee vrije cysteïnes, cys-6 als cys-111, in het mechanisme van samenvoeging, door vorming van bisulfidebanden. De gegevens over deze SOD1 mutanten wijzen verder erop dat bisulfidecysteïnes, cys-57 en cys-146, niet in de initiatie van oligomer vorming hoeven te worden geïmpliceerd.

De betrokkenheid van cys-6 en cys-111 in het bevorderen van oligomerization van SOD1 werd ook blijk gegeven van in het uitdruggingsgedrag van WT en de mutant SOD1 in *Escherichia coli*, waar SOD1 hoofdzakelijk in wordt geproduceerd demetallated vorm. Het WT SOD1 en een groot aantal verwante SOD1 mutantproteïnen die zowel cys-6 als cys-111 bevatten, werden altijd gehaald in de onoplosbare fractie tenzij de hoge concentraties van verminderende agent werden toegevoegd. Door contrast, toen cys-6 en/of cys-111 werden veranderd, werd SOD1 gevonden in de oplosbare fractie na cel osmotische schok (21), voorstellend die WT en ALS SOD1 mutantenvorm bisulfide-verbonden oligomeren ook *in vivo* demetallated, maar slechts wanneer zowel cys-6 als cys-111 aanwezig zijn.

Wanneer het chaotropic agentenguanidine waterstofchloride (Gdn-HCl), dat waterstofband netwerken onderbreekt die eiwit secundaire en tertiaire structuren stabiliseren, werd toegevoegd aan een oplossing van oplosbare stof oligomerized apoWT SOD1, werd de fluorescentie ThTbinding gedoofd in 15 min, terwijl de gelfiltratie van de resulterende

oplossing aantoonde dat de hoog-molecuul gewichtsoorten nog aanwezig waren. Wij schrijven het verlies van thT-bindende capaciteit aan verstoring van de tertiaire structuur van de assemblage toe; wij schrijven ook het feit dat de toe SOD1 oligomeric staat aan covalente SOS banden tussen cysteïnes van de SOD1 subeenheden, voortduurt zo ook wat in de analyse van esi-MS werd waargenomen in het denatureren aan de omstandigheden.

## BESPREKING

Menselijke SOD1 wordt gekenmerkt door een ongebruikelijke combinatie van structurele eigenschappen: een sterke homodimeric quaternaire structuur; een acht-vastgelopen  $\beta$ -barrel motief in elke subeenheid; sterk intrasubunit bisulfideband tussen een hoogst behouden paar cysteïnes, namelijk cys-57 en cys-146; de aanwezigheid van metaalionen (koper en zink) met specifieke structurele en enzymatische rollen; en twee vrije cysteïnes per subeenheid (cys-6 en cys-111). De rijping van het levende eiwit, om de correct gevouwen quaternaire structuur en de enzymatische activiteit te bereiken, vereist vorming van de bisulfideband, dimerization, en de aanwinst van koper en zinkionen. Het gebrek aan één of meer van deze eigenschappen heeft een belangrijke invloed op de eigenschappen van SOD1. Bijvoorbeeld, apoproteïen met twee delen is intact wanneer de bisulfideband, maar het monomeric wordt verminderd wanneer de bisulfideband. Door contrast, is de bisulfide-verminderde SOD1 proteïne met twee delen wanneer de zinkionen zijn verbindend. Onze resultaten, beschreven hier, aantonen dat SOD1 apoproteïen met twee delen, zelfs met zijn intacte banden van het intrasubunitbisulfide, een duidelijke tendens heeft om oplosbare highmolecular- te vormen gewichts oligomeren in de omstandigheden zeer dicht bij fysiologisch. Dit oligomerization komt *in vitro* evenals *in vivo* in *E. coli* voor, op voorwaarde dat cys-6 en cys-111 aanwezig zijn. De vormen van Metallated van de SOD1 proteïne niet oligomerize in dezelfde omstandigheden.

