Stabilisierung der nativen Konformation der humanen Superoxiddismutase 1 mittels Peptidliganden zur ALS-Therapie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Karoline Bianka Santur
aus Köln

Düsseldorf, März 2021

aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dieter Willbold
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Lutz Schmitt
Tag der mündlichen Prüfung:	11.05.2021

Natürlicher Verstand kann fast jeden Grad von Bildung ersetzen, aber keine Bildung den natürlichen Verstand.

Arthur Schopenhauer (1788 – 1860)

Kurzfassung

Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankung, die durch den Verlust motorischer Neuronen gekennzeichnet ist. Die Überlebenszeit der Betroffenen beträgt in der Regel 3 bis 5 Jahre nach Ausbruch der ersten Symptome. Bislang stehen lediglich zwei Medikamente, Riluzol und Edavaron, zur Verfügung, die jedoch in ihrer Wirksamkeit insofern begrenzt sind, dass diese die Überlebenszeit der Patienten nur um wenige Monate verlängern. Aus diesem Grund ist es zwingend notwendig, einen neuen Wirkstoff zu entwickeln, der eine kausale ALS-Therapie ermöglicht, wodurch der Krankheitsverlauf nicht nur deutlich verlangsamt, sondern im besten Fall auch vollständig aufgehalten wird.
In den vergangenen Jahren wurden vermehrt Mutationen im Gen codierend für die humane Superoxiddismutase 1 (hSOD1) identifiziert, die mit der ALS-Pathogenese assoziiert sind. In der Regel liegt hSOD1 als stabiles, dimeres Enzym mit verschiedenen posttranslationalen Modifikationen vor. So sind neben der Dimerisierung sowohl die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke als auch die Insertion von Metallionen für die katalytische Aktivität und Stabilität des Proteins essentiell. Einige ALS-assoziierte Mutationen und/oder destabilisierende Faktoren begünstigen jedoch eine Fehlfaltung des Proteins, wobei der zugrunde liegende Pathomechanismus bisher nicht eindeutig identifiziert ist. Bisherige Studien weisen auf einen toxischen Funktionsgewinn von hSOD1 als Resultat der Proteinfehlfaltung und -aggregation hin. Die Tatsache, dass Aggregate bestehend aus fehlgefalteter, wildtypischer hSOD1 nicht nur bei Patienten mit familiärer ALS (fALS), sondern auch bei Patienten mit sporadischer ALS (sALS) sowie in einigen fALS-Fällen mit keiner vorliegenden SOD1-Mutation gefunden worden sind, lässt vermuten, dass die hSOD1-Fehlfaltung ein gemeinsamer Bestandteil des ALS-Pathomechanismus ist. Aus diesem Grund stellt die Stabilisierung der nativen Konformation von hSOD1 mittels Peptidliganden einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung aller hSOD1-assoziierten ALS-Formen dar mit dem Ziel, die Bildung von toxischen hSOD1-Spezies zu reduzieren, wenn nicht sogar vollständig zu inhibieren.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden Peptide mittels Phagendisplay identifiziert, die native hSOD1 binden und die einen Einfluss auf die hSOD1-Aggregation besitzen. Hierfür wurde zunächst ein Rekonstitutionsprotokoll mit der Verwendung von verschiedenen Methoden zur abschließenden Charakterisierung der rekonstituierten hSOD1 bezüglich der Konformation, Stabilität und Aktivität etabliert, welches die Herstellung von nativ gefalteter, rekombinanter hSOD1 mit der bisher höchsten publizierten enzymatischen Aktivität und mit nahezu vollständiger Metallionenbeladung

ermöglichte. Die nachfolgende Durchführung des Phagendisplay und die Einführung von geeigneten Kontrollselektionen, sowie die Analyse der resultierenden Proben mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) und der in der Arbeitsgruppe Mohrlüder entwickelten Software *Target Sequencing Analysis Tool* (TSAT) führten anschließend zur Identifizierung von hSOD1-Peptidliganden. Insbesondere für das hier identifizierte Peptid S1VL-21 konnte eine mikromolare Bindungsaffinität zu nativer hSOD1 und ein konzentrationsabhängiger, reduzierender Einfluss auf die Bildung von hSOD1-Aggregaten *in vitro* gezeigt werden. Erste Analysen deuteten zudem darauf hin, dass die mit S1VL-21 inkubierten und nach Aggregation verbliebenen hSOD1-Spezies auch in ihrer Größe reduziert sind und eine geringere Toxizität in Zellen aufweisen als Peptid-unbehandelte hSOD1-Aggregate. Die sequenzspezifische Wirksamkeit von S1VL-21 konnte ferner mit Hilfe von randomisierten Kontrollpeptiden, die eine geringere Bindungsaffinität zu nativer hSOD1 und kaum bis gar keinen Einfluss auf die hSOD1-Aggregation besitzen, demonstriert werden.

Zusammengefasst liefert die hier vorliegende Arbeit nicht nur wichtige Bausteine zur Identifizierung von hSOD1-bindenden Peptiden, sondern auch erste wichtige Daten bezüglich einer potentiellen Leitsubstanz für die Entwicklung von hSOD1-assoziierten Therapeutika für die Behandlung von ALS.

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the progressive degeneration of motor neurons. Death occurs typically within 3 to 5 years after symptom onset. Only two drugs, riluzole and edavarone, are currently available, that extend survival by only few months. Therefore, it is necessary to develop a new effective compound that enables a causal ALS therapy resulting in a significant deceleration or even in a total prevention of disease progression.

In the past few years, mutations in the gene coding for the human superoxide dismutase 1 (hSOD1) have been increasingly identified that are linked to ALS pathogenesis. Usually, hSOD1 exists as a stable, dimeric enzyme with several posttranslational modifications. Besides dimerization, both the formation of an intramolecular disulphide bridge and the insertion of metal ions are important for protein stability and activity. However, some ALS-associated mutations and/or destabilizing factors promote misfolding and aggregation of hSOD1, whereas the underlying pathomechanism is still unclear. Some studies suggest a toxic gain of function of hSOD1 as a result of protein misfolding and aggregation. Interestingly, aggregates containing misfolded wild type hSOD1 have been found not only in patients with familial ALS (fALS) but also in patients with sporadic ALS (sALS) and in some fALS cases without SOD1 mutation leading to the hypothesis that hSOD1 misfolding is a common part of the ALS pathomechanism. Thus, stabilizing the native conformation of hSOD1 by specifically binding peptide ligands to reduce or completely inhibit the formation of toxic hSOD1 species may be a promising approach for hSOD1-related ALS therapy.

In the present work, peptides were identified by phage display that bind native hSOD1 and interfere with hSOD1 aggregation. For this purpose, a reconstitution protocol was established, which allowed the preparation of natively folded recombinant hSOD1 with the highest enzymatic activity published so far and with almost complete metalation level. Therefore, several methods were used to characterize reconstituted hSOD1 regarding its conformation, stability, and activity. Subsequent phage display including control selections and the analysis of resulting samples by next generation sequencing (NGS) as well as by the target sequencing analysis tool (TSAT) – a software that was developed in the research group Mohrlüder – led to the identification of hSOD1 peptide ligands. Especially one identified peptide, S1VL-21, revealed a micromolar binding affinity to native hSOD1 and a concentration-dependent reducing impact on the *in vitro* formation of hSOD1 aggregates. Preliminary analyses suggested that hSOD1 species resulting from the incubation with S1VL-21 under hSOD1-aggregating conditions are also reduced in size and exhibit lower toxicity in cell culture experiments than non-treated hSOD1 aggregates.

The sequence-specific efficacy of S1VL-21 was further demonstrated by using randomized control peptides with lower binding affinity to native hSOD1 and less or none influence on the formation of hSOD1 aggregates.

In summary, this work provides not only important tools for the identification of hSOD1-binding peptides, but also first important data on a potential lead compound for the development of hSOD1-associated drugs for ALS treatment.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis III

Tabellenverzeichnis IV

1 Einleitung 1

1.1 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) 1

1.1.1 Ätiologie und Pathomechanismus von ALS 3

1.2 Humane Superoxiddismutase 1 (hSOD1) 7

1.2.1 Physiologische Funktion und struktureller Aufbau von hSOD1 7

1.2.2 hSOD1-assoziierte ALS 10

1.2.3 Stabilisierung der nativen hSOD1-Konformation als Ansatz zur Behandlung der hSOD1-assoziierten ALS 13

1.3 Phagendisplay 15

1.3.1 Prozessierung der selektierten Peptide 17

2 Zielsetzung 19

3 Publizierte Ergebnisse 20

3.1 In Vitro Reconstitution of the Highly Active and Natively Folded Recombinant Human Superoxide Dismutase 1 Holoenzyme 20

3.2 Ligand-Induced Stabilization of the Native Human Superoxide Dismutase 1 30

4 Weitere Resultate 46

4.1 Materialien & Methoden 46

4.1.1 Peptide 46

4.1.2 *Microscale thermophoresis* (MST)-Messungen zur Bestimmung der Bindungsaffinität der selektierten Peptide zu nativer hSOD1 47

4.1.3 Thioflavin T (ThT)-Assay zur Analyse des Einflusses der selektierten Peptide auf das amyloidähnliche Aggregationsverhalten von hSOD1 49

4.1.4 Analyse der resultierenden hSOD1-Spezies nach Aggregation mit und ohne S1VL-21 Inkubation mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie 51

4.2 Ergebnisse 53

4.2.1 Weitere Ergebnisse zum Einfluss des selektierten Peptides S1VL-21 auf die hSOD1-Aggregation 53

4.2.1.1 Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen weisen auf eine geringere Bildung von großen hSOD1-Aggregaten durch die Zugabe von S1VL-21 während der hSOD1-Aggregation hin 53

4.2.1.2 S1VL-21 reduziert die Bildung von hSOD1-Aggregaten auch bei Zugabe des Peptides zu Beginn der Elongationsphase der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation 55
4.2.2 Ergebnisse weiterer Peptide 57
4.2.2.1 Peptid S1VL-11 weist ebenfalls eine Bindung zur hSOD1 und einen Einfluss auf deren Aggregation auf 57

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung 61

5.1 Es konnte nativ gefaltete hSOD1 mit hoher enzymatischer Aktivität durch die *in vitro* Rekonstitution gewonnen werden 61
5.2 Es wurden hSOD1-bindende Peptidliganden, die einen Einfluss auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation besitzen, identifiziert 64
5.2.1 Insbesondere die Peptide S1VL-11 und S1VL-21 können die Bildung von toxischen hSOD1-Aggregaten konzentrationsabhängig reduzieren 65

6 Ausblick 69

Literaturverzeichnis V

Anhang XIV

Publikationen, Konferenzbeiträge und Patentbeteiligungen XVIII

Danksagung XIX

Eidesstattliche Erklärung XX

Druckgenehmigungen XXI

Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	Varianzanalyse (*engl. analysis of variance*)
BSA	Bovines Serumalbumin
C9ORF72	*Chromosome 9 open reading frame 72*
CCS	*Copper chaperon for SOD1*
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit (*engl. cerebrospinal fluid*)
Cu	Kupfer
$Cu(II)Cl_2$	Kupfer(II)-chlorid
DLS	Dynamische Lichtstreuung (*engl. dynamic light scattering*)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*engl. deoxyribonucleic acid*)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EmS	*Empty score*
EnF	*Enrichment factor*
fALS	Familäre ALS
FUS	*Fused in sarcoma*
hSOD1	Humane SOD1
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*engl. inductively coupled plasma mass spectrometry*)
K_D	Dissoziationskonstante
MP	Milchpulver
mRNA	*Messenger RNA*
MST	*Microscale thermophoresis*
NaAc	Natriumacetat
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaPi	Natriumphosphat
NGS	*Next generation sequencing*
NMR	Kernspinresonanz (*engl. nuclear magnetic resonance*)
nt	Nukleotide
RNA	Ribonukleinsäure (*engl. ribonucleic acid*)
sALS	Sporadische ALS
SDS	Natriumdodecylsulfat (*engl. sodium dodecyl sulfate*)

SOD1	Superoxiddismutase 1
ssDNS	Einzelsträngige DNA (*engl. single strand DNA*)
TDP-43	*Transactive response DNA binding protein 43 kDa*
ThT	Thioflavin T
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSAT	*Target sequencing analysis tool*
TTR	Transthyretin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WT	Wildtyp
Zn	Zink
$ZnSO_4$	Zinksulfat

Drei- bzw. Einbuchstabencode natürlich vorkommender Aminosäuren

Ala / A	Alanin
Arg / R	Arginin
Asn / N	Asparagin
Asp / D	Asparaginsäure
Cys / C	Cystein
Gln / Q	Glutamin
Glu / E	Glutaminsäure
Gly / G	Glycin
His / H	Histidin
Ile / I	Isoleucin
Leu / L	Leucin
Lys / K	Lysin
Met / M	Methionin
Phe / F	Phenylalanin
Pro / P	Prolin
Ser / S	Serin
Thr / T	Threonin
Trp / W	Tryptophan
Tyr / Y	Tyrosin
Val / V	Valin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick einiger zellulärer, pathogener Prozesse, die im Zusammenhang des komplexen Pathomechanismus von ALS diskutiert werden. 3

Abbildung 2: Darstellung der Disproportionierungsreaktion der humanen Superoxiddismutase 1. 7

Abbildung 3: Kristallstruktur des nativen hSOD1-Dimers mit den gebundenen Metallionen Kupfer (rosa) und Zink (hellcyan) (PDB Eintrag: 1HL5). 9

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Strategie zur Behandlung der hSOD1-assoziierten ALS durch die Stabilisierung der nativen Konformation von hSOD1 mittels Peptidliganden. 14

Abbildung 5: Schematischer Aufbau des filamentösen Bakteriophagen M13 und Skizzierung einer Phagendisplay-Selektion. 16

Abbildung 6: Mögliche Strukturtransformationen und Modifikationen am Beispiel eines selektierten Tetrapeptides zur Optimierung der Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit (modifiziert nach Chorev 2005 [166]). 18

