

## Super oxyde dismutase libre de métal forme des oligomères dans des circonstances physiologiques : Un mécanisme général possible pour la SLA familiale.

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>, Miguella 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

Contribué par Joan Selverstone Valentine, Mai 8, 2007 (envoyé pour recension Mars 13, 2007)

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative progressive qui influence sélectivement les neurones moteurs, 90% des cas totaux sont sporadiques, mais 20% sont associés avec des changements dans l'encodage génétique pour l'enzyme antioxydant cuivre-zinc super oxyde dismutase (SOD1). Les causes de morte des neurones moteurs dans la SLA sont en générale mal compris, mais pour la SLA familiale SOD1, l'oligomérisation de protéines mutantes SOD1 est sensiblement concerné. Dans ce travail-ci nous démontrons que le wild-type SOD1 humaine, quand les deux ions métaux manquent, de protéines oligomères résolubles, stables, grandes avec une masse moléculaire moyenne de  $\approx 650$  kDa sous des conditions physiologiques, c'est-à-dire 37°C, forme concentration protéine pH 7.0, et 100 100  $\mu$ s. En plus on démontre que les liens bisulfites intermoléculaires pendant l'oligomérisation sont formés et que cys-6 et cys-111 sont concernés pendant l'attachement. La formation d'oligomères résolubles était contrôlée par sa capacité pour améliorer la fluorescence de thioflavin T, un pigment benzothiazole qui augmente dans l'intensité de fluorescence sur le liage aux fibres amyloïdes, et par disruption de ce lien sur l'addition de chlorure hydrogène chaotrope agente guanidine. Nos résultats présentent une image générale, unie d'enchaînement SOD1 avant que ça pourrait marcher quand le wild-type ou la SOD1 mutant n'ont pas leurs protéines et leurs ions métaux. Néanmoins que nous ne pouvons pas exclure d'autres mécanismes dans la SLA familiale SOD1, ici présenté, la force de la déclaration de comment une série grande et diverse de protéines mutantes SOD1, peuvent tous mener à la maladie par le même mécanisme.

*Amyloïde / Sclérose latérale amyotrophique de la neurodégénération / addition de protéines / mal pliage protéine*

Oligomérisation de protéine, l'embranchement, et la formation de dépôts irrésolubles amyloïde sont généralement aperçu dans des maladies neurodégénératives, mais les facteurs qui misent en fonction l'interaction protéine anormale qui mènent à l'oligomérisation, restent évasifs. Les ions du métal sont souvent concernés dans ces phénomènes, mais comment ils sont exactement impliqués reste trouble. Plus de 114 différents variantes de superoxyde dismutase cuivre zinc humaine ( $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD1}$ ) sont reliées à la maladie neurodégénérative familiale SLA (FSLA) par un mécanisme de gain-de-fonction. Bien que les places cellulaires précises et les mécanismes de toxicité soient inconnus, la protéine SOD1 différente est sensiblement reliée à cette maladie. De différents publications récentes ont du preuve forçant que le cross-liage bisulfite anormale de la SOD1 mutante SLA joue un rôle dans cet oligomérisation, et des multimers SOD1 relié bisulfite sont découverts dans des tissus neurales des souris transgénétiques présentés SOD1-SLA qui sont supposés d'être des composants de sortes de poids hauts-moléculaires ou des entre-personnes dans leur formation. La SOD1 humain wild-type (WT) est une protéine exceptionnellement stable dans son forme holo et, bien que quelques SOD1 mutantes SLA déstabilisent sensiblement des protéines par leurs changements, des autres retiennent largement de stabilité ou WT SOD1. Dans demetallated complètement (apo) les états, seulement des protéines SLA-mutante SOD1 sont plus stables que apoWT SOD1. La SOD1 WT humaine contient 4 cystéines, cys-6, cys-57, cys-111, et cys-146. Dans des protéines mûrs, un bande de bisulfite, une