Hoewel de afwezigheid van metaalionen in apo SOD1 proteïne duidelijk een belangrijke factor is die de tendens van de proteïne bepaalt, speelt de vorming van intermoleculaire bisulfidebanden ook een belangrijke rol, zoals die door het ontbreken van samenvoeging van apoproteïen onder het verminderen van voorwaarden wordt aangetoond. Interessant, is de bisulfide-band betrokkenheid in de vorming van amyloid fibrillen eerder gemeld voor andere neurondegeneratieve ziekten. In SOD1, identificeren wij cys-6 en cys-111 verantwoordelijk voor dit proces omdat de enige puntverandering van één van beide één van hen samenvoeging verhindert. Wij stellen daarom een mechanisme van samenvoeging op waarin apo SOD1 proteïne, die gekend en hoogst flexibel om destabiliseren wegens het gebrek aan metaalionen is, een brede waaier van conformations kan bemonsteren, wat waarvan veroorzaken dat twee vrije cysteïnes worden blootgesteld aan het oplosmiddel. Het is namelijk eerder getoond in een gebouwd SOD1 monomeer, dat kunstmatig door twee veranderingen bij de subeenheid interface wordt gestabiliseerd, dat de afwezigheid van metalen, en in het bijzonder van het structureel metaalzink, de proteïne om vrij mobiel veroorzaakt te zijn en dat verscheidene lijnen, met inbegrip van lijn IV en elektrostatische lijn VII, door een gesmolten druppeltjestaat worden gekenmerkt binnen wie een vrij brede waaier van conformations wordt bemonsterd. Deze flexibiliteit zou moeten twee vrije cysteïnes met betrekking tot met twee delen meer solventaccessible maken, metallated vorm. Zodra vrije cysteïnes oplosbaar-toegankelijk zijn, hoog-molecuul gewicht kunnen oligomeren gemakkelijk door bisulfide-band vorming en noncovalent interactie tussen  $\beta$ -sheets worden geassembleerd (Fig.4). Het is in dit stadium niet duidelijk of de stuwende kracht voor oligomerization hoofdzakelijk noncovalent eiwitinteractie, die dan verder door covalent bisulfide cross-linking worden gestabiliseerd, of het tegengestelde is. De band van ThT aan de oligomeric assemblage en hun verhoogd percentage van  $\beta$  secundaire structuur zijn verenigbaar met de mogelijkheid dat deze assemblage door waterstofbanden en elektrostatische interactie gelijkend op die samengehouden wordt die in amyloid fibrillen voorkomen. Echter, bij gebrek aan extra structurele informatie, blijft deze conclusie speculatief omdat de band ThT niet totaal specifiek voor amyloid is. Men zou ook moeten opmerken dat deze studie een kritieke rol voor zowel cys-6 als cys-111 in de initiatie van het

samenvoegingsprocédé en de intermoleculaire bisulfidevorming steunt en niet de mogelijkheid van verdere betrokkenheid van cys-57 en cys-146 via de reacties van de bisulfideuitwisseling uitsluit als samenvoegingsopbrengst.

De belangrijkste factoren in samenvoeging schijnen gebrek aan metalen en de aanwezigheid van vrije cysteïnes te zijn, factoren die in ALS mutantproteïnen kunnen worden verergerd. Een groot aantal verwante SOD1 mutanten heeft een verminderde metaalaffiniteit en, inderdaad, slagen sommigen zelfs *in vitro* er niet in om zich opnieuw samen te stellen. Ook voor WT, wordt de proteïne geproduceerd in een onrijpe vorm die dan verscheidene stappen vergt om de definitieve actieve vorm te bereiken. Onder de diverse posttranslational wijzigingen die SOD1 moet ondergaan, is metallation een complex proces dat verscheidene stappen en interactie met andere proteïnen impliceert. Begrijpen van het metaal zou door misregulation van om het even welk van deze stappen door externe factoren kunnen worden veranderd. Daarom wanneer één of andere SOD1 onrijp aanwezig is, demetallated staat, kon de samenvoeging beginnen, leidend tot amyloid-als oplosbare oligomeren. Wij moeten ook met het feit dat SOD1 in zowel cytoplasma als mitochondria aanwezig is, en dat rekening houden zijn metaalionen onafhankelijk in de twee celcompartimenten worden verworven. Deze twee celcompartimenten hebben vrij verschillende redoxeigenschappen die verder samenvoeging kon *in vivo* moduleren. Dit vinden is ook verenigbaar met een recente suggestie van Wang et al.: zij rapporteren dat non-native intermoleculaire bisulfidebanden helpen om de complexen *in vivo* te stabiliseren en dat de redoxstaat van de cel een rol in samenvoeging kan spelen.