Abbildung 7: Aufnahmen mittels Rasterkraftmikroskopie der resultierenden hSOD1-Spezies nach Aggregation weisen auf eine geringere Bildung von großen hSOD1-Aggregaten bei Inkubation mit S1VL-21. 54

Abbildung 8: ThT-Assays von hSOD1 mit Zugabe von S1VL-21 zu verschiedenen Zeitpunkten der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation verweisen auf eine reduzierte Bildung von hSOD1-Aggregaten auch bei Zugabe des Peptides zu Beginn der Elongationsphase. 56

Abbildung 9: Peptid S1VL-11 weist eine mikromolare Bindungsaffinität zu nativer hSOD1 auf. 58

Abbildung 10: S1VL-11 weist einen Einfluss auf die Bildung von amyloidähnlichen hSOD1-Aggregaten auf. 59

Abbildung 11: Inkubation von hSOD1 mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-11 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen führt zur Verlängerung der Verzögerungsphase (*lag time*, t_{lag}) der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation. 60

Abbildung 12: Weitere rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Proben aus Abbildung 7 für einen Überblick der Verteilung der hSOD1-Aggregate und zur vorsichtigen Beurteilung des Einflusses von S1VL-21 auf die hSOD1-Aggregation. XIII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit analysierten Peptide mit Angabe der Sequenz, Aminosäurenanzahl und des Molekulargewichts der jeweiligen Peptide.....46

Tabelle 2: Zusammenfassung der Bedingungen der Selektionen, die zur Identifizierung der im Rahmen dieser Arbeit selektierten Peptide führten. XIV

Tabelle 3: Zusammenfassung der Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit selektierten Peptide mit Hilfe der Programme TSAT [155] und Hammock [191]. XV

Tabelle 4: Zusammenfassung der Screeninganalysen der im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit selektierten Peptide bezüglich deren Affinität zu nativer hSOD1 und deren Einfluss auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation. XVI

1 Einleitung

1.1 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankung des motorischen Nervensystems, die zur Degeneration der oberen und unteren Motoneuronen im primären Kortex, Hirnstamm und Rückenmark führt [1]. Der Begriff „amyotroph“ beschreibt dabei den eintretenden Muskelschwund aufgrund der Degeneration der entsprechenden Motoneuronen, was zu einer Schwäche der betroffenen Muskeln und zu sichtbaren Faszikulationen führt. „Lateralsklerose“ hingegen beschreibt die Verhärtung durch Gliose und somit die Degeneration der betroffenen Bereiche des anterioren und lateralen Kortikospinaltrakts, d.h. der Axone, die sich vom Gehirn bis zum Rückenmark erstrecken und die für die Übertragung der Signale zur Muskelbewegung wichtig sind [2]. ALS wurde erstmals im Jahre 1869 durch den französischen Neurologen Jean-Martin Charcot beschrieben [3]. Mit einer Inzidenz von 2,1 und einer durchschnittlichen Prävalenz von 5,4 pro 100 000 Menschen [4] ist ALS die häufigste Erkrankung der Motoneuronen bei Erwachsenen [1]. Männer sind mit einem Verhältnis von 1,4:1 etwas häufiger betroffen als Frauen, was jedoch je nach Alter der Patienten variiert [5]. Unterschieden wird dabei zwischen der sporadischen (sALS) und der familiären Form von ALS (fALS). Zur Letzteren gehören ca. 10% aller ALS-Fälle, während in etwa 90% der Fälle keine familiäre Häufung zu beobachten ist [6]. Die familiäre Form tritt in der Regel im Vergleich zur sporadischen Form einige Jahre früher mit einem Durchschnittsalter von 56 Jahren auf und wird überwiegend autosomal dominant vererbt. Das mittlere Erkrankungsalter der sALS-Fälle liegt dagegen bei 62 Jahren [7]. Lediglich 5% der Fälle haben einen Erkrankungsbeginn vor dem 30ten Lebensjahr [8]. Das klinische Erscheinungsbild beider Formen lässt sich nicht unterscheiden, was auf einen gemeinsamen Pathomechanismus hindeutet [6].

In beiden Fällen kommt es zu einer schnell fortschreitenden Degeneration der Motoneuronen beginnend im zentralen Nervensystem mit einhergehender Paralyse. Im Laufe der Erkrankung kommt es zu einem Verlust der motorischen Fähigkeiten darunter auch zu einer Beeinträchtigung der Sprech- und Schluckmuskulatur. Die Muskeln der Augen und Harnröhre sind von der Degeneration jedoch nicht betroffen [9]. Aufgrund der zunehmenden Muskelatrophie beträgt die Überlebenszeit der Betroffenen in der Regel 3 bis 5 Jahre nach Ausbruch der ersten Symptome, wobei der Tod meistens durch die Paralyse der Atemmuskulatur verursacht wird [10]. Lediglich 10-20% der Patienten haben eine Überlebenszeit von mehr als 5 Jahren [11].

Trotz weitverbreiteter Forschung ist bis heute kein Ansatz zur erfolgreichen Therapie der Erkrankung vorhanden. Der Behandlungsstandard bei ALS ist symptomatisch orientiert

und dient vor allem zur Erhaltung noch bestehender Funktionen und der Lebensqualität. Die einzigen zugelassenen Medikamente auf dem Markt zur ALS-Therapie sind Riluzol und Edaravon [12]. Riluzol, welches 1995 in den Vereinigten Staaten und 1996 in Europa zugelassen wurde, verlängert jedoch bei einigen Patienten die Überlebenszeit nur um bis zu 3 Monate [13] bei einer Einnahme in den ersten 6 Monaten der Therapie [14]. Riluzol soll dabei als Glutamat-Antagonist die überhöhte Reizung der Motoneuronen inhibieren [15]. Jedoch zeigten weitere Studien im Laufe der Jahre, dass Riluzol nur begrenzt einen Einfluss auf die Glutamat-Rezeptoren besitzt und dieser vermutlich auf einen bisher nicht-vollständig aufgeklärten, komplexeren Wirkmechanismus zurückgeht [16], wodurch auch erklärt werden kann, dass andere Verbindungen wie Memantin, die das glutamaterge System beeinflussen, keine Wirksamkeit bei ALS-Patienten aufweisen [17]. Seit der Markteinführung von Riluzol wurden in den vergangenen Jahren über 60 potentielle Medikamente zur ALS-Behandlung getestet [13]. Viele dieser getesteten Substanzen basieren auf entzündungshemmenden, antioxidativen oder neuroprotektiven Mechanismen. Für die überwiegende Mehrheit konnte jedoch keine Wirksamkeit in klinischen Studien nachgewiesen werden [12].

Im Jahre 2017 wurde ein neuer Ansatz zur ALS-Therapie mit der Markteinführung von Edaravon in Japan, Südkorea und in den Vereinigten Staaten gestartet. Edaravon wurde ursprünglich zur Behandlung von zerebralen Embolien in Japan zugelassen [12, 18]. Erst in einer zweiten klinischen Studie zur Behandlung von ALS wurde ein signifikanter, wenn auch geringer Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Placebogruppe festgestellt [19, 20]. Auch wenn der genaue Wirkmechanismus der antioxidativen Substanz nicht bekannt ist, wiesen ALS-Patienten einen geringeren Funktionsverlust nach einer 6-monatigen Behandlung mit Edaravon auf, jedoch war die begleitende Anwendung von Riluzol während dieser Studie erlaubt [20].

Die Kombination aus verschiedenen Therapieansätzen kann zur Symptomlinderung und zur Verbesserung der Lebensqualität beitragen, dennoch ist trotz der weitverbreitenden Forschung eine Heilung der Erkrankung auch aufgrund fehlender Informationen bezüglich der Ursachen zurzeit nicht möglich und die bisher zugelassenen Medikamente zur ALS-Therapie erhöhen die Lebenserwartung lediglich um nur wenige Monate.

1.1.1 Ätiologie und Pathomechanismus von ALS

Die Ursache und der molekulare Pathomechanismus von ALS ist bis auf den Einfluss von genetischen Faktoren unklar. Neben der genetischen Prädisposition werden weitere Faktoren wie ein höheres Alter oder das Rauchen im Zusammenhang mit der ALS-Pathogenese diskutiert. Erkenntnisse aus der klinischen Forschung und der Grundlagenforschung deuten auf einen komplexen Prozess mit multiplen zellulären, pathogenen Mechanismen, die sich gegenseitig nicht ausschließen müssen. Darunter zählen u.a. Störungen bzw. Beeinträchtigungen der RNA-Prozessierung, der Proteostase und des axonalen Transports. Aber auch Proteinaggregation, mitochondriale Dysfunktion, Excitotoxizität, oxidativer Stress und Neuroinflammation werden mitunter als Komponenten des komplexen Pathomechanismus von ALS benannt [8, 12] (Abbildung 1).

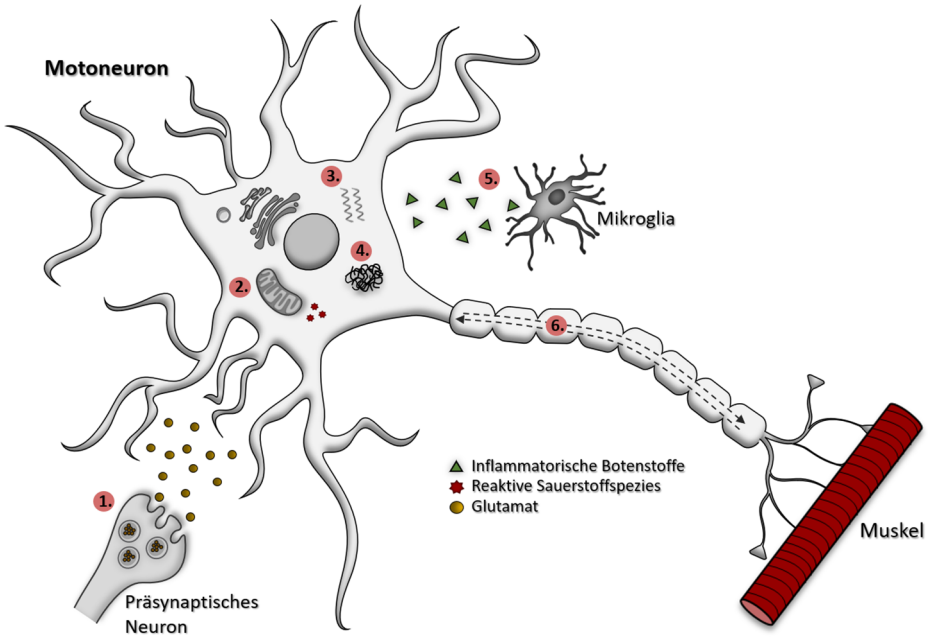


Abbildung 1: Überblick einiger zellulärer, pathogener Prozesse, die im Zusammenhang des komplexen Pathomechanismus von ALS diskutiert werden. Hervorgehoben sind einige pathogene Prozesse, die zur Degeneration des hier schematisch dargestellten Motoneurons beitragen. So werden Excitotoxizität (**1.**), mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress (**2.**), Beeinträchtigungen der RNA-Prozessierung (**3.**) und der Proteinhomöostase, sowie Proteinaggregation (**4.**), Neuroinflammation (**5.**) als auch eine Beeinträchtigung des axonalen Transportes (**6.**) mitunter als Komponenten des komplexen Pathomechanismus von ALS benannt [12].
Einige der hier verwendeten Objekte wurden von Servier Medical Art frei zur Verfügung gestellt und stehen unter einer Creative Commons Lizenz (CC BY 3.0; https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.de). Die Objekte wurden modifiziert.

Genetische Faktoren

Während die meisten ALS-Fälle sporadisch auftreten, werden bei etwa 10% eine familiäre Häufung beobachtet. Nahezu alle dieser fALS-Fälle werden autosomal dominant vererbt [21]. In den letzten Jahren wurden dabei immer mehr Gene identifiziert, deren Mutationen in der ALS-Pathogenese beteiligt sind. Über 50% dieser Fälle werden durch

Mutationen in den Genen der Superoxiddismutase 1 (SOD1), *chromosome 9 open reading frame 72* (C9ORF72), *fused in sarcoma* (FUS) und *transactive response DNA binding protein 43 kDa* (TDP-43) verursacht [22, 23]. Genetische Risikofaktoren werden jedoch auch bei sporadischen ALS-Fällen diskutiert, die etwa 90% aller ALS-Fälle ausmachen. Erste Zwillingsstudien führten zu einer Schätzung der Vererbbarkeitsrate der sALS auf 0,61 [24]. Trotz einiger Forschungen ist jedoch die Relevanz einer genetischen Prädisposition bei sALS-Patienten noch nicht eindeutig geklärt.

Beeinträchtigung der RNA-Prozessierung

Durch die Entdeckung von ALS-assoziierten Mutationen in RNA-Bindeproteinen rückte eine Beeinträchtigung der RNA-Prozessierung in den Fokus der Diskussion zur ALS-Pathogenese. Viele dieser ALS-assoziierten RNA-Bindeproteine wie die im Nukleus-lokalisierten Proteine TDP-43 und FUS sind u.a. an der Bildung von Stressgranula beteiligt [25-27]. Solche Stressgranula sind dynamische, membranlose Kompartimente, die im Cytoplasma unter zellulärem Stress wie Nährstoffmangel oder oxidativem Stress transient gebildet werden, um die Translation von spezifischen mRNAs zu verhindern. Durch die temporäre Inhibierung der Translation von nicht-essentiellen mRNAs wird das Überleben der Zelle gewährleistet und die RNA-Prozessierung wird fortgesetzt, sobald die Zelle keinen Stressbedingungen mehr ausgesetzt ist [28, 29]. Einige Studien weisen jedoch bei ALS-assoziierten Mutationen u.a. in FUS und TDP-43 auf eine Beeinträchtigung der RNA-Prozessierung und der Regulation von Stressgranula hin [26, 30]. Solche Stressgranula, die durch ALS-assoziierte Varianten der RNA-Bindeproteine gebildet werden, sind in ihrer Dynamik beeinträchtigt und verbleiben als unlöslicher Komplex, was wiederum eine vermehrte Akkumulation von weiteren RNA-Bindeproteinen in Stressgranula fördert und so zur Anhäufung von toxischen Aggregaten führt [29, 31]. So wurde beispielsweise anhand von Analysen postmortaler Gewebeproben eine Co-Lokalisation von Stressgranula-Markern und TDP-43-Inklusionen [32] und eine Anhäufung von cytoplasmatischen Inklusionen bestehend aus FUS-Varianten im Rückenmark von ALS-Patienten gefunden [33], womit ein Zusammenhang einer Beeinträchtigung der RNA-Prozessierung und der ALS-Pathogenese dargelegt wird.