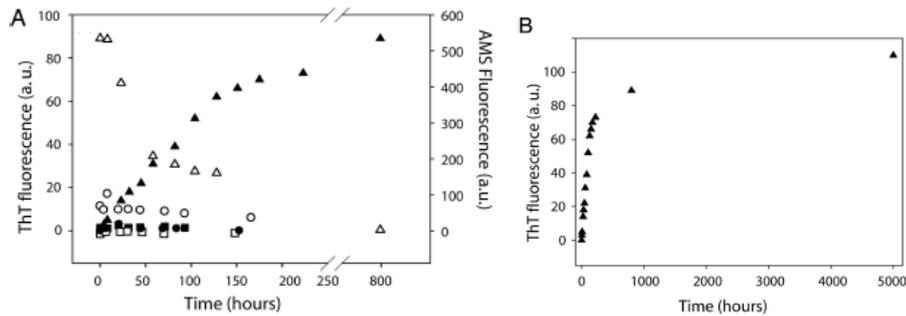
caractéristique structurelle qui est inhabituelle dans le milieu sensiblement diminué de la cellule, les liaisons cys-57 en cys-146.

L'absorption de protéine anormale est aperçue dans du tissu neural de la plupart des lignes de souris transgénétiques SOD1-SLA, en dans de différents cas on a démontré que cette absorption est amyloïde-sla, basé sur leur réactivité avec des pigments fluorescents qui sont utilisés pour visualiser l'absorption amyloïde dans le cerveau des patients avec la maladie d'Alzheimer. Quelques-unes des protéines SLA SOD1 isolées sont causées oligomères in vitro pour former l'amyloïde-sla complexe, mais les conditions qui sont utilisées dans chacun des cas, étaient loin de physiologique, c'est-à-dire, ou pH très bas ou oxydation metalcatalysée diffuse, présentant que l'oligomérisation se présentait seulement si la protéine SOD1 était vraiment abimé ou ouverte.

L'étude actuelle était entreprise pour déterminer la tendance pour oligomérisation de bisulfite-intact, WT SOD1 humaine dans des circonstances relativement prodigues qui sont probablement réalisé par de protéine vivante et le rôle de metallation dans l'empêchement et/ ou le développement de tels oligomérisations. Nous avons rapporté que la protéine apo SOD1 humaine de WT, avec ses liens intacts d'intrasubunitbisulfide, thioflavin résoluble T (ThT) – positive, assemblage oligomérique hauts-poids molécule sur incubation en solution avec des conditions prêts de physiologique, c'est-à-dire, à pH 7.0, 37°C, et forme des concentrations cellulaires typiques ; que cette assemblage est remarquablement stable, constamment dans l'état résoluble pour des semaines ; qu'ils sont reliés par interaction-protéine non covalent et en plus stabilisés par un lien intermoléculaire bisulfite, l'implication de cys-6 et cys-111 cross liens ; et que mettallation avec cuivre en zinc, ou même avec seulement zinc, retienne ce total oligomérisation. Ces résultats indiquent que la protéine SOD1 humaine libre de métal du WT à addition sous relativement généreuse à plié en avant est condition, même si le lien de l'intrasubunitbisulfide est intact, présentant que le gain de fonction toxique de SOD1 dans FSLA, et peut-être même dans la SLA sporadique (SSLA), a pu être en relation à l'inaptitude de cette protéine pour atteindre ou maintenir.

## RESULTATS

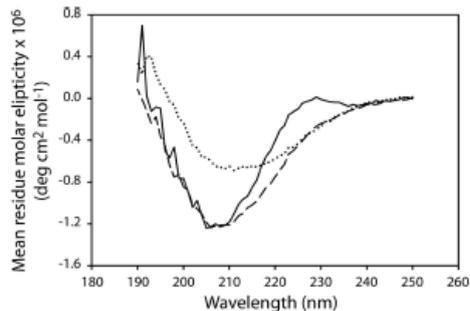
SOD1 est estimée d'être présente dans des cellules à des concentrations de  $\approx 100 \mu\text{M}$  (15-17). Pour imiter aussi étanche que possible les conditions qui sont ressenties par la protéine vivante, nous avons préparé 100 solutions protéines  $\mu\text{M}$  à pH 7.0 et nous les avons couvés à des changements 37°C. Dans la structure secondaire elles étaient contrôlées par la spectroscopie CD, et le degré d'oligomérisation, l'état était contrôlé par chromatographie gel-filtration et fluorescence de ThT, un pigment benzothiazole qui présente des augmentations d'intensité de fluorescence sur le liage à des fibres amyloïdes. Les solutions de metallated complète  $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD1}$  étaient inchangées après incubation à 37°C plus d'un mois, et le même était vérité pour le dérivât libre de cuivre,  $\text{E}_2\text{Zn}_2\text{SOD1}$  (E indique libre). Par contre, le comportement de la protéine complètement épuise était dramatiquement différent. Couvée et en présence de ThT, elle a démontré une augmentation progressive de fluorescence, avec un processus vite dans les premières 230 heures d'incubation, qui ralentissait après 1 mois, et après atteignait un plateau dans les 4 mois suivants (III.1) Aucune trouble était découverte pendant toute la durée.