Oligomeren die in deze studie worden waargenomen schijnen ons de waarschijnlijke oorzaak voor de giftige soorten te zijn voor SOD1 verbonden ALS. Het mechanisme dat hier voor SOD1 samenvoeging wordt besproken is vrij algemeen omdat het niet van een specifieke verandering afhangt. Het verstrekt een verenigd beeld van SOD1 oligomerization, evenals een systeem *in vitro* waarin om dit proces te bestuderen.

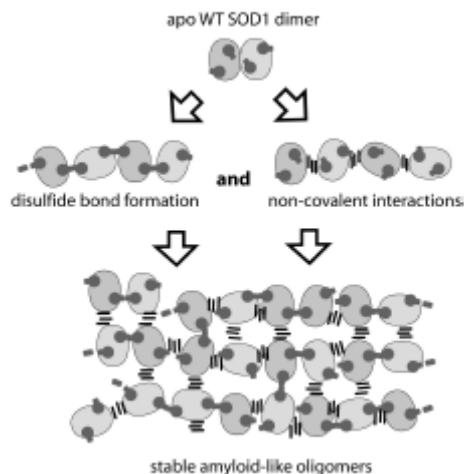


Fig. 4. Voorgesteld mechanisme voor SOD1 samenvoeging. Mogelijk mechanisme voor levende vorming van oplosbare oligomeren die voorkomt wanneer de proteïne apoWTSOD1 dicht bij fysiologische voorwaarden (37°C, 100 µM, en pH 7) voor een uitgebreide periode wordt gehouden. De donkergrijze vormen vertegenwoordigen vrije cysteïnes (cys-6 en cys-111), en de zwarte drietallen van parallelle staven vertegenwoordigen amyloid-als regelingen van waterstofbanden. Bij gebrek aan metaalionen, SOD1 de proteïnen vormen abnormale bisulfidekruisverbindingen en noncovalent verenigingen met andere SOD1 monomeren of dimeer.

## MATERIALEN EN METHODES

### De Voorbereiding van de steekproef.

Het WT SOD1, die in gist wordt uitgedrukt, werd gezuiverd in metallated volledig vorm. N<sup>α</sup>-acetylation (alanine) werd, zoals verwacht voor menselijke SOD1, bevestigd door massa spectrometrische analyse. Het WT SOD1 werd ook uitgedrukt in de spanning van *E. coli* BL21 (DE3) die in het middel van pond wordt gekweekt. De proteïne was geïsoleerd door osmotische schok in een 20 mM Tris/5 mM DTT buffer bij pH 8. Na incubatie voor 30 min bij

37°C, die door centrifugeren bij 165.000 x g voor 20 min worden gevolgd, werd de proteïne gezuiverd van de bovendrijvende substantie na een gemelde procedure die door de toevoeging van 1 mM DTT aan elke chromatografische buffer wordt gewijzigd. De proteïne verkreeg met deze substoichiometrische bevat procedure hoeveelheden metaalionen. De veranderingen werden uitgevoerd met een QuikChange plaats-geleide mutageneseuitrusting.

Demetallated (apo) proteïne werd voorbereid volgens eerder gepubliceerde protocollen. Reconstructie van het zink werd uitgevoerd. Inhoud van het metaal van de diverse vormen van SOD1 werd gecontroleerd door de inductief gekoppelde spectrometrie van de plasmamassa (icp-MS) gebruikend een ThermoAs Jarrell Atomscan 25 opeenvolgende inductief gekoppelde spectrometer.