Proteinaggregation und Beeinträchtigung der Proteinhomöostase

Histopathologische Merkmale sowohl bei sALS- als auch bei fALS-Patienten sind intrazelluläre Einschlusskörper in degenerierenden Neuronen und Gliazellen [8]. Viele ALS-assoziierte Mutationen in den Genen von SOD1, C9ORF72 oder TDP-43 führen zur Fehlfaltung und Aggregation der jeweiligen Proteine. Dabei wurden jene Proteinaggregate

in einigen Neuronen von ALS-Patienten vorgefunden [12]. Das Vorhandensein solcher vermehrten, unlöslichen Proteinaggregate u.a. in degenerierten Motoneuronen weist auf eine Störung der Degradationsprozesse - der Autophagie und des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) - hin, die die Proteinhomöostase regulieren [12, 34]. Während der Prozess der Autophagie u.a. für die Degradation von cytoplasmatischen Organellen sowie langlebigen Proteinen verantwortlich ist [35], werden vor allem kurzlebige sowie lösliche Proteine [34] innerhalb des UPS-Signalweges für den Abbau durch Ubiquitinierung markiert bevor diese vom Proteasom erkannt und degradiert werden [36]. Es wurde eine erhöhte Autophagie-Aktivität, die mit der Menge an ALS-assoziierten Inklusionen korreliert [37], sowie Ubiquitin-markierte TDP-43-Inklusionen [38] in Neuronen von ALS-Patienten identifiziert. Auch wenn die Bedeutung von Proteinaggregation in der ALS-Pathogenese bekannt ist, ist der genaue Mechanismus hinsichtlich der Toxizität der Aggregate noch ungeklärt. Jedoch weist das vermehrte Auffinden von Ubiquitin-haltigen Aggregaten bei ALS-Patienten auf ein gestörtes bzw. überlastetes System zur Regulierung der Proteinhomöostase hin [12].

Beeinträchtigung des axonalen Transportes

Axonaler Transport beschreibt den Transport von intrazellulären Substanzen wie z.B. von Proteinen, Lipiden oder auch Mitochondrien entlang des Axons eines Neurons und ist somit essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur und deren Funktion [39, 40]. Während der axonale, anterograde Transport wichtig für die Versorgung der Synapsen mit beispielsweise neu-synthetisierten Proteinen ist, ist der retrograde Transport zum Zellsoma u.a. an der Beseitigung von fehlgefalteten oder aggregierten Proteinen aus dem Axon beteiligt [41]. Nicht selten werden Beeinträchtigungen des axonalen Transportes bei neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet [42]. Histologische Untersuchungen mit postmortalen Gewebeproben zeigten eine abnormale Anhäufung von intrazellulären Bestandteilen wie z.B. von aggregierten Mitochondrien in einigen Neuronen von ALS-Patienten [43]. Darüber hinaus gibt es weitere Studien mit SOD1-transgenen Mausmodellen, die eine Beeinträchtigung des axonalen Transportes als Teil der ALS-Pathologie belegen [44, 45].

Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird als ein auslösender Faktor im Zusammenhang der ALS-Pathogenese diskutiert [46, 47]. Die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies, die vor allem in Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung gebildet werden, führt zur Schädigung von Makromolekülen und somit zum Zelltod [12]. Immunohistologische Studien

zeigten, dass biochemische Veränderungen wie Lipidperoxidation oder Glykooxidation von Proteinen in postmortalen Gewebeproben vermehrt in Motoneuronen des Rückenmarks von sALS-Patienten vorlagen [48]. Eine solche oxidative Schädigung durch freie Radikale bzw. durch einen abnormalen, oxidativen Metabolismus ist auf eine Störung der mitochondrialen Funktion zurückzuführen, welche wiederum u.a. durch aggregierende Produkte von ALS-assoziierten Genen verursacht wird [49]. Untersuchungen der Mitochondrien der Skelettmuskulatur von sALS-Patienten wiesen eine verminderte Aktivität des Komplexes I (NADH-Dehydrogenase) [50] und des Komplexes IV (Cytochrom-c-Oxidase) [51] der mitochondrialen Atmungskette auf. Des Weiteren wurden vermehrt Mutationen in mitochondrialer DNA im Rückenmark von ALS-Patienten gefunden [52], womit die Bedeutung der mitochondrialen Dysfunktion zur ALS-Pathologie verdeutlicht wird.

Excitotoxizität

Excitotoxizität ist ein pathophysiologischer Prozess, der durch andauernde Stimulation von Glutamat-Rezeptoren zur neuronalen Degeneration führt [9, 53]. Es wird vermutet, dass die erhöhte Freisetzung von Glutamat und somit die Überreizung der Glutamat-Rezeptoren zu einem erhöhtem Calciumeinstrom in die Neuronen führt, was wiederum zum Tod der Nervenzelle führt [54]. Ein veränderter Glutamatspiegel ist jedoch bei ALS-Patienten nicht allein für die Erkrankung verantwortlich. Auch wenn der Glutamatspiegel bei einigen ALS-Patienten erhöht ist [55, 56], ist der direkte Zusammenhang zur ALS-Pathologie umstritten, da klinische Studien zur Wirksamkeit von weiteren Medikamenten neben Riluzol mit anti-excitotoxischen Eigenschaften, wie z.B. Memantin, keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf von ALS-Patienten aufwiesen [12, 17, 53].

Neuroinflammation

Neuroinflammatorische Prozesse werden immer häufiger im Kontext der ALS-Pathogenese diskutiert. Gekennzeichnet ist die Neuroinflammation u.a. durch die Aktivierung der Mikroglia und der damit verbundenen, vermehrten Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, was zum neuronalen Verlust führt [57]. Eine Anhäufung an Zytokinen wurde u.a. in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Rückenmark von ALS-Patienten gefunden [58, 59]. Des Weiteren zeigten auch *in vivo*-Studien mit Hilfe von bildgebenden Verfahren Hinweise auf eine übermäßige Aktivierung von Mikroglia bei ALS-Patienten [60, 61]. Dennoch scheiterten bisher immunmodulatorische ALS-Therapien mit neuroprotektiven Wirkstoffen wie Celexocib in klinischen Studien [13, 62].

1.2 Humane Superoxiddismutase 1 (hSOD1)

1.2.1 Physiologische Funktion und struktureller Aufbau von hSOD1

Die Superoxiddismutase 1 (SOD1) ist ein ubiquitäres, antioxidatives Enzym und wurde erstmals durch Fridovich und McCord im Jahre 1969 beschrieben [63]. SOD1 ist vor allem im Cytosol, aber auch im Nukleus, in den Peroxisomen und im mitochondrialen Intermembranraum eukaryotischer Zellen als auch im periplasmatischen Raum bakterieller Zellen zu finden [64, 65].

Das Gen der humanen SOD1 (hSOD1) ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert und codiert für ein 32 kDa schweres, dimeres Metalloenzym [65]. Das Protein bindet je ein Kupfer- und ein Zinkion pro Monomer, die für die katalytische Aktivität bzw. Struktur wichtig sind. Die enzymatische Funktion von hSOD1 besteht darin, die Disproportionierung von zwei Hyperoxidanionen, welche als Nebenprodukt aus der zellulären Atmungskette resultieren, zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid zu katalysieren (Abbildung 2). Die Katalyse findet dabei in einem zweistufigen Prozess durch die Reduktion und anschließende Reoxidation des katalytisch aktiven Kupfers statt. Im ersten Schritt wird ein Hyperoxidanion durch Cu(II) oxidiert, wodurch molekularer Sauerstoff entsteht. Im zweiten Schritt wird dann das so reduzierte Cu(I) durch ein weiteres Hyperoxidanion wieder oxidiert und es entsteht Wasserstoffperoxid, welches anschließend von weiteren Enzymen wie von Katalasen reduziert wird. Das hochkonservierte Enzym dient somit zur Reduzierung des oxidativen Stresses in der Zelle [65-68].

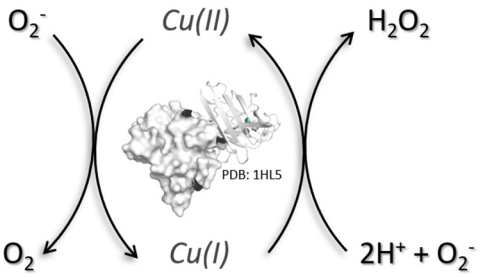


Abbildung 2: Darstellung der Disproportionierungsreaktion der humanen Superoxiddismutase 1. hSOD1 katalysiert mit Hilfe des gebundenen Kupfers die Umwandlung von zwei Hyperoxidanionen (O_2^-) zu molekularem Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Jede Untereinheit von hSOD1 besteht aus 153 Aminosäuren und zeichnet sich durch ein achtsträngiges β-Fass Strukturmotiv (*Greek key β-barrel*) mit je sieben Loops und einer kurzen α-Helix aus [64, 69-71] (Abbildung 3). Zwei dieser Loops, die auch als elektrostatischer Loop (Aminosäureposition 122-143) und Zink-Loop (Aminosäureposition 49-84) bezeichnet werden, weisen dabei funktionell wichtige Eigenschaften auf. Diese sind für die Koordination der Metallionen und somit auch für die Substratumsetzung essentiell [72]. Der Zink-Loop (Loop IV) koordiniert das für die Struktur und Stabilität wichtige Zinkion, welches von den Aminosäuren His63, His71, His80 und Asp83 in einer tetraedrischen Geometrie gebunden wird [65]. Der elektrostatische Loop (Loop VII) besitzt mehrere geladene Aminosäuren, die die Weiterleitung des Substrates über elektrostatische Anziehung an das katalytisch aktive Zentrum ermöglichen [67]. In der oxidierten Form von Kupfer, Cu(II), fungiert die Imidazol-Gruppe des Histidins an Position 63 als zweiwertiger Ligand und verbindet die beiden in räumlicher Nähe vorliegenden Metallionen über Wasserstoffbrückenbindungen. Das Cu(II) nimmt hierbei eine fünffache Koordinierung ein und wird neben dem His63 zusätzlich von den Aminosäureresten His46, His48 und His120 und einem Wassermolekül gebunden. Im Zuge der katalysierten Reaktion wird die Bindung vom Kupfer zum His63 unterbrochen, wodurch das reduzierte Kupfer, Cu(I), in eine dreifache Koordinierung mit einer nahezu trigonalen planaren Bindungsgeometrie übergeht [64, 65, 73]. Dabei stabilisiert ein Netzwerk an Wasserstoffbrücken die Struktur um die Metallionen und verbindet die Metallbindungsregionen mit anderen funktionell wichtigen Regionen des Proteins. So werden beispielsweise die beiden Metallionen zusätzlich neben dem gemeinsamen Imidazolliganden über sekundäre Wasserstoffbrücken ausgehend vom Aspartat an Position 124 über das His46 und His71 miteinander verbunden [65]. Neben der Dimerisierung und der Insertion der Metallionen besitzt hSOD1 noch eine weitere posttranslationale Modifikation. In jeder Untereinheit wird zwischen den Aminosäureresten Cys57 und Cys146 eine intramolekulare Disulfidbrücke ausgebildet, die für intrazelluläre Proteine aufgrund der reduzierenden Bedingungen des Cytosols eher untypisch ist. Die intakte Disulfidbrücke ist dabei essentiell für die Struktur und Stabilität des Dimers [74, 75]. Durch die Ausbildung der Disulfidbrücke wird der Zink-Loop über das Cys57 an das zentrale β-Sandwich verankert [70, 74]. Darüber hinaus ist der erste Bereich des Zink-Loops (Position 50-54) Teil der Dimer-Grenzfläche [74]. Die Dimer-Grenzfläche wird dabei durch nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert [65].