III. 1. La formation de structures liés-thT se présente au même temps que la disparition de cystéines libres quand apo SOD1 à (a) cendre laissé 37°C. est couvée : Fluorescence qui est cause par ThT qui se lie à la SOD1 [ qui sont présentés comme unités quelconques (a.u. est présenté) car SOD1 (●), complètement apo SOD1 (▲), libre de cuivre SOD1 (○), apo ALS SOD1 (□), metallated et complètement SLA (■) pendant l'incubation des testes à Juiste à 37°C. metallated: La fluorecence de AMSboundto de Changein cystéines libres de la teste de l' apoSOD1 WT (Δ) pendant son incubation à (b) thT-lié fluorecence 37°C. de la protéine SOD1 plus de 7 mois d'incubation.

La recherche pour la fluorecence ThT liée est une indication claire de la formation d'assemblage oligomérique, et a la possibilité qu'elle peut partager les caractéristiques sur assemblage structurale avec amyloïde. Le tarife de l'augmentation de fluorecence ThT dépendait sensiblement de la température : plus haute la température, plus vite le tarife de l'embranchement. Les différents conditions pH influençaient aussi la réaction : tous les autres choses qui sont pareilles, doublaient le tarife par pH5 à relation à pH7. Cette augmentation de tarife peut être décrit à la charge répulsive diminuée vu que la solution pHpi de la protéine s'approche.

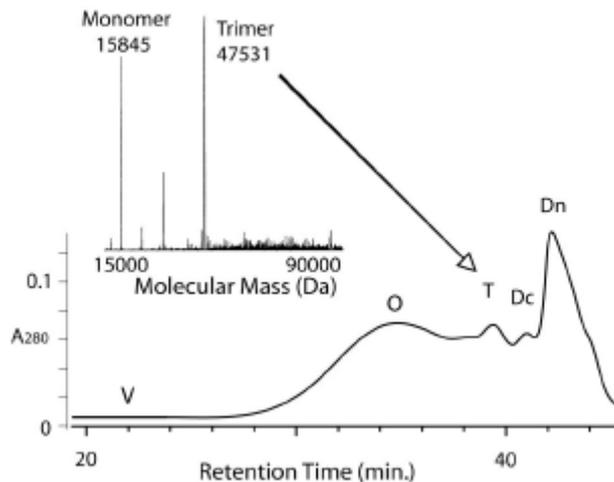
3.)



III. 2. CD analyse. CD spectres de metallated la protéine de la WT SOD1 (—), complètement la apoWT SOD1 (- - -), et les sortes ajoutées qui sont poussé de la colonne chromatographique de la SOD1 apoWT couvée (.....) Le pourcentage augmenté de structure secondaire  $\beta$  dans le sondage de la apoWT SOD1 après incubation, fait preuve de la contribution augmentée au spectre générale CD de la bande négative à 218 NM, qui est caractéristique pour la structure  $\beta$ -sheet.