### **Spectroscopische Karakterisering.**

De eiwit steekproeven waren 100 µM in SOD1 concentratie (als dimeer) in de buffer van het 20 mM fosfaat bij pH 7. De proteïne werd uitgedroogd bij 37°C om fysiologische voorwaarden na te bootsen. De optische en fluorescentiespectroscopie, die aan gel-filtratie chromatografie wordt gekoppeld, werd gebruikt om de vorming van oligomeric soorten bij deze steekproefvoorwaarden te controleren.

De ver-uv CD spectrums (190-250 NM) werden van SOD1 geregistreerd op een j-810 spectropolarimeter JASCO. Een cel met een weglengte van 1mM werd gebruikt voor de meting, en de parameters werden geplaatst als volgt: bandbreedte 2 NM; stap resolutie 1 NM; aftasten snelheid 20 nm/min; en reactietijd 2 s. Elk spectrum werd verkregen als gemiddelde van vier aftasten. De eiwitconcentratie was typisch ≈8-10 µM. Vóór de berekening van de gemiddelde residu maaellipticiteit, werden alle spectrums verbeterd door de bijdragen van de buffer af te trekken. De spectrums werden toen gladgemaakt door het aangrenzende het gemiddelde nemen van of het snelle transformfiltering van Fourier te gebruiken. De kwantitatieve schattingen van de secundaire structuurinhoud werden gemaakt door het DICROPROT softwarepakket te gebruiken.

De fluorescentie werd gevolgd met ThT, een kleurstof die zich aan amyloid-als structuren bindt. Vrije ThT heeft opwinding en emissiemaxima bij 350 en 450 NM, respectievelijk. Nochtans, op het binden aan amyloid-als oligomeren, veranderen de opwinding en de emissiegolflengten in 450 en 485 NM, respectievelijk. Vijftig -vijftig-fourmicroliter gedeelten van steekproef werden toegevoegd aan 646 µl van een oplossing 215 µM ThT in een buffer van het 20 mmfosfaat bij pH 7. De emissie van de oplossingsfluorescentie werd gemeten, in tijd van incubatie, met een Cary 50 (de spectrofotometer van de verduistering) geleverd met een eencellige Peltier thermostated celhouder die bij 37°C. wordt geregeld. Het achtergrondfluorescentiespectrum van de buffer werd afgetrokken. De opwindingsgolflengte was 446 NM (bandbreedte 10 NM), en de emissie werd geregistreerd bij 480 NM (bandbreedte 10 NM). Intensiteit van de fluorescentie bij 483 NM werd in kaart gebracht tegen de tijd van incubatie.

De troebelheid werd gemeten bij 400 NM om mogelijke vorming van onoplosbaar precipitaat te ontdekken. Troebelheid van de oplossing werd gemeten als duidelijke absorbering bij 400 NM door een uv-Zichtbare spectrofotometer Cary te gebruiken. De experimenten werden uitgevoerd door 120 µl van de incubatieSOD1 voorraad in 280 µl van de buffer van het 20 mmfosfaat bij pH 7 te verdunnen. Een cuvette van het 1 cmkwarts werd gebruikt, en de instrumentale opsporingsgrens bedroeg 0.001 400NM.

### **ESI-MS.**

SOD1 de steekproeven werden geanalyseerd door sizeexclusionchromatografie nondenaturating (G4000 SW; De Biologische wetenschappen van Tosoh, Tokyo, Japan; 20 van het kaliummm fosfaat, pH 7.0; 250 µl/min; 24°C). De fracties (50-100 µl) waren droog in