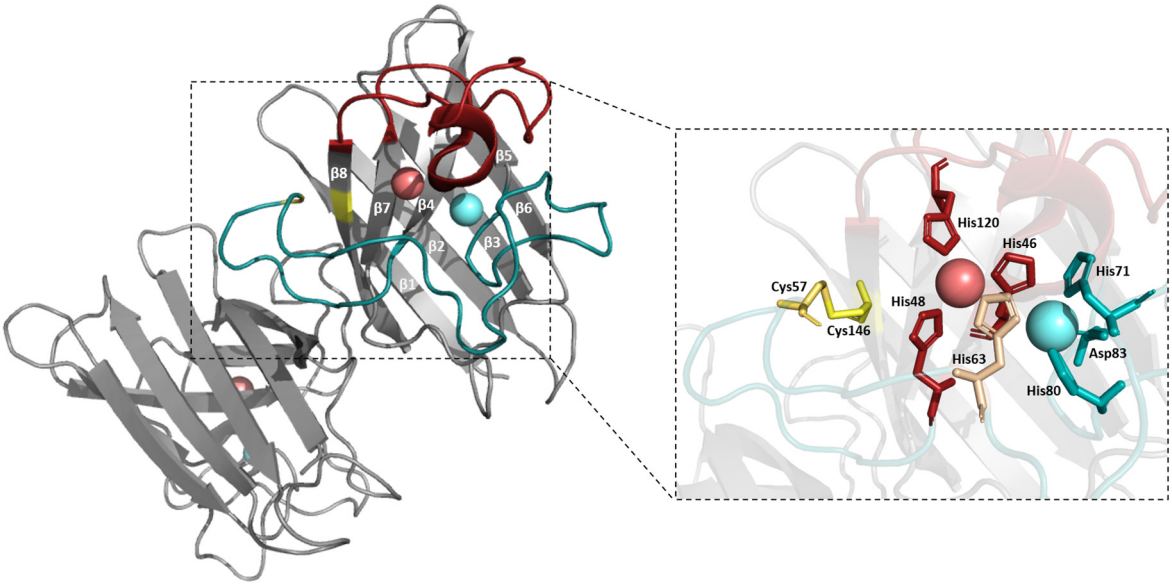


Abbildung 3: Kristallstruktur des nativen hSOD1-Dimers mit den gebundenen Metallionen Kupfer (rosa) und Zink (hellcyan) (PDB Eintrag: 1HL5). Jedes Monomer besteht aus 153 Aminosäuren und zeichnet sich durch ein achtsträngiges β-Fass Strukturmotiv (*Greek key β-barrel*) mit 7 Loops und einer kurzen α-Helix aus. Die beiden funktionell wichtigen Loops, der Zink-Loop bzw. Loop IV und der elektrostatische Loop bzw. Loop VII, sind in Cyan bzw. Rot dargestellt. In Gelb sind die Positionen der beiden Cysteine Cys57 und Cys146 gezeigt, die eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden, wodurch der Zink-Loop an das zentrale β-Sandwich verankert wird. Hervorgehoben sind die Aminosäuren, die an der Bindung von Kupfer und Zink beteiligt sind. Das Zinkion wird von den Aminosäuren His71, His80, Asp83 (cyan) und His63 (beige) gebunden. In der oxidierten Form von Kupfer fungiert das His63 als zweiwertiger Ligand und bindet zusammen mit den Aminosäuren His46, His48 und His120 (rot) das Cu(II). Im Zuge der katalysierten Reaktion wird die Bindung des His63 zum Cu(I) unterbrochen [64, 65, 70].
Die hier dargestellte Struktur von hSOD1 wurde mit Hilfe der Software PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0.5 Schrödinger, LLC) erstellt.

Die zuvor genannten posttranslationalen Modifikationen wie die Insertion der Metallionen, die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke und die Dimerisierung sind für die Proteinfaltung und -stabilität von hSOD1 wichtig [76, 77] und führen dazu, dass das native Protein u.a. in 8 M Urea oder 1% SDS nicht denaturiert [65] und je nach Beladungszustand eine Schmelztemperatur bis zu 84 °C aufweist [78]. Der genaue Reifungsprozess zum vollständig prozessierten Holoenzym ist jedoch bisher nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass im ersten Schritt der Prozessierung hSOD1 zunächst als Apoprotein apoSOD1^{2SH}, d.h. als Monomer ohne inserierte Metallionen und mit reduzierter Disulfidbrücke in Lösung vorliegt und Zink aufnimmt [76, 79]. Der Mechanismus zur Zinkinsertion selbst ist unbekannt, jedoch wird eine Beteiligung von Metallothioneinen vermutet [72, 80]. Die anschließende Kupferinsertion von E,Zn-SOD1^{2SH} zu Cu,Zn-SOD1^{2SH} und die nachfolgende Oxidation der Disulfidbrücke zu Cu,Zn-SOD1^{S-S} wird durch die Beteiligung eines Chaperons ermöglicht. Das sogenannte SOD1-spezifische Chaperon *Copper Chaperon for SOD1* (CCS), welches aus 3 essentiellen Domänen aufgebaut ist, formt einen transienten heterodimeren Komplex mit hSOD1, um dessen Reifung zu erleichtern [79, 81]. Die Domänen 1 und 3 der CCS sind sowohl an der Kupferbereitstellung und am Kupfertransport als auch an der Ausbildung der Disulfidbrücke beteiligt, während

die Domäne 2 eine 50%ige Sequenzidentität zu SOD1 aufweist und die Erkennung und Bildung des SOD1-CCS-Komplexes vermittelt [79]. Obwohl in den meisten Fällen CCS an dem korrekten Einbau des Kupfers und an der Ausbildung der Disulfidbrücke in hSOD1 beteiligt ist [81, 82], wiesen Carroll *et al*. auch einen CCS-unabhängigen Mechanismus zur Prozessierung des hSOD1-Holoenzyms nach, welcher reduziertes Glutathion erfordert [83]. Auch wenn der genaue Mechanismus zur Reifung der nativen Konformation von hSOD1 nicht abschließend aufgeklärt ist, sind die posttranslationalen Modifikationen von hSOD1 für die Struktur und Stabilität von essentieller Bedeutung.

1.2.2 hSOD1-assoziierte ALS

Für die Ausbildung der nativen, enzymatisch aktiven Form von hSOD1 sind die zuvor genannten posttranslationalen Modifikationen wie die Insertion der Metallionen, die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke und die Dimerisierung essentiell und das vollständig prozessierte Holoenzym resultiert so in einem der thermostabilsten Proteine, die bisher beschrieben worden sind [78, 84-86]. Jedoch beinhaltet der bislang nicht eindeutig geklärte Reifungsprozess zur nativen Form von hSOD1 viele Zwischenschritte und der Verlust einer oder mehreren dieser posttranslationalen Modifikationen verringert die hSOD1-Stabilität erheblich. Einige Mutationen und/oder abweichende posttranslationale Modifikationen von hSOD1 werden dabei mit der ALS-Pathogenese assoziiert, wobei der zugrunde liegende Mechanismus der hSOD1-vermittelten Toxizität noch unklar ist [77, 87, 88]. Seit der Entdeckung der ersten ALS-assoziierten Mutation im SOD1-Gen durch Rosen im Jahre 1993 [89] wurden mehr als 185 Mutationen in *sod1* identifiziert, die mit der ALS-Pathogenese in Verbindung gebracht werden [90]. Bis auf wenige Ausnahmen handelt es sich dabei um *missense*-Mutationen, die in der Regel autosomal dominant vererbt werden [91]. Etwa 1-2% aller ALS-Fälle werden durch Mutationen im hSOD1-Gen verursacht [80, 92]. Von *sod1*-Mutationen betroffen sind dabei ca. 20% aller fALS-Patienten [65, 91]. Viele ALS-assoziierten Mutationen beeinflussen die Reifung des Holoenzyms mit Auswirkung auf die Dimerisierung [93], Metallinsertion [94] und/oder Ausbildung der Disulfidbrücke [95]. So zeigten beispielsweise fALS-assoziierte Varianten von hSOD1 eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücke als die wildtypische Variante [95]. Je nach betroffener Punktmutation können sich die hSOD1-Varianten im Phänotyp, Krankheitsdauer und Schweregrad jedoch erheblich unterscheiden. So wird die A4V-Variante mit einer in den Extremitäten-beginnenden aggressiven Form der ALS assoziiert [12, 96], während Patienten, die eine homozygote Form der weltweit am häufigsten vorkommenden D90A-Variante aufweisen [97], eine vergleichsweise langsam einsetzende Parese zeigen [98]. Dahingegen weist die heterozygote D90A-Variante eine deutlich schnellere Progression der

Erkrankung auf [97, 99]. Einige Varianten, die die Metallbinderegion von hSOD1 betreffen, zeigten zudem einen Verlust der enzymatischen Aktivität. Diese Erkenntnis führte zu einer ersten Hypothese, dass die Pathogenität der ALS-assoziierten hSOD1-Varianten durch einen Funktionsverlust (*loss of function*) induziert wird, was folglich zur Akkumulation von toxischen Sauerstoffspezies führt [100]. Weitere Studien führten jedoch zu der bis heute in der Wissenschaft favorisierten Theorie, dass ein weitaus komplexerer und bislang nicht eindeutig aufgeklärter Mechanismus vorliegt, der zu einem toxischen Funktionsgewinn (*toxic gain of function*) von mutierter hSOD1 führt [101]. So wiesen *knock out*-Mäuse, in denen das Gen für SOD1 stillgelegt wurde, keinen ALS-Phänotypen auf [102]. Stattdessen zeigten transgene Mäuse, die eine ALS-assoziierte hSOD1-Variante zusätzlich zur endogenen WT-SOD1 exprimierten, eine ALS-ähnliche Neurodegeneration und Paralyse mit SOD1-Inklusionen in den Astrozyten [103]. Analysen des Rückenmarks von weiteren SOD1-transgenen Mäusen belegten eine Anhäufung von SOD1-Aggregaten und wiesen einen Verlust der Motoneuronen auf [104, 105]. Auch die Feststellung, dass sowohl in fALS- als auch in sALS-Patienten hSOD1-Aggregate bestehend aus fehlgefalteter hSOD1 in den betroffenen Motoneuronen im Rückenmark vorgefunden worden sind, bestätigt die Annahme, dass es sich hierbei um einen toxischen Funktionsgewinn resultierend aus der hSOD1-Fehlfaltung und der hSOD1-Aggregation handelt, und dass die hSOD1-Fehlfaltung ein Teil des ALS-Pathomechanismus ist [106, 107]. So führt der Verlust einer oder mehrerer posttranslationaler Modifikationen zur Destabilisierung der nativen Konformation von hSOD1 und das so entstehende Apo-Enzym weist eine deutliche Reduzierung der thermalen Stabilität auf. Es wurde zudem gezeigt, dass das Apo-Monomer als Vorläufer der Aggregation gilt [108, 109]. Auch wenn keine Mutation vorliegt, kann aufgrund des Entzugs von Metallionen, der Reduktion der Disulfidbrücke und/oder oxidative Modifikation wildtypische hSOD1 in unlösliche Aggregate *in vitro* fehlfalten [110]. So zeigten Arnesano *et al*., dass der Entzug der Metallionen, insbesondere des Zinkions, zu einer drastischen Destabilisierung des Proteins führt [84]. Tatsächlich waren Motoneuronen isoliert aus dem Rückenmark von einigen ALS-Patienten, die keine SOD1-Mutation, sondern wildtypische hSOD1 aufwiesen, gegenüber einem spezifischen Antikörper gegen fehlgefaltete SOD1 immunreaktiv [107, 111, 112]. Darüber hinaus zeigten Graffmo *et al*., dass die Überexpression von wildtypischer hSOD1 in transgenen Mäusen zu einer Ausprägung eines ALS-Phänotyps führte [113]. Mit *in vitro*-Studien und Zellkulturexperimenten wurde zudem nachgewiesen, dass fehlgefaltete hSOD1 nicht nur die Aggregation von weiteren mutierten hSOD1-Spezies, sondern auch von wildtypischer hSOD1 induzieren kann [114, 115]. Ferner wurde gezeigt, dass sich mutierte, aggregierte hSOD1 Prion-artig intrazellulär verbreiten kann, indem es die toxische Fehlfaltung von endogener SOD1 induziert [116]. Es wird vermutet, dass sich hSOD1-Spezies, die von

Neuronen und Gliazellen sezerniert werden, über die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) auf das zentrale Nervensystem ausbreiten [117]. Tatsächlich ist hSOD1 ein Bestandteil des CSF und auch wenn bisher kein Unterschied in der Menge an fehlgefalteter hSOD1 zwischen ALS-Patienten und gesunden Probanden festgestellt werden konnte [118], so konnte die Degeneration von einer Motoneuronen-ähnlichen Zelllinie mittels der Zugabe der aus sALS-Patienten isolierten Cerebrospinalflüssigkeit induziert werden [119]. Tokuda *et al*. wiesen zudem nach, dass auch wildtypische hSOD1 eine fehlgefaltete Konformation im CSF von sALS-Patienten einnehmen kann [117]. Interessanterweise wurden auch Aggregate bestehend aus fehlgefalteter, wildtypischer hSOD1 nicht nur bei sALS-Patienten, sondern auch bei fALS-Patienten mit keiner vorliegenden SOD1-Mutation gefunden [114, 120], wodurch die Hypothese bekräftigt wird, dass toxische Varianten der wildtypischen hSOD1 resultierend aus der Destabilisierung und Fehlfaltung der nativen Konformation Teil des ALS-Pathomechanismus sind. Ob nun die finalen Proteinaggregate und/oder auch die löslichen Zwischenstufen der fehlgefalteten Form von hSOD1 toxisch sind, ist in der Literatur ein kontroverses Thema [108, 121-123]. Rakhit *et al.* zeigten, dass die oxidative Schädigung der wildtypischen hSOD1 *in vitro* unter physiologischen Bedingungen zu einer Destabilisierung und Aggregation des Proteins führt. Dabei zeigten sie, dass sowohl mutierte als auch wildtypische hSOD1 vor der Aggregation in ein fehlgefaltetes, monomeres Zwischenprodukt dissoziiert [108]. Auch *in vivo* Daten wiesen auf monomere, fehlgefaltete hSOD1 in transgenen Mäusen und in fALS-Fällen mit SOD1-Mutation hin [124, 125]. Dahingegen wurde monomere, fehlgefaltete hSOD1 in sALS- und fALS-Fällen ohne vorliegende SOD1-Mutation bislang nicht detektiert [123, 125].

Wenn auch die genaue Bedeutung der toxischen Varianten von hSOD1 bzw. der zugrunde liegende Pathomechanismus bisher nicht eindeutig geklärt sind, deutet das Vorfinden von fehlgefalteter hSOD1 auch bei ALS-Fällen mit keiner vorliegenden SOD1-Mutation auf einen gemeinsamen Pathomechanismus hin und verweist so auf eine zentrale Rolle der hSOD1-Fehlfaltung und deren Aggregation in der ALS-Pathogenese [126].

1.2.3 Stabilisierung der nativen hSOD1-Konformation als Ansatz zur Behandlung der hSOD1-assoziierten ALS

Mehrere Erkenntnisse der letzten Jahre verdeutlichen die Beteiligung der hSOD1-Fehlfaltung und dessen Aggregation durch Destabilisierung an der hSOD1-assoziierten ALS-Pathogenese [108, 114, 115, 117]. Aus diesem Grund ist die Stabilisierung der nativen hSOD1-Konformation ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung der hSOD1-assoziierten ALS-Erkrankung, um so die Bildung von toxischen hSOD1-Spezies zu verringern, wenn nicht sogar zu verhindern.