Après incubation de 5 jours ou plus à 37°C, les sondages apoSOD1 à pH7 démontraient une population hétérogène d'états pour SOD1, à partir de dimère jusqu'à une bande large de sortes de poids haute-molécule, comme ceux-ci qui sont démontré par chromatographie gel-filtration. L'analyse des fractions qui s'étendent par la lumière multi angle a démontré que la bande poids large existait d'un mélange de sortes qui ont un poids moyen qui augmentait avec le temps d'incubation. Après 7 mois d'incubation, la masse moléculaire s'étendait entre les 430 et les 750 kDa, avec une valeur moyenne de  $\approx$ 650 kDa (SOD1 monomères  $\approx$ 25-45). Les analyses CD de la fraction de poids haute-molécule indiquent que l'assemblage oligomérique a un pourcentage relativement plus large (58%) de la structure secondaire  $\beta$  que le sondage apo fraîchement préparé (39%) (III.2). Le matériel oligomérique même, quoique perceptible résoluble, n'ionisait pas dans la spectrométrie de la masse d'ionisation electrospray (esi-MS) sous le dénaturer, conditions non-décroissantes. Néanmoins, le dimère covalent SOD1 et le trimère étaient découvert, ce qui était suggestif des entre-personnes covalentes qui sont formées dans des étapes auparavant de l'addition (III 3.) Addition de l'agent diminué DTT à tous les sondages expérimentaux et aux contrôles, qui sont suivis par analyse dans les mêmes circonstances, a résulté en l'apparence d'un signal fort pour la SOD1 monomérique et la disparition des signaux qui présentent pour n'importe quelles sortes d'ordre haute, que les liens bisulfite intermoléculaire structurels sont la propriété des complexes. Cette conclusion est supportée plus par les observations que l'incubation de la SOD1 apoWT en présence d'un agent diminué, résultait en chlorure hydrogène ou de tris (2-carboxyethyl) fosfine (TCEPT) ou DTTT, en aucune fluorecence

améliorée en présence de ThT et seulement l'état monomérique par chromatographie gel-filtration était observé, comme attendu pour SOD1 apo diminué bisulfite.



**Fig. 3.** Chromatographie taille-exclusion et détection spectrométrie masse d'oligomères covalents de SOD1 WT pendant l'addition. La chromatographie sizeexclusion de Nondenaturing était utilisée pour analyser un sondage d'apoptéine SOD1 après une incubation de 5 jours à 37°C. Le sondage présente un sommet large centré ≈34 min, à une masse moléculaire de ≈400 kDa (étiquette O, oligomère), avec géométrie suggestif d'un éventail hétérogène de sortes, aussi grand que 1MDa. Le volume périmé est marqué V. Control SOD1 avec 2 parties (42 min, chromatogramme non montrée) et une population est vue dans le sondage de 5 jours (marquée Dn., dimère non covalent) Le sondage de 5 jours démontre aussi de preuve de sommets d'absorbation centrale à 39 min. (marqué T, trimère) et 40 min. (marqué courant continu, dimère covalent) qui pourraient être des entre-personnes dans le processus d'oligomérisation. Les fractions (O.T. courant continu, et Dn) étaient analysées plus tard par ESI-MS dans le dénaturer des circonstances avant ou après la diminution. Le spectre de masse ESI qui est enregistré dans des circonstances de dénaturer non reducing, qui montrent une forme covalente trimérique de SOD1 des fractions 39 min ci-dessus. Montré est le profil covalent de la molécule après le déroulement avec des formes monomériques et trimériques de la protéine. La diminution de tous les 4 fractions (O.T. courant continu, et Dn) résulte dans la détection de sortes monomériques.

Le contenu du cystéine-libre en SOD1 apo peut être contrôlé par des changements dans la fluorescence acide 4 acétamide-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic (de AMS) à sa changement de thiol libre.

Préparé fraîchement la SOD1 a 2 cystéines libres par monomère. Le nombre de thiol libre était observé pour diminuer au même temps d'addition de protéine (qui est contrôlé par ThT fluorescence) (III.1) avec les deux processus après le même cours de temps : d'abord ils sont relativement vite, et il y a un plateau notamment à 9 à 10 jours. Quand deux cystéines libres étaient changés en résidus non cystéine, ou comme seul changement (données non montrées) ou comme changement double (C6A/C111S SOD1, après ici appelée SOD1 SLA) (III.1), aucune formation partagée était observée pendant l'incubation ; seulement les deux sortes avec les deux parties étaient découvertes, même après 7 mois d'incubation. Ce comportement est un démonstration de l'engagement des deux cystéines libres, cys-6 et aussi cys-111, dans le mécanisme d'addition, par la formation de liens bisulfites. Les données sur ces mutants SOD1 indiquent en plus que les cystéines bisulfites, cys-57 et cys-146, ne doivent pas être impliqués par cette initiation de formation oligomère.