Savant SpeedVac en opnieuw opgelost in 10 µl van water. Voor te verminderen steekproeven, werden 0.33 M DTT toegevoegd (5 µl van de oplossing van 1 M in water), en de steekproeven werden uitgedroogd bij kamertemperatuur voor 15 min. Voor ESI-MS in het denatureren de omstandigheden, werden de zouthoudende steekproeven verdund met mierzuur (90 µl van 90% mierzuur; Het Wetenschappelijke, Eerlijke Gazon van de visser, NJ; ACS de reagensrang), vortexmixed voor 1 min, en spoot onmiddellijk op een HPLC systeem voor de online spectrometrie van de vloeibaar-chromatografiemassa in (lc-MS). Een gel-filtratie kolom [SW2000 XL; De Biologische wetenschappen van Tosoh; chloroform methanol/1% mierzuur in water, 4/4/1 (volume/volume/volume); 250 µl/min; 40°C] werd gebruikt aan desalt de steekproef en verstrekken hoogst het denatureren voorwaarden. Eluent van de kolom werd geleid aan een ionen-nevelbron van een spectrometer van de drievoudig-quadrupolemassa, die massaanauwkeurigheid van 0.01% opbrengt.

### **De Samenvoeging van de controle SOD1 door zich Filtratie en van het Gel licht-Te verspreiden.**

Één-honderd gedeelten van de uitgedroogde proteïne bij 37°C werden periodiek genomen en werden geanalyseerd door gelfiltratie op een Superdex de kolom van 75 u 10/30 bij kamertemperatuur. De kolom was preequilibrated met 20 van het kaliummm fosfaat (pH 7.0), en het stroomtarief was 0.6 ml/min. De chromatogrammen, die de soorten controleerden die tijdens incubatie worden gevormd, werden verkregen door de absorbering bij 280 NM te controleren. Superdex werd de kolom van 75 u 10/30 verbonden met een licht-zichverspreid spectrometer. De online multiangle licht-zichverspreid (MALS) detector en verschil brekings index (DRI) detector werd gebruikt om het licht te meten dat als functie van hoek en absolute eiwitconcentratie van fracties wordt verspreid uitwassend van grootte-uitsluiting chromatografiekolom. De benadering Zimm werd gebruikt in software Astra om maalmassa te schatten. De gegevens waren geschikt door een first-order veelterm te gebruiken. De analyse werd voor elk van de gedeelten 100-µl uitgevoerd die periodiek uit de incubatiepartij worden genomen om de verhoging van moleculegewicht oplosbare soorten te controleren die tijdens samenvoeging worden gevormd.

### **De Getalsmatige weergave van het vrij-thiol.**

De schatting van vrije thiol tijdens samenvoeging werd uitgevoerd door de wijziging van AMS. AMS heeft hoogte de water oplosbaarheid wordt en gemakkelijk vervoegd aan vrije thiol. Een steekproef 800-µl van het reactiemengsel in de buffer die van het 20 mmfosfaat (pH 7) 7.5 werd bevat µMproteïne, 250 µMAMS, en 1% SDS uitgedroogd voor 30 min bij 37°C om de reactie te voltooien. Bovenmatige AMS werd verwijderd door dialyse. De gereageerde gedeelten werden genomen uit een steekproef van het apoWT SOD1 (100 µM) langs de incubatie bij AMS 37°C. is een stilbeen derivate dat een typische UVabsorptie bij ~328 NM en emissiemaximum bij 408 NM toont. De metingen van de fluorescentie (opwinding, 322 NM; emissie, 406 NM; opwinding/emissiespleten, 10) werden uitgevoerd om de verandering in het aantal vrije thiol tijdens samenvoeging te controleren. De kaliberbepalingskromme voor de vrij-cysteinegetalsmatige weergave werd voorbereid door vers voorbereid apoSOD1 WT bij verschillende concentraties als norm te gebruiken. De analyse MALDI bewees dat er een maximum van twee vrije cysteïnes per apoSOD1 monomeer is. De gedeelten die uit de incubatievoorraad worden genomen, werden tegelijk gebruikt voor de test van AMS gereageerd met ThT, en de fluorescentie van de oplossing werd gemeten om de steekproef te controleren op samenvoeging.