Ein ähnlicher Ansatz wurde bereits in der Transthyretin (TTR)-assoziierten Amyloidose verfolgt. Es wurde gezeigt, dass das tetramere Protein vor der Fehlfaltung und Aggregation in Monomere dissoziiert [127]. Die Bindung kleiner, spezifischer Moleküle führte jedoch zur Stabilisierung der nativen Konformation des Proteins und erhöhte die kinetische Barriere zur Tetramerdissoziation, wodurch die Amyloidose *in vitro* verhindert werden konnte [128, 129]. Einige Studien wiesen zudem auch *in vivo* einen Effekt hinsichtlich der Stabilisierung des nativen TTR-Konformationszustandes nach [130, 131]. Zur Identifizierung solcher Liganden zur Stabilisierung der nativen Konformation von hSOD1, haben Ray *et al.* Computersimulationsexperimente durchgeführt und waren in der Lage, kleine Moleküle zu finden, die dimere hSOD1 binden und stabilisieren [132]. Mit *in vitro*-Experimenten konnte bereits ein stabilisierender Effekt einiger dieser Moleküle gegenüber der A4V-Variante mit Einfluss auf deren Aggregation gezeigt werden [133].

In den letzten Jahren rückten Peptide immer mehr in den Fokus zur Anwendung als potentielle Pharmazeutika [134, 135]. Therapeutische Peptide, die im Allgemeinen als Moleküle mit weniger als 50 Aminosäuren definiert werden [136, 137], können aus mehreren Quellen gewonnen werden [134]. So können diese von den natürlich vorkommenden Peptidhormonen oder von Fragmenten größerer Proteine, die von Pflanzen oder vom Menschen selbst produziert werden, abgeleitet werden, als auch aus rekombinanten oder chemischen Bibliotheken isoliert werden [134, 136]. Dabei weisen Peptide gegenüber kleinen Molekülen (*small molecules*) und gegenüber größeren Biopharmaka einige Vorteile auf. Während kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 500 Da eine geringere Selektivität zum Zielprotein aufweisen, besitzen Biopharmaka (>5000 Da) den Nachteil, dass diese mit erhöhten Herstellungskosten verbunden sind und in der Regel als Therapeutika oral nicht bioverfügbar sind und intravenös verabreicht werden müssen. Dahingehen besitzen therapeutische Peptide das Potenzial, die Vorteile der beiden zuvor beschriebenen Klassen zu vereinen, wie die Spezifität von Biopharmaka kombiniert mit einer geringeren Molekülgröße und niedrigeren Produktionskosten [137]. Zudem zeigt die Anwendung in Menschen eine hohe Sicherheit und Verträglichkeit, sodass Peptide einen geeigneten Ausgangspunkt für die Entwicklung von potentiellen Therapeutika

darstellen [135]. Jedoch besitzen therapeutische Peptidkandidaten bestehend aus L-Aminosäuren den Nachteil, dass sie im Allgemeinen empfindlicher gegenüber Proteasen sind und so eine geringere Halbwertszeit aufweisen [138]. Im Gegensatz dazu besitzen Peptide, die aus D-Aminosäuren aufgebaut sind, eine erhöhte Stabilität gegenüber der Proteolyse [139], was wiederum in einer erhöhten Bioverfügbarkeit resultieren kann.

Die Wirksamkeit von D-Peptiden wurde bereits am Beispiel von Aβ(1-42), dessen toxische Spezies an der Pathogenese der Alzheimerschen Demenz beteiligt sind, erfolgreich demonstriert. Mit Hilfe eines spezifischen D-Peptids, des RD2, konnte die Bildung von toxischen Aβ-Spezies reduziert werden. *In vitro*-Daten zeigten, dass das Peptid in der Lage ist, monomeres Aβ(1-42) zu binden und die Bildung von Aβ-Fibrillen konzentrationsabhängig zu inhibieren. Zusätzlich wurden mit Hilfe des Peptids bereits bestehende toxische Oligomere aufgelöst [140] und Mausstudien belegten ebenfalls eine signifikante Reduktion von toxischen Aβ-Oligomeren, sowie eine Verbesserung der kognitiven Eigenschaften bei Verabreichung des Peptids [140-142].

Somit stellt zusammenfassend die Stabilisierung der nativen Konformation von hSOD1 durch Peptidliganden einen vielversprechenden Ansatz zur ALS-Therapie dar, bei der die Bildung von toxischen hSOD1-Spezies reduziert bzw. ganz verhindert werden soll (Abbildung 4).

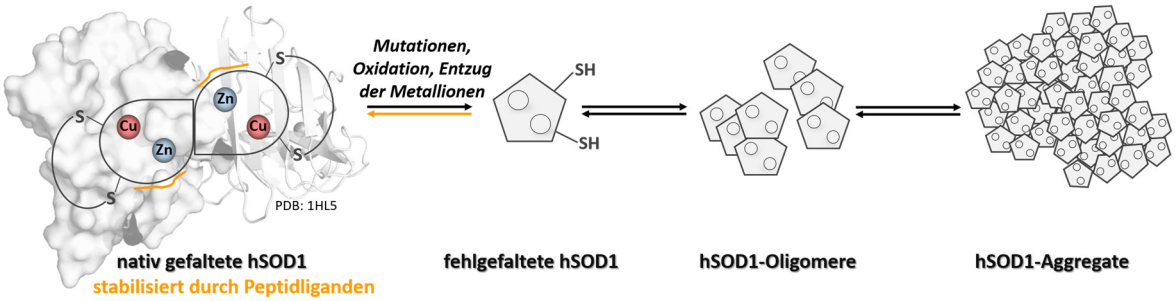


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Strategie zur Behandlung der hSOD1-assoziierten ALS durch die Stabilisierung der nativen Konformation von hSOD1 mittels Peptidliganden. Mutationen und/oder posttranslationale Modifikationen wie z.B. Oxidation und/oder der Entzug der Metallionen (Cu: rot und Zn: blau) führen zur Destabilisierung der nativen Konformation von hSOD1 und zur hSOD1-Fehlfaltung, die in der Bildung von hSOD1-Oligomeren und hSOD1-Aggregaten resultiert. Diese toxischen hSOD1-Spezies sind an der hSOD1-assoziierten ALS-Pathogenese beteiligt. Durch die Bindung von Peptidliganden (gelb) der nativen Konformation von hSOD1 soll trotz destabilisierenden Bedingungen das Holoenzym in seiner nativen Konformation stabilisiert und so die Bildung von toxischen hSOD1-Spezies verringert bzw. verhindert werden.

1.3 Phagendisplay

Zur Identifizierung geeigneter Peptidliganden, die in der Lage sind, ein Zielmolekül zu binden, findet die Methode Phagendisplay ihre Anwendung. Phagendisplay beschreibt eine biotechnologische Methode, bei der rekombinante Bibliotheken bestehend aus Peptiden, Proteinen oder Proteinfragmenten auf der Oberfläche von Bakteriophagen (kurz: Phagen) präsentiert werden [143, 144].

Phagendisplay besitzt viele Anwendungsmöglichkeiten u.a. in der Analyse von Protein-Protein- oder Protein-Peptid-Interaktionen [145], in der Entwicklung von Impfstoffen [146] oder in der Identifizierung von Enzyminhibitoren [147]. Darüber hinaus wird mittels Phagendisplay eine schnelle Identifizierung von Bindungspartnern eines Zielproteins ermöglicht [148], die die biochemischen Eigenschaften des Targets beeinflussen können. Eine Bindung von Peptidliganden an allosterische Bindetaschen oder an das aktive Zentrum des Proteins kann beispielsweise zur Erhöhung der Proteinstabilität führen [149]. Aus diesem Grund sind mittels Phagendisplay identifizierte Peptide von großer Bedeutung vor allem in der Entwicklung von Therapeutika.

Insbesondere der filamentöse Phage M13, der die Aufnahme von fremder DNA ins eigene Genom toleriert, wird für das Phagendisplay verwendet. Der Phage M13 besteht aus einer einzelsträngigen DNA mit einer Größe von 6407 nt und neun Genen [150], die für 11 verschiedene Proteine codieren. Fünf der Proteine sind Hüllproteine, während die restlichen Proteine an der Replikation und Assemblierung des Phagens beteiligt sind [151]. Das Hüllprotein pVIII umgibt mit etwa 2700 Einheiten die DNA, während die Hüllproteine pVII und pIX am distalen Ende bzw. pIII und pVI am proximalen Ende des Phagens in fünf Kopien vorliegen [151] (Abbildung 5, A). Durch die Fusion der randomisierten DNA-Sequenzen der Peptidliganden mit dem Gen eines der Hüllproteine des Phagens entsteht eine direkte Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp [152]. Die Fusion erfolgt meistens über das Hüllprotein pIII oder pVIII. Die Verwendung des Haupthüllproteins pVIII ermöglicht eine Präsentation der Fusionspartner in tausender Ausführung, besitzt jedoch den Nachteil, dass nur kurze Peptidsequenzen bestehend aus 6 bis 7 Aminosäuren ohne Cysteine integriert werden können, da sonst die Assemblierung des Phagens behindert wird. Am häufigsten wird daher das Hüllprotein pIII am proximalen Ende des Phagens zur Integration der Peptidsequenzen verwendet, welches die Präsentation auch von größeren Liganden in fünffacher Ausführung erlaubt [152, 153]. Die Klonierung der randomisierten DNA-Sequenzen in das Leseraster des Gens codierend für eines der Hüllproteine ermöglicht so die Präsentation von Peptidbibliotheken auf der Phagenoberfläche. Die Nutzung einer von Phagen-präsentierenden Peptidbibliothek erlaubt folglich die Präsentation verschiedener Peptidvarianten und das Screening nach geeigneten Bindungspartnern in kurzer Zeit [152]. Hierfür wird das zu untersuchende Zielprotein auf

einer festen Oberfläche immobilisiert und mit der Phagenbibliothek inkubiert. Durch mehrere Waschschritte werden ungebundene Phagen entfernt. Phagen, die an das Zielprotein binden, werden durch geeignete Pufferbedingungen eluiert und durch die Infektion von Bakterienzellen amplifiziert (Abbildung 5, B). Der Bakteriophage M13 gehört zu den filamentösen Phagen, der gramnegative Bakterien infizieren kann, die einen Fertilitätsfaktor (F-Plasmid) tragen. Durch die Bildung des sogenannten F-Pilus wird die Konjugation zwischen dem Bakteriophagen und der Bakterienzelle ermöglicht [154]. Innerhalb des geeigneten Wirtsorganismus wird anschließend die einzelsträngige Phagen-DNA zusammen mit der fusionierten Nukleotidsequenz des jeweiligen Peptides amplifiziert [151]. Da die randomisierte DNA-Sequenz der potentiellen Liganden in das Phagengenom integriert ist, ist schließlich eine Identifizierung der entsprechenden Peptidsequenz durch Sequenzierung der isolierten Phagen-DNA möglich. Die Durchführung mehrerer Selektionsrunden ermöglicht dabei die Selektion von Peptidvarianten, die aufgrund einer höheren Bindungsaffinität zum Zielprotein unter den gegeben Bedingungen einen Selektionsvorteil gegenüber jenen Phagen besitzen, deren Peptid weniger affin an das Zielprotein bindet. Geeignete Kontrollselektionen ermöglichen darüber hinaus eine deutlich effizientere Beurteilung des Selektionserfolges und erleichtert ferner die Identifizierung von Target-bindenden Peptiden gegenüber jenen Peptiden, die sich beispielsweise aufgrund einer Affinität zu der für die Target-Immobilisierung verwendeten Oberfläche angereichert haben [155].

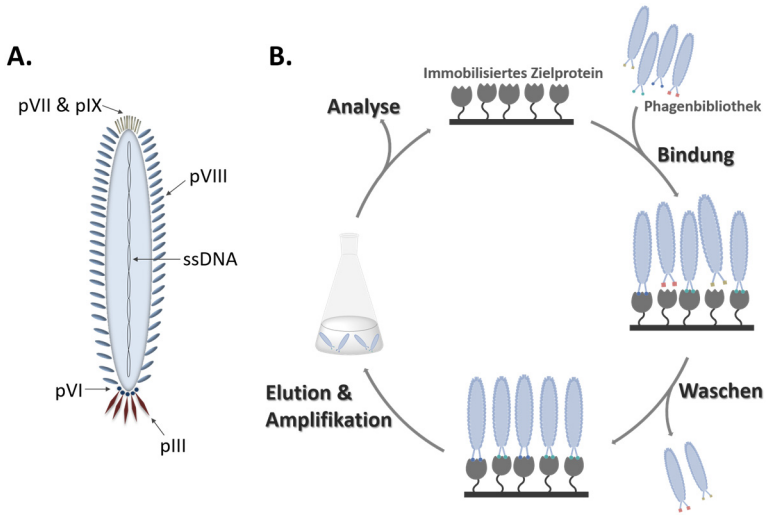


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des filamentösen Bakteriophagen M13 und Skizzierung einer Phagendisplay-Selektion. A. Das Genom des Phagen M13 codiert für 11 Proteine, von denen fünf Hüllproteine sind. Die einzelsträngige DNA ist umgeben von mehreren Tausend Kopien des Hüllproteins pVIII. Die Hüllproteine pVII und pIX am distalen Ende bzw. pVI und pIII am proximalen Ende des Phagens liegen in fünffacher Ausführung vor. **B.** Die Peptidliganden werden auf der Oberfläche des Bakteriophagen M13 durch die Fusion der randomisierten DNA-Sequenz mit dem Gen des Hüllproteins pIII präsentiert. Dabei weist jeder Phagenklon eine fünffache Präsentation einer bestimmten Peptidvariante auf (hier einfachheitshalber in zweifacher Aufführung dargestellt). Die Peptidbibliothek wird mit einem auf einer festen Oberfläche immobilisiertem Zielprotein inkubiert. Ungebundene Phagen werden durch stringentes Waschen entfernt. Die an das Zielprotein gebundenen Phagen werden eluiert und die so isolierten Phagen werden in einem geeigneten Wirtsorganismus amplifiziert, um anschließend in einer weiteren Selektionsrunde eingesetzt bzw. hinsichtlich der Peptidsequenzen analysiert zu werden.