L'engagement de cys-6 et cys-111 dans la stimulation d'oligomérisation de SOD1 était aussi démontré dans le comportement d'expression de WT et la SOD1 mutante dans *Escherichia coli*, où la SOD1 est principalement produite, forme demetallated. La SOD1 WT et un grand nombre de protéines mutantes SOD1 liées qui contiennent aussi bien les cys-6 et les cys-111, étaient toujours ramassés dans la fraction non-résoluble sauf si les concentrations hautes d'un agent diminué étaient ajoutées. Par contraste, quand cys-6 et / ou cys-111 étaient changés, la SOD1 était trouvée dans la fraction résoluble après choqe osmotique cellulaire (21), présentant ces formes mutantes WT et SOD1 SLA bisulfite lié oligomères aussi *in vivo* demetallated, mais seulement quand tous les deux le cys-6 et le cys-111 étaient présents.

Quand le chlorure hydrogène chaotrope agent guanidine (Gdn-HCl), qui interrompt le réseau lien hydrogène qui stabilisent les structures de protéine secondaire et tertiaire, étaient

ajoutés à une solution de substance résoluble oligomerized apoWT SOD1, la fluorescence était éteinte en 15 minutes, pendant que la filtration gel de la solution avait démontré que les sortes de poids haute-molécule étaient encore présent. Nous décrivons la perte de capacité liable thT à une disruption de la structure tertiaire de l'assemblage ; nous décrivons aussi le fait que l'état oligomérique SOD1 à des liens SOD covalents entre des cystéines des sous-unités SOD1, reste aussi que dans l'analyse de esi-MS était observée dans le dénaturer aux circonstances.

## RESCENSION

La SOD1 humaine est caractérisé par une combinaison inhabituelle de caractéristiques structurales : une structure quaternaire homodimérique forte ; un motif  $\beta$ -barrel huit-pris dans la terre dans chaque sous-unité ; lien bisulfite intrasubunit fort entre un pair de cystéines restés, c'est-à-dire cys-57 et cys-146 ; la présence d'ions métaux (cuivre et zinc) avec des rôles enzymatiques et structurels spécifiques ; et deux cystéines libres par sous-unité (cys-6 et cys-111). La maturation de la protéine vivante, pour atteindre la structure quaternaire plié correctement et l'activité enzymatique, exige une formation du lien bisulfite, dimérisation et le gain des ions cuivre et zinc. La manque d'un ou plus de ces caractéristiques a une influence importante sur les caractéristiques de la SOD1. Par exemple apoprotéine avec deux parties est intacte quand le lien bisulfite, mais le monomérique est diminué quand le lien bisulfite. Par contraste, la protéine SOD1 diminué en bisulfite avec deux parties quand les ions zinc sont liés. Nos résultats, décrits ici, démontrent que la protéine apo SOD1 avec deux parties, même avec ces liens intacts de intrasubunitbisulfide, a une tendance claire à former de highmolecular résoluble – oligomères de poids dans les circonstances très prêt de physiologique. Cet oligomérisation se présente *in vitro* aussi bien qu'*in vivo* dans E.coli, à condition que cys-6 et cys-111 soient présents. La formation de Metallated de la protéine SOD1 n'oligomère pas dans les mêmes circonstances.

Bien que l'absence d'ions métaux dans la protéine SOD1 apo est clairement un facteur important qui détermine la tendance de la protéine, la formation de liens bisulfites intermoléculaires joue aussi un rôle important, comme démontré par la manque d'addition de l'apoprotéine sous la diminution de conditions. Intéressant, c'est l'engagement du lien-bisulfite dans la formation des fibrilles amyloïdes mentionné auparavant pour d'autres maladies neurodégénératives. Dans la SOD1, nous identifions cys-6 et cys-11 comme responsable pour ce processus parce que le seul changement de point d'un ou de deux d'eux bloque l'addition. Nous rédigeons alors un mécanisme d'addition dont lequel la protéine SOD1 apo, qui est connu et à son combe flexible pour déstabiliser à cause de la manque d'ions métaux, peut prélever un éventail large de conformations, qui causent deux cystéines libre d'être exposé au solvant. C'est en effet démontré auparavant dans un monomère SOD1 construit, qui est stabilisé artificiellement par deux changement à l'interface de la sous-unité, que l'absence de métaux, et en particulier de zinc métal structurel, la protéine pour être causée librement mobile et qui différents lignes, y inclus la ligne IV et la ligne électrostatique VII, par un état de gouttes fondus est caractérisé entre qui un éventail sensiblement large de conformations est prélevé.

Cette flexibilité devrait rendre les deux cystéines libres plus solvantaccessible en relation aux deux parties, forme metallated. Dès que les cystéines libres sont résolubles-indulgents, le poids haute-molécule, les oligomères peuvent facilement être formés par un lien-bisulfite et une interaction non covalente entre les  $\beta$ -sheets (III.4) C'est n'est pas claire dans ce stade si la force vanne pour l'oligomérisation est principalement une interaction de protéines non covalentes, qui est alors stabilisé en plus par cross-linking bisulfite covalente, ou est l'opposite. Le lien de ThT à l'assemblage oligomérique et son pourcentage augmenté de structure secondaire  $\beta$  sont compatibles avec la possibilité que cet assemblage est tenu par les liens oxygènes et l'interaction électrostatique, qui se présentent dans les fibrilles

amyloïdes. Néanmoins, à défaut d'information structurelle extra cette conclusion reste spéculatif parce que le lien ThT n'est pas totalement spécifique pour l'amyloïde. On devrait aussi remarquer que cette étude soutient le rôle critique pour tous les deux le cys-6 et le cys-111, dans l'initiation du procédé d'addition et la formation bisulfite intermoléculaire, et pas la possibilité d'engagement subséquent de cys-57 et cys-146 par ces réactions de l'échange bisulfite comme gain d'addition.

Les facteurs les plus importants dans l'addition semblent manquer des métaux et la présence de cystéines libres, des facteurs qui peuvent aggraver les protéines mutantes SLA. Un grand nombre de mutantes SOD1 liées a une affinité métal diminuée, et en effet, quelques unes ne parviennent même pas *in vitro* de se recomposer. Aussi pour WT, la protéine est produite dans une forme immature qui exige de différents pas pour atteindre la forme active définitive. Parmi les modifications posttranslationnelles divers que la SOD1 doit subir, la métallation est un processus complexe qui implique de différents pas et de l'interaction avec d'autres protéines. La compréhension du métal pourrait être changée par mis régulation de n'importe quel de ces pas par des facteurs externes. Alors, quand une ou plusieurs SOD1 sont présent immature, état demetallated, l'addition pourrait commencer, menant à des oligomères amyloïde-sla résolubles. Nous devons aussi tenir compte du fait que la SOD1 est présent dans tous les deux le cytoplasme et la mitochondrie, et que ce sont des ions métaux indépendant acquis dans les deux compartiments de cellules. Ces deux compartiments de cellules ont des caractéristiques redox relativement différents qui pourrait modeler en plus l'addition *in vivo*. Ce résultat est aussi compatible avec une suggestion récente de Wang et al. : ils ont rapporté que les liens bisulfite intermoléculaire aident à stabiliser les complexes *in vivo* et que l'état redox de la cellule peut jouer un role dans l'addition.

Oligomères observés dans cette étude semblent être la cause la plus probable pour les espèces toxiques pour la SOD1 liée à la SLA. Le mécanisme discuté ici pour l'addition SOD1, est relativement général parce que ça ne dépend pas d'un changement spécifique. Ca fournisse une image unie de l'oligomérisation SOD1, aussi bien qu'un système *in vitro* pour étudier ce processus.

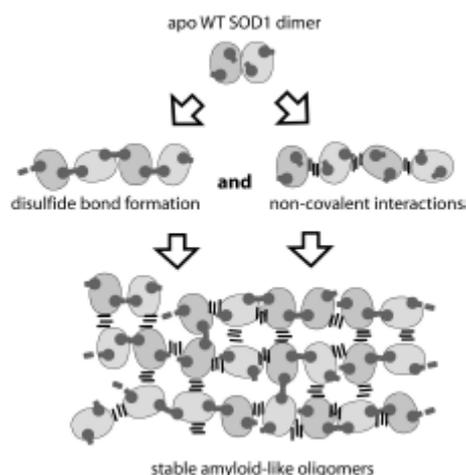


Fig. 4. Mécanisme présenté pour addition SOD1. Mécanisme potentiel pour formation vivante d'oligomères résolubles qui se présentent quand le protéine apoWTSOD1 est tenue prêt des conditions physiologiques (37°C, 100 µM, et pH 7) pour une période extensive. Les formes gris-obscurés représentent les cystéines libres (cys-6 et cys-111) et les trios noirs de barres parallèles représentent des régulations amyloïde-sla de liens hydrogènes. A défaut d'ions métaux, SOD1 les protéines forment des liaisons bisulfites anormales et des associations non covalentes avec d'autres monomères SOD1 ou dimères.