1.3.1 Prozessierung der selektierten Peptide

Zur Vermeidung des proteolytischen Abbaus stehen Peptide bestehend aus D-Aminosäuren immer mehr im Fokus bei der Entwicklung von Therapeutika, da diese resistent gegenüber proteolytischem Abbau sind und somit eine erhöhte Bioverfügbarkeit im Vergleich zu L-Peptiden aufweisen. Das Spiegelbild-Phagendisplay ermöglicht die Identifizierung solcher D-enantiomeren Peptide [156]. Ähnlich zur klassischen Variante (1.3) wird das Zielprotein an eine feste Oberfläche immobilisiert und mit Hilfe einer Phagenbibliothek bestehend aus L-Peptiden nach geeigneten Bindungspartnern selektiert, jedoch liegt hier das Target als D-Enantiomer vor [157]. Das D-Enantiomer der isolierten L-enantiomeren Peptidliganden wird anschließend synthetisch hergestellt und die Interaktion mit der natürlichen L-Variante des Zielmoleküls wird durch Bindungsstudien verifiziert.

In einigen Fällen ist die Identifizierung geeigneter Peptidliganden mittels der Spiegelbild-Phagendisplay-Methode jedoch aufgrund der Größe des Zielmoleküls nicht möglich. Hier muss das Target zunächst chemisch synthetisiert werden und gewöhnlich stellen Proteine mit einer Länge von über 50-60 Aminosäuren auch unabhängig der Stereochemie eine Herausforderung in der chemischen Synthese dar [158]. Darüber hinaus weisen viele Zielproteine eine Struktur auf, deren korrekte Faltung unter Umständen nach der chemischen Synthese erst *in vitro* rekonstituiert werden muss.

Durch die Einführung der Synthese von retro-inversen D-Peptiden durch Chorev und Goodman im Jahre 1979 [159] können auch die mittels Phagendisplay selektieren L-Peptide hinsichtlich ihrer klinischen Parameter optimiert werden. Retro-inverse D-Peptide sind aus den gleichen Aminosäuren wie die entsprechenden L-Peptide aufgebaut, jedoch liegen diese in der D-enantiomeren Form in entgegengesetzter Abfolge vor (Abbildung 6). Die Verwendung von D-Aminosäuren resultiert in einer erhöhten Bioverfügbarkeit von therapeutisch eingesetzten Peptiden, welche sich aus der in D-Peptiden im Vergleich zu L-Peptiden erhöhten Resistenz gegenüber proteolytischer Degradation ergibt [160]. Aufgrund der hohen Äquivalenz der Seitenkettentopologie des retro-inversen D-Peptids zum L-Leitpeptid werden ähnliche Bindungsaffinitäten zum Zielmolekül der Isomere vermutet [161]. So wiesen bereits einige Studien eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit retro-inverser D-Peptide nicht nur gegenüber des L-Leitpeptids [162], sondern auch gegenüber der klassischen D-Variante auf, bei der die L-Aminosäuren des Ursprungspeptides lediglich in die D-enantiomere Form umgewandelt und nicht zusätzlich deren Abfolge umgekehrt wurde [163]. Weitere Modifikationen des C- und N-Terminus der retro-inversen D-Peptide können zusätzlich zu einer erhöhten Stabilität führen. Durch Acetylierung des N-Terminus und durch Amidierung des C-Terminus wiesen die so modifizierten Peptide beispielsweise eine

geringere Anfälligkeit gegenüber Amino- und Carboxyexopeptidasen auf [164, 165]. Darüber hinaus ist das synthetisch hergestellte, modifizierte, retro-inverse D-Peptid dem ursprünglichen L-Peptid, welches während des Phagendisplays C-terminal mit dem Phagen konjugiert ist und folglich keine Ladung am C-Terminus aufweist, nicht nur wie zuvor beschrieben hinsichtlich der Seitenkettentopologie, sondern auch der Nettoladung an den Endgruppen aufgrund der Modifikationen am ähnlichsten [166]. Die Verwendung von Endgruppen-modifizierten, retro-inversen D-Peptiden weist somit einige Vorteile gegenüber der klassischen L- oder D-Variante bezüglich der Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit in der Entwicklung von therapeutischen Wirkstoffkandidaten, die auf eine Stabilisierung der nativen Konformation des Zielmoleküls zielen, auf.

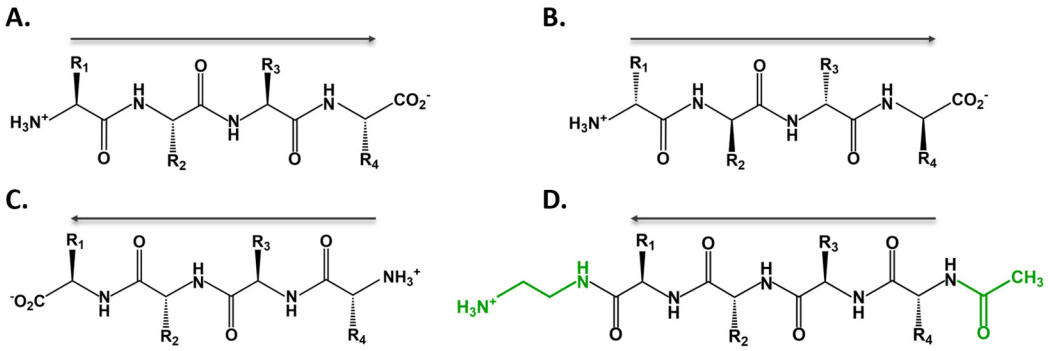


Abbildung 6: Mögliche Strukturtransformationen und Modifikationen am Beispiel eines selektierten Tetrapeptides zur Optimierung der Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit (modifiziert nach Chorev 2005 [166]). Das Peptid liegt zunächst als L-Enantiomer vor (**A**), welches ursprünglich C-terminal mit dem Phagen konjugiert ist und somit während des Phagendisplays, anders als hier abgebildet, keine Ladung am C-Terminus aufweist. Das selektierte L-Peptid wird anschließend in die D-enantiomere Form (**B**) umgewandelt und durch Umkehrung der Aminosäurenabfolge liegt das Tetrapeptid als retro-inverses D-Peptid vor (**C**), dessen Endgruppen (grün: angefügtes Diamin am C-Terminus und Acetylgruppe am N-Terminus) modifiziert werden (**D**).
Die Strukturformeln wurden mit Hilfe der Software ChemDraw Professional 16.0 gezeichnet.

2 Zielsetzung

Einige Mutationen und/oder posttranslationale Modifikationen von hSOD1 führen zur Destabilisierung und begünstigen eine Fehlfaltung des Proteins. Es wurden Aggregate, die fehlgefaltete hSOD1 enthielten, im Rückenmark von sALS- aber auch fALS-Patienten mit keiner vorliegenden hSOD1-Mutation gefunden. Dies führt zu der Hypothese, dass die hSOD1-Fehlfaltung Teil des ALS-Pathomechanismus ist. Um zu untersuchen, ob die Destabilisierung des hSOD1-Holoenzyms entscheidend für die ALS-Pathogenese ist, ist zu überprüfen, ob die Stabilisierung der nativen hSOD1-Konformation durch spezifisch bindende Liganden in der Lage ist, die hSOD1-Aggregation zu stören. Solche Liganden sollen dann die Bildung von hSOD1-Aggregaten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* inhibieren und so den Krankheitsverlauf von ALS verzögern, wenn nicht sogar verhindern.

Das übergeordnete Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist die Stabilisierung der nativen hSOD1-Konformation mittels Peptidliganden zur ALS-Therapie. Hierfür wurde zunächst die heterologe Expression von hSOD1 in *E. coli* und eine anschließende *in vitro* Rekonstitution zum Erhalt des vollständig prozessierten Holoenzyms etabliert. Der native Konformationszustand der rekonstituierten hSOD1 wurde anschließend mit Hilfe verschiedener Experimente zur Charakterisierung bezüglich der Faltung, Stabilität und Aktivität bestätigt. Die Selektion von hSOD1-bindenden Peptidliganden wurde mittels Phagendisplay ermöglicht. Dabei wurde die Methode durch weitere Kontrollselektionen erweitert und durch die Verwendung von *Next Generation Sequencing* (NGS) optimiert. Darüber hinaus wurde eine in der Arbeitsgruppe Mohrlüder entwickelte Software namens *Target Sequencing Analysis Tool* (TSAT) entwickelt, die eine effiziente Auswertung der resultierenden NGS-Daten u.a. durch die Verwendung von zwei definierten Scores ermöglicht. Ausgewählte Peptide wurden anschließend hinsichtlich der Bindung zu hSOD1 und des Einflusses auf die Bildung und Toxizität von amyloiden und nicht-amyloiden hSOD1-Aggregaten analysiert. Zusammenfassend repräsentiert die vorliegende Arbeit einen entscheidenden Schritt zur Identifizierung von hSOD1-stabilisierenden Peptidliganden für die Entwicklung von potentiellen Wirkstoffkandidaten zur ALS-Therapie.

3 Publizierte Ergebnisse

3.1 In Vitro Reconstitution of the Highly Active and Natively Folded Recombinant Human Superoxide Dismutase 1 Holoenzyme

Autoren: **Karoline Bianka Santur***, Marc M. Sevenich*, Melanie Schwarten, Volker Nischwitz, Dieter Willbold und Jeannine Mohrlüder

*Autoren sind gleichberechtigt

Journal: ChemistrySelect, veröffentlicht am 11.07.2018

DOI: https://doi.org/10.1002/slct.201801319

Impact Factor: 1,505 (2017)

Beitrag: Mitentwicklung der Experimente; Durchführung der im Manuskript enthaltenden Experimente (ausgenommen NMR- und ICP-MS-Messungen); Auswertung und Darstellung der Daten (ausgenommen NMR-Daten); Anfertigung der Abbildungen; Unterstützung beim Verfassen des Manuskripts

ChemPubSoc Europe DOI: 10.1002/slct.201801319 ChemistrySELECT Full Papers

Biological Chemistry & Chemical Biology

In Vitro Reconstitution of the Highly Active and Natively Folded Recombinant Human Superoxide Dismutase 1 Holoenzyme

Karoline B. Santur[+],[a, b] Marc M. Sevenich[+],[a, b] Melanie Schwarten,[a] Volker Nischwitz,[c] Dieter Willbold,*[a, b] and Jeannine Mohrlüder*[a]

SOD1 is an antioxidant enzyme that exists as a highly stable dimer in healthy humans. Each subunit contains an intramolecular disulfide bond and coordinates one zinc and one copper ion. The dimer is destabilized in the absence of the ions and disruption of the disulfide bond, which leads to the formation of small oligomers and subsequently larger insoluble aggregates. An acquired toxic function of destabilized SOD1 is postulated to be associated with amyotrophic lateral sclerosis (ALS), which is a neurodegenerative disease characterized by peripheral and central paralysis and by 3- to 5-year median survival after diagnosis. In this study, we present a protocol for heterologous expression of human SOD1 in *E. coli* and total reconstitution of the holoenzyme, which exhibits the highest reported specific activity (four-fold higher) of recombinant hSOD1. Biophysical characterization confirms the native state of this protein. The presented protocol provides highly active hSOD1 that will benefit *in vitro* investigations of this protein.

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal adult-onset motor neuron disease affecting both upper and lower motor neurons. Patients suffering from ALS generally die within 5 years of diagnosis because of respiratory failure.[1] ALS predominantly occurs sporadically (sALS) with ~10% of cases appearing within families (fALS), and thus arise more than once in a family lineage and are usually inherited in an autosomal dominant manner.[2] Approximately 20% of the disease causing mutations are located in the gene coding for the enzyme superoxide dismutase 1 (SOD1).[3] Aggregates of human SOD1 have been detected in the spinal cord of mutant-SOD1 fALS patients and in non-SOD1 sALS, leading to the hypothesis that SOD1 misfolding is part of a pathomechanism that is common to all types of ALS.[4]

[a] *K. B. Santur,[+] M. M. Sevenich,[+] Dr. M. Schwarten, Prof. D. Willbold, Dr. J. Mohrlüder*
Institute of Complex Systems (ICS-6)
Forschungszentrum Jülich
Germany
phone: +49 2461 612100
fax: +49 2461 612023
E-mail: d.willbold@fz-juelich.de
j.mohrlueder@fz-juelich.de
[b] *K. B. Santur,[+] M. M. Sevenich,[+] Prof. D. Willbold*
Institut für Physikalische Biologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Germany
[c] *Dr. V. Nischwitz*
Central Institute for Engineering, Electronics and Analytics (ZEA-3)
Forschungszentrum Jülich
Germany
[+] *Both authors contributed equally to this work.*
Supporting information for this article is available on the WWW under https://doi.org/10.1002/slct.201801319

The native conformation of the metalloenzyme Cu,Zn-SOD1 is a stable homodimer and functions in the conversion of superoxide to peroxide. Posttranslational modification of SOD1 includes formation of an intramolecular disulfide bond, and coordination of a zinc ion in the zinc loop and a copper ion in the active site of each subunit. A consistent pattern of glutathionylation and phosphorylation occurs in close proximity to the dimer interface of endogenous SOD1 derived from human erythrocytes.[5] All posttranslational modifications affect the monomer-dimer equilibrium of SOD1. Metal binding and an intact intramolecular disulfide bond promote dimer formation, whereas glutathionylation facilitates dissociation.[5] Natively folded human SOD1 (hSOD1) is an extremely thermostable protein. Depending on its metal content, melting temperatures up to 83 °C have been reported.[6] Structural integrity and enzymatic activity of bovine SOD is maintained in 8 M urea or in the presence of 4% SDS.[7] Protein destabilization by mutations, oxidation or deprivation of metal ions renders hSOD1 prone to dissociation and oligomerization. The resulting soluble oligomers subsequently form amorphous aggregates or even fibrils.[8] In particular, the small soluble oligomers are hypothesized to exhibit neurotoxic properties in ALS.[9]

Studies have focused on the structure and function of hSOD1 in health and disease for many years. *In vitro* approaches examining the aggregation propensity of hSOD1 and success of therapeutic agents are crucial for the development of therapeutic strategies to treat ALS. Experiments critically rely on the native fold of recombinantly expressed hSOD1. Currently, *in vitro* preparation of hSOD1 produced in *E. coli* often results in incomplete metalation levels, and strategies to improve the metal content of recombinant hSOD1 have been proposed.[5,10] Documented specific activities of the

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe

Chemistry SELECT Full Papers

heterologous expressed enzyme have not exceeded values of ~5,600 U/mg.[11]

Here, we report a procedure for total reconstitution of recombinant hSOD1 expressed in *E. coli* without using the human copper chaperone for SOD1 (hCCS). The applied reconstitution procedure partly follows established protocols.[10a,12] Notably, the oxidation state, incubation time and temperature during holoenzyme reconstitution were identified as crucial factors for ensuring an optimal metal load. The resulting isolated holoenzyme displayed the highest reported specific activity of recombinant hSOD1.