## EQUIPEMENTS ET METHODES

### La préparation du sondage

La SOD1 WT, qui est exprimé en levure, est nettoyé dans une forme metallated complète. N<sup>α</sup>-acétylation (alanine) était, comme attendu pour la SOD1 humaine, confirmé par l'analyse de masse spectrométrique. La SOD1 WT était aussi exprimé dans la tension de E. coli BL21 (DE3) qui est élevé par moyen de pond. La protéine était isolé par choqe osmotique dans un tampon 20 mM Tris/5 mM DTT à pH 8. Après incubation pour 30 min à 37°C qui est suivi par centrifugation à 165.000 x g pour 20 min, la protéine était nettoyée de la substance flottante après une procédure déclarée qui est adapté par addition de 1 mM DTT à chaque tampon chromatographique. La protéine a obtenu avec ce substiochiométrique de nombres d'ions métaux. Les changement étaient exécuté avec un équipement de mutagenèse de place QuikChange.

Protéine demetallated (apo) était préparé suite à des protocoles publiés auparavant. Reconstruction du zinc était exécutée. Le contenu du métal des différents formes de la SOD1 était contrôlé par la spectrométrie inductive branchée de la masse plasma (icp-MS) en utilisant un ThermoAs Jarrell Atomscan 25 spectromètre inductif suivant.

### **Caractérisation spectroscopique**

Les sondages protéine étaient d'une concentration 100 μM en SOD1 (dimère sla) dans le tampon du phosphate 20 mM à pH7. La protéine était couvée à 37°C pour imiter les conditions physiologiques. La spectroscopie optique et fluorescence, qui est branchée à la chromatographie gel-filtration, est utilisée pour contrôler la formation d'espèces oligomériques avec ces conditions de sondage.

Les spectres ver-uv CD (190-250 NM) étaient enregistrés de SOD1 sur un spectropolarimètre 1-810 JASCO. Une cellule avec un longueur de parcours de 1mM était utilisée pour la mesure, et les paramètres étaient placés comme suit : portée 2 NM; résolution marche 1 NM; tâter vitesse 20 nm/min; et temps de réaction 2 s. Chaque spectre était obtenu comme moyen des 4 tâter. La concentration protéine était typiquement ≈8-10 μM. Avant la calculs du résidu moyen ellipticité repas, tous les spectres étaient améliorés en déduisant les participations du tampon. Les spectres étaient alors dépliés en utilisant l'adjacent, le moyen du filtrage transforme vite de Fourier. Les estimés quantitatives du contenu de structure secondaire étaient fait en utilisant le logiciel DICROPROT.

La fluorescence était suivie avec ThT, un pigment qui se lie à des structures amyloïde-sla. ThT libre a excitation et maxima d'émission à 350 et 450 NM, respectivement. Néanmoins, sur le liage à des oligomères amyloïde-sla, l'excitation change et les amplitudes d'émission en 450 et 485 NM, respectivement. Cinquante – cinquante – four microlitre parties du sondage étaient ajoutées à 646 μl d'une solution 215 μM ThT dans un tampon de 20 mM phosphate à pH 7. L'émission de la fluorescence de solution était mesurée, en temps d'incubation, avec un Cary 50 (le photomètre spectre d'obscurcissement) livré avec un unicellulaire Peltier teneur de cellule thermostated qui est règle à 37°C. Le spectre de fluorescence de fond du tampon était déduit. L'amplitude d'excitation était de 446 NM (portée 10 NM), et l'émission était enregistrée avec 480 NM (portée 10 NM). Intensité de la fluorescence à 483 NM était mis en carte vers le temps d'incubation.

L'état trouble était mesuré à 400 NM pour découvrir une formation potentielle d'un précipitât non-résoluble. Le trouble de la solution était mesuré comme une absorption claire à 400 NM en utilisant un photomètre spectre Cary UV-visible. Les expériences étaient exécutées en allongeant 120 μl du stock d'incubation SOD1 en 280 μl du tampon du 20 mM phosphate à pH 7. Une cuvette de 1cm quartz était utilisée, et la limite d'enquête instrumentale était de 0.001 400NM.