Results and Discussion

Yields and findings of the hSOD1 purification and reconstitution

Protein expression was performed in *E. coli* BL21 (DE3) (Figure 1A) and yielded about 4 g cell pellet per liter culture. The

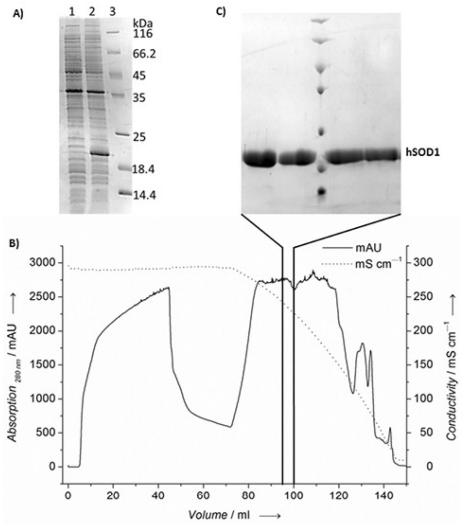


Figure 1. Expression and purification of hSOD1. A: Heterologous expression of tagless hSOD1 in *E. coli* BL21 (DE3) before (lane 1) and after induction with 1 mM IPTG and incubation overnight at 37 °C (lane 2). The molecular weight marker (26610, Thermo Fisher Scientific) is shown in lane 3. Human SOD1 migrates at about 20 kDa. B: Elution profile of the hydrophobic interaction chromatography purification of hSOD1 from the cell lysate after ammonium sulfate precipitation. Human SOD1 elutes at about 230–250 mS/cm. C: SDS PAGE of fractions containing hSOD1 with a purity of more than 98%. Marker bands correspond to Figure 1A.

tagless hSOD1 was purified via ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography. Human SOD1 was released from the Source 15PHE column at ~45% buffer B (235–224 mS/cm) (Figure 1B) and fractions containing hSOD1 with a purity of more than 98% were pooled (Figure 1C), supplemented with an equimolar amount of zinc sulfate and stored at –80 °C. The amount of purified hSOD1 obtained per gram wet cell pellet was 1.3 mg. Between 5 and 6 mg purified hSOD1 (2.5–3 mg/mL) were applied to the reconstitution protocol, which gave a final yield of 0.35–2 mg of the reconstituted holoenzyme. The SEC run (Figure 2A) resulted in a considerable loss of protein because oligomeric and monomeric species of hSOD1 are separated from the dimeric protein and could not be used in further experiments. In addition, during renaturation and copper loading a constant loss of hSOD1 was observed, which might arise from adhesion of the protein to the dialysis membrane or to the test tubes.

Holoenzyme reconstitution partly followed established protocols. Notably, reduction of hSOD1 before copper loading was crucial for improved protein renaturation. We found the incubation temperature and time of the copper loading procedure to be important factors for increasing the copper content of hSOD1 significantly. By adjusting the incubation temperature to 37 °C and by extending the incubation time to seven days we were able to reach metal loading states of ~0.7 equivalents Cu as well as ~0.7 equivalents Zn per hSOD1 monomer, as determined by ICP-MS (Table 1).

Table 1. Properties of reconstituted hSOD1 derived from three independent reconstitution events.

	Reconstitution #1	Reconstitution #2	Reconstitution #3
Cu equivalents per hSOD1 monomer	0.70 ± 0.04	0.73 ± 0.05	0.62 ± 0.01
Zn equivalents per hSOD1 monomer	0.86 ± 0.06	0.71 ± 0.05	0.64 ± 0.01
Specific activity [U/mg]	15966 ± 1888	14949 ± 594	11952 ± 1932
Normalized activity [U/mg/Cu]	22808 ± 2697	20478 ± 814	19277 ± 3116
Melting temperature [°C]	86.01	85.20	83.62

Reconstituted recombinant Cu-Zn-hSOD1 is a dimer exhibiting long time stability without the tendency to aggregate

SEC analysis with reconstituted hSOD1 was performed to investigate protein stability. Destabilized hSOD1 dissociates to monomers and these monomeric species are known to aggregate.[13] The elution profile and retention volume of the analytical SEC run indicated a homogenous hSOD1 dimer in the reconstituted sample without the presence of any mono- or oligomeric species (Figure 2B). Repetition of the experiment with a lower protein amount after sample storage for 14 weeks at 4 °C resulted in a very similar elution profile (Figure 3), which provides evidenced of a well-folded holoenzyme that exhibits longtime stability without any tendency to aggregate Structural

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe
Chemistry SELECT Full Papers

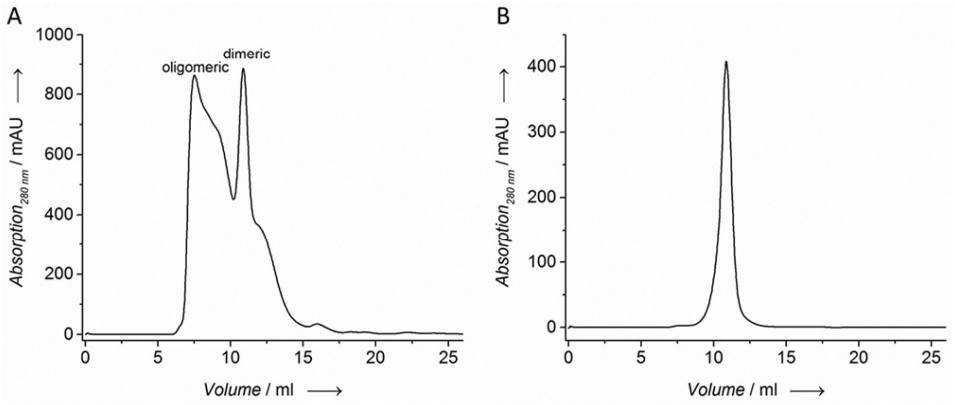


Figure 2. Isolation of the hSOD1 dimer via SEC. A: Reconstituted human SOD1 was loaded onto a superdex 75 10/30 HR column pre-equilibrated with 50 mM sodium acetate, pH 6.0, and a flow rate of 0.25 mL/min. The dimeric enzyme eluted at about 10.8 mL. Fractions containing dimeric hSOD1 (elution volume of 10.5–11.2 mL) were pooled. Oligomeric species (6–10 mL retention volume) and hSOD1 that eluted after 11.2 mL were discarded. B: 80 µL of hSOD1 (237 µM dimer) was applied to a superdex 75 10/30 HR column immediately after reconstitution. A homogenic peak with a retention volume of about 10.8 mL representing the dimeric state of hSOD1 was observed.

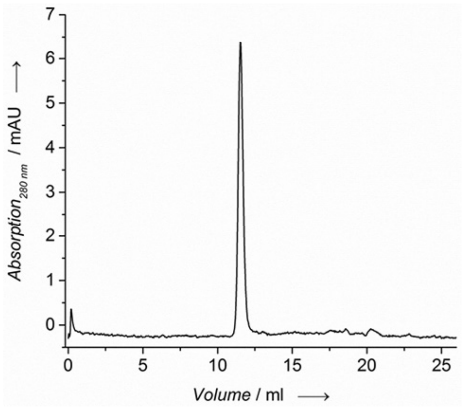


Figure 3. SEC analysis of reconstituted hSOD1. After sample storage for 14 weeks at 4 °C, 70 µL of hSOD1 (3 µM) was applied to a superdex 75 increase 10/300 GL column. A homogenous peak with a retention volume of about 11.5 mL was observed, indicating that the dimeric stoichiometry of hSOD1 showed no tendency to form monomers or oligomeric species.

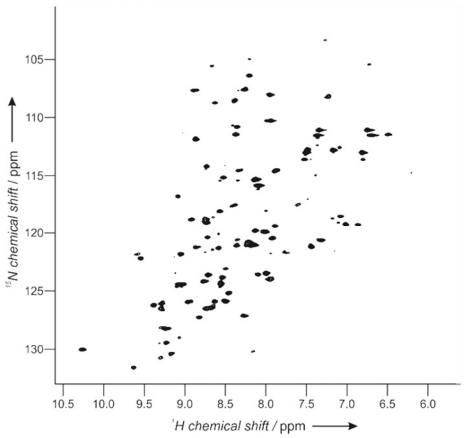


Figure 4. NMR spectrum of hSOD1. 2D ^{1}H-^{15}N-HSQC spectrum of 16 µM [*U*-^{15}N]-hSOD1 recorded at 25 °C.

information about the reconstituted hSOD1 holoenzyme was collected via NMR spectroscopy. The 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of hSOD1 showed a well-dispersed set of signals, indicating a well-folded protein (Figure 4). Several resonance signals showed low signal intensity, possibly due to the presence of the paramagnetic Cu^{2+} in close proximity.

Cu-Zn-hSOD1 displays high dimer stability

Human SOD1 retains its homodimeric integrity, enzymatic activity and metal binding ability in the presence of 1% SDS.[14] We used semi-native SDS-PAGE (0.4% SDS) to investigate the dimer stability of fully reconstituted Cu–Zn-hSOD1^{S-S}. For this purpose we incubated the protein for 30 min with the above mentioned loading buffers at 37 °C. The samples were subjected to a conventional SDS gel and run for 2 h at 80 V. After

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe
Chemistry SELECT Full Papers

staining and destaining, the hSOD1 dimer was detected at about 45 kDa while the monomeric protein was detected at about 20 kDa.[14]

In the absence of DTT and EDTA in the loading buffer, hSOD1 migrated as a single band at about 45 kDa (Figure 5,

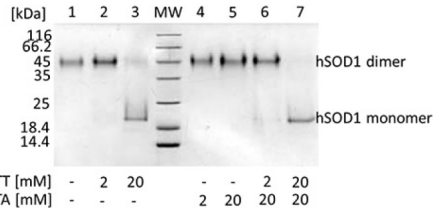


Figure 5. Dimer stability of human SOD1 investigated by partially denaturing SDS-PAGE. Reconstituted hSOD1 was pre-incubated for 30 min at 37 °C in loading buffer consisting of 62 mM Tris, pH 6.8, 10% glycerol, 0.05% bromphenol blue and different amounts of DTT and EDTA as indicated. The protein molecular weight marker was boiled before loading. 2 µg hSOD1 was applied per lane and the 15% gel was run at 80 V for 2 h with the standard gel running buffer. The gel was stained with pre-warmed Coomassie staining solution at RT. After destaining, migration of hSOD1 was documented using a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Dimeric hSOD1 migrates at ~45 kDa, whereas the monomeric hSOD1 can be detected at ~20 kDa.

lane 1), thus indicating the purely dimeric assembly. Addition of 2 mM DTT in the loading buffer did not facilitate dimer dissociation (Figure 5, lane 2), whereas buffer supplement with 20 mM DTT caused considerable dissociation of hSOD1 (Figure 5, lane 3). The dimer destabilizing effect of DTT was further strengthened by addition of 20 mM EDTA (Figure 5, lanes 4–7). This is in accordance to data published for endogenous hSOD1 isolated from human erythrocytes[14] and demonstrated high dimer stability of the recombinantly expressed and reconstituted hSOD1 holoenzyme.

Rodrigues et al. determined the melting point of purified hSOD1 by differential scanning calorimetry. Dependent on the protein metal content three melting points of about 60 °C (E_2ZnE SOD1), 72 to 76 °C (E_2Zn_2 SOD1) and 83 °C (CuEZn_2 SOD1) were reported.[6a] We performed thermal melting point analysis of reconstituted hSOD1 via circular dichroism (CD) spectroscopy. Melting curves were monitored at 260–190 nm and increasing temperatures (Figure 6A). The resulting T_m of about 86 °C (Figure 6B) indicated a well-folded, metal coordinated protein. Measurements of hSOD1 derived from two independent reconstitution procedures resulted in similar melting temperatures (84 to 85 °C) and are provided in Table 1. Thus, reconstitution of human SOD1 that has been recombinantly expressed in *E. coli* yields protein with high thermal stability, as specified for the hSOD1 holoenzyme.