### **ESI-MS.**

Les sondages SOD1 étaient analysés par chromatographie size exclusion nondenaturing (G4000 SW; Les sciences biologiques de Tosoh, Tokyo, Japon; 20 du phosphate kaliummm, pH 7.0; 250 µl/min; 24°C). Les fractions (50-100 µl) étaient sec dans Savant SpeedVac et résolu de nouveau dans 10 µl d'eau. Pour les sondages diminués, 0.33 M DTT était ajouté (5 µl de la solution de 1 M en eau), et les sondages étaient couvés à une température de chambre pour 15 min. Pour ESI-MS dans le dénaturer des circonstances, les sondages salins étaient allongés avec acide fourni : Le gazon scientifique, honnête du pêcheur, NJ; ACS le rang reagen), vortexmixed pour 1 min, et immédiatement injecté sur un système HPLC pour la spectrométrie online de masse chromatographie liquide (lc-MS). Une colonne de gel-filtration [SW2000 XL; Les sciences biologiques de Tosoh; chloroforme méthanol/1% acide fourni en eau, 4/4/1 (volume/volume/volume); 250 µl/min; 40°C] était utilisé à dessalât pour le sondage et fournissent des hautes conditions pour le dénaturer. Eluent de la colonne était mené à une source voile ions d'un spectromètre de la masse triple-quadruple, qui gagne de précision de masse de 0.01%.

### **L'addition de SOD1 contrôle qui s'étendent par filtration de lumière-gel.**

Cent parties de la protéine couvée à 37°C étaient périodiquement prises et analysées par filtration gel sur un Superdex de colonne de 75u 10/30 à température de chambre. La colonne était preequilibrated avec 20 du phosphate kaliummm (pH 7.0), et le tarif de courant était de 0.6 ml/min. Les chromatogrammes, qui contrôlaient les espèces qui étaient formées pendant l'incubation, étaient obtenu en contrôlant l'absorption à 280 NM. Superdex était lié à la colonne de 75 u 10/30 avec un spectromètre qui étend du lumière. Le multiangle online qui étende de lumière (MALS) détecteur et détecteur de différence de réfraction index (DRI) étaient utilisés pour mesurer la lumière qui est étendue comme fonction de concentration protéine de coin et absolu de fractions de colonne de chromatographie excluant-grandeur. L'approche Zimm était utilisée dans le logiciel Astra pour estimer la masse. Les données étaient apte en utilisant un first-order terme. L'analyse était fait pour chacun des parties 100-µl qui étaient pris périodiquement de la partie d'incubation pour contrôler l'augmentation de poids molécule des espèces résolubles qui sont formées pendant l'addition.

### **Le rapport numérique du thiol-libre**

L'estimation de thiol libre pendant l'addition était exécuté par le changement de AMS. AMS à l'hauteur de devenir solubilité d'eau et est facilement ajouté à thiol libre. Un sondage de 800-µl de la mélange de réaction dans le tampon du phosphate 20 mm (pH7) 7.5 était contenu µMprotein, 250 µMAMS, et 1% SDS couvé pour 30 min à 37°C pour finir la réaction. AMS extravagant était enlevé par dialyse. Les parties réagies était pris d'un sondage de apoWT SOD1 (100 µM) par l'incubation chez AMS 37°C. est un dérivât stilbeen avec une absorption typique de UV avec ≈328 NM et maximum d'émission à 408 NM. Les mesures de fluorescence (excitation, 322 NM ; émission, 406NM ; excitation/crevasses d'émission, 10) étaient exécuté pour contrôler le changement dans un nombre de thiol libre pendant l'addition. La courbe de détermination de calibre par le rapport cystéine numérique libre était préparé par utiliser comme norme de apoSOD1 WT fraîchement préparée. L'analyse MALDI a confirmé qu'un maximum de 2 cystéines libres par apoSOD1 est monomère. Les parties qui sont pris du stock d'incubation, était au même temps utilisées pour le teste de AMS réagi avec ThT, et la fluorescence de la solution était mesurée pour contrôler le sondage sur addition.