E. coli produced and reconstituted Cu-Zn-hSOD1 displays the highest specific activity reported for recombinantly produced hSOD1

Specific activity of hSOD1 critically relies on coordination of copper in the active site of the enzyme; however, the specific activity of hSOD1 is commonly reported as units per mg protein without regard to its copper loading state. Specific activities of 3000 to 6000 U/mg have been documented for recombinant hSOD1[11,15] and normalization of specific activity to the copper loading state of hSOD1 has rarely been reported. The maximal theoretical specific activity for the purified protein has been estimated to be between 7000 and 8000 U/mg protein/Cu for wild-type hSOD1.[11] There is a sole publication that determined the specific activity of endogenous hSOD1 assayed in red blood cell lysates to be as high as 23,700 U/mg.[16]

The SOD determination kit (Sigma) was used according to manufacturer's instructions. Human SOD1 from three inde-

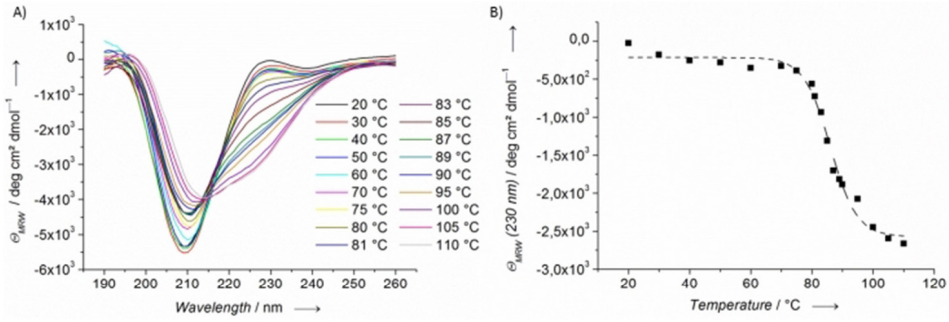


Figure 6. Thermal stability of reconstituted hSOD1 determined via CD spectroscopy. A: Spectra with 0.26 to 0.28 mg/mL hSOD1 in 50 mM sodium acetate, pH 6.0, were recorded in a temperature interval measurement (20 to 110 °C) at 260 to 190 nm with a scan speed of 20 nm/min. Five accumulations per measurement were performed and a buffer sample was subtracted from all protein containing spectra. Data were processed to mean molar ellipticity. B: The apparent melting temperature of about 86 °C was determined from data recorded at 230 nm via a Boltzmann sigmoidal fit (Origin 8).

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe

Chemistry SELECT Full Papers

pendent reconstitution events with slightly varying copper and zinc contents were compared with hSOD1 from a previous preparation that mainly followed published protocols.[10a,17] The latter protein preparation (containing 0.68 equivalents Zn and 0.04 equivalents Cu per monomer) displayed a specific activity of ~500–1000 U/mg. Fully reconstituted hSOD1 derived by the protocol described herein contained about 0.6 to 0.7 equivalents Cu and 0.64 to 0.86 equivalents Zn per monomer and exhibited a specific activity of ~14,300 U/mg, which is the highest specific activity reported for recombinant and purified hSOD1 (Table 1). Normalization to the copper loading state of hSOD1 resulted in a maximal theoretical specific activity of about 20,900 U/mg/Cu, which is in very good agreement to the data published for endogenous hSOD1 assayed in red blood cell lysates.

Repetition of activity determination after eight months of storage at 4 °C yielded 12,300 ± 260 U/mg for reconstitution #2, which demonstrates the high stability of reconstituted hSOD1.

Conclusions

The production and reconstitution of recombinantly expressed hSOD1 is crucial to many studies that aim to elucidate the molecular pathomechanism of ALS, and to create therapeutic strategies for efficient disease prevention and cure. The present work describes a reproducible procedure for total reconstitution of hSOD1 expressed in *E. coli* without requiring hCCS. In brief, the protein was purified via ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography and supplemented with zinc. SOD1 was reduced and subsequently denatured in guanidine hydrochloride. Renaturation was performed in the presence of zinc via dialysis against buffers containing decreasing concentrations of guanidine hydrochloride. The protein was supplemented with Cu^{2+} and incubated at 37 °C for 7 days. The dimeric hSOD1 holoenzyme was finally isolated via SEC. Extensive analysis indicated that the natively folded holoenzyme was produced, which exhibits high thermal stability and the highest reported specific activity of recombinantly expressed and purified hSOD1. In particular, reduction of hSOD1 before copper loading and increasing the incubation temperature and time during copper loading lead to elevated copper levels of the reconstituted protein. The final dimer purification step using SEC increased the yield of pure hSOD1 dimer. Together with the high copper loading a drastically increased specific activity of hSOD1 was reached.

Published protocols document the importance of the copper chaperone for hSOD1 integrity. Many enzymes, especially chaperones, increase the efficiency of the reaction. Here, the coordination of a copper ion into the respective copper ion-binding site is mediated. In organisms, hCCS activity might be essential because the free copper ion concentration is far below the concentrations used in our reconstitution.

In preliminary experiments we did include hCCS in the assay. Comparison of the results that included this protein versus the protocol herein showed no clear differences concerning the metal coordination level. Consequently, and to simplify the protocol, the purification and ion loading procedure in the absence of hCCS was used.

The present reconstitution procedure will be a valuable tool for prospective investigations, which critically rely on the structural integrity of the hSOD1 holoenzyme.

Supporting Information Summary

The supporting information describes hSOD1 expression and purification, the reconstitution procedure and all analytical methods (e.g., ICP-MS, NMR, SEC runs, enzyme activity assay, semi-native PAGE and melting point determination via CD) in detail.

Acknowledgments

This study was partially funded by the "Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V." to Jeannine Mohrlüder (Mo6/1). The authors acknowledge access to the Jülich-Düsseldorf Biomolecular NMR Center that is jointly run by Forschungszentrum Jülich and Heinrich Heine University Düsseldorf.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: enzyme activity · metalloenzyme · reconstitution · SOD1 · thermostability

[1] L. J. Haverkamp, V. Appel, S. H. Appel, *Brain* **1995**, *118 (Pt 3)*, 707–719.
[2] T. Siddique, S. Ajroud-Driss, *Acta Myol* **2011**, *30*, 117–120.
[3] A. Chio, B. J. Traynor, F. Lombardo, M. Fimognari, A. Calvo, P. Ghiglione, R. Mutani, G. Restagno, *Neurology* **2008**, *70*, 533–537.
[4] L. I. Grad, J. J. Yerbury, B. J. Turner, W. C. Guest, E. Pokrishevsky, M. A. O'Neill, A. Yanai, J. M. Silverman, R. Zeineddine, L. Corcoran, J. R. Kumita, L. M. Luheshi, M. Yousefi, B. M. Coleman, A. F. Hill, S. S. Plotkin, I. R. Mackenzie, N. R. Cashman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 3620–3625.
[5] K. C. Wilcox, L. Zhou, J. K. Jordon, Y. Huang, Y. Yu, R. L. Redler, X. Chen, M. Caplow, N. V. Dokholyan, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13940–13947.
[6] a) J. A. Rodriguez, J. S. Valentine, D. K. Eggers, J. A. Roe, A. Tiwari, R. H. Brown, Jr., L. J. Hayward, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15932–15937; b) J. S. Valentine, P. A. Doucette, S. Zittin Potter, *Annu. Rev. Biochem* **2005**, *74*, 563–593.
[7] a) H. J. Forman, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 2645–2649; b) D. P. Malinowski, I. Fridovich, *Biochem.* **1979**, *18*, 5909–5917.
[8] a) L. Banci, I. Bertini, A. Durazo, S. Girotto, E. B. Gralla, M. Martinelli, J. S. Valentine, M. Vieru, J. P. Whitelegge, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 11263–11267; b) S. S. Leal, J. S. Cristovao, A. Biesemeier, I. Cardoso, C. M. Gomes, *Metallomics* **2015**, *7*, 333–346.
[9] a) T. E. Brotherton, Y. Li, J. D. Glass, *Neurobiol. Dis.* **2013**, *49*, 49–56; b) . E. A. Proctor, L. Fee, Y. Tao, R. L. Redler, J. M. Fay, Y. Zhang, Z. Lv, I. P. Mercer, M. Deshmukh, Y. L. Lyubchenko, N. V. Dokholyan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 614–619.
[10] a) L. Banci, I. Bertini, F. Cantini, T. Kozyreva, C. Massagni, P. Palumaa, J. T. Rubino, K. Zovo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 13555–13560; b) M. Ahl, M. J. Lindberg, L. A. Tibell, *Protein Expr. Purif.* **2004**, *37*, 311–319.
[11] V. K. Bhogaraju, M. S. Levi, R. L. Reed, J. P. Crow, *Amyotroph Lateral Scler* **2010**, *11*, 283–288.
[12] L. J. Hayward, J. A. Rodriguez, J. W. Kim, A. Tiwari, J. J. Goto, D. E. Cabelli, J. S. Valentine, R. H. Brown, Jr., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15923–15931.

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe

Chemistry SELECT Full Papers

[13] R. L. Redler, L. Fee, J. M. Fay, M. Caplow, N. V. Dokholyan, *Biochem.* **2014**, *53*, 2423–2432.
[14] A. Tiwari, L. J. Hayward, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 5984–5992.
[15] a) N. Fujiwara, M. Nakano, S. Kato, D. Yoshihara, T. Ookawara, H. Eguchi, N. Taniguchi, K. Suzuki, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35933–35944; b) L. T. Benov, W. F. Beyer, Jr., R. D. Stevens, I. Fridovich, *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *21*, 117–121; c) J. C. Stevens, R. Chia, W. T. Hendriks, V. Bros-Facer, J. van Minnen, J. E. Martin, G. S. Jackson, L. Greensmith, G. Schiavo, E. M. Fisher, *PloS ONE* **2010**, *5*, e9541.
[16] T. Saito, K. Ito, M. Kurasaki, S. Fujimoto, H. Kaji, K. Saito, *Clin. Sci.* **1982**, *63*, 251–255.
[17] G. S. Wright, S. S. Hasnain, J. G. Grossmann, *Biochem J* **2011**, *439*, 39–44.

Submitted: May 3, 2018
Accepted: June 25, 2018

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemistrySELECT

Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2020

In Vitro Reconstitution of the Highly Active and Natively Folded Recombinant Human Superoxide Dismutase 1 Holoenzyme

Karoline B. Santur[+], Marc M. Sevenich[+], Melanie Schwarten, Volker Nischwitz, Dieter Willbold,* and Jeannine Mohrlüder*

Experimental Section

Protein expression and purification

The codon optimized DNA sequence of hSOD1 (Uniprot P00441) was transferred into a modified version of pET15b (Novagen) via PCR cloning. Compared to the commercially available pET15b, the modified vector exhibits minor modifications such as an additional *SacI* restriction site that is located 3' to the thrombin cleavage site coding region. *NcoI* and *SacI* restriction sites were used to insert the sequence coding for hSOD1. Sequence analysis of the resulting plasmid confirmed 100% identity with the expected *sod1* sequence. Protein expression was performed in *E.coli* BL21 (DE3) at 37 °C and 130 rpm in M9 medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin. The pre-culture was performed in LB-medium and additionally contained 1% glucose to avoid protein expression before induction. Cells were cultured till an OD_{600} of 0.6 was reached and the culture was then supplemented with IPTG (Boehringer) to a final concentration of 1 mM to induce protein expression. Cells were grown overnight (~17 h), harvested by centrifugation at 5000 *g* for 20 min at 4 °C and the resulting cell pellets were stored at −20 °C until protein purification was performed. The tag-less protein was purified via ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography, according to established protocols with minor modifications.[1] In brief, the cell pellet of a 2 L expression culture was resuspended in 40 mL buffer (20 mM Tris-HCl, 0.1 mM $ZnCl_2$, 150 mM NaCl, 0.5 mM 2-mercaptoethanol, pH 8.0) and the protease inhibitor (EDTA-free) was added according to manufacturer's instructions (Roth). After cell disruption (3 cycles at 1.8 bar) and centrifugation (30 min, 30 000 *g*, 4 °C) the supernatant was slowly (10 min) supplemented with ammonium sulfate under agitation on ice. Once an ammonium sulfate saturation of 53 % was reached, the lysate was incubated for another 5 min. The soluble fraction was subsequently isolated by additional centrifugation (15 min, 30 000 *g*, 4 °C). Ammonium sulfate saturation was further increased to 64 % and the sample was centrifuged again (30 min, 30 000 *g*, 4 °C). The resulting supernatant (40 mL) was loaded onto a column containing 7.3 mL of Source 15PHE column material (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM sodium phosphate, 2.5 M ammonium sulfate, 150 mM NaCl and 0.5 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0. A linear buffer gradient toward 50 mM sodium phosphate pH 7, 150 mM NaCl and 0.5 mM 2-mercaptoethanol (buffer B) was applied for 10 CV with a flow rate of 2 mL/min. Fractions containing hSOD1 with a purity of more than 98% were pooled and stored after the addition of an equimolar amount of zinc sulfate at 4 °C for short time use or at -80 °C until further required.

Reconstitution procedure

Reconstitution of the hSOD1 holoenzyme follows established protocols with crucial differences.[2] 2 mL hSOD1 (2.67 mg/mL) were reduced by addition of a 500-fold molar excess of dithiothreitol (DTT) (40 mM) and divalent metals were complexed by addition of 5 mM EDTA (Roche) for 5 min at room temperature. Addition of guanidine hydrochloride to a final concentration of 5.5 to 5.7 M and incubation for 2 h at room temperature ensured depletion of metal ions from hSOD1. The protein was renatured via seven dialysis steps against 1 L buffer (50 mM sodium acetate pH 6.0, 0.5 mM DTT, 168 µM zinc sulfate (equimolar related to hSOD1 monomer)) that included guanidine hydrochloride in descending concentrations (6, 5, 4, 3, 2, 1, 0 M) at room temperature for 1 h. The dialysis membrane was rinsed and nitrogen gas was passed through the dialysis buffers and these buffers were degassed for 1 h before use. Human SOD1 was subsequently dialyzed against 1 L of the last renaturation buffer (containing 0 M guanidine hydrochloride) for 15 h at room temperature.

After determining the hSOD1 concentration by the Bradford protein assay (Bio-Rad), the protein was incubated with copper (II) chloride (Merck) (stock solution in 50 mM sodium acetate, pH 6.0) with a molar ratio of 1:4 (hSOD1 dimer:Cu^{2+}) for 7 days at 37 °C. The protein solution was inverted 5 times during this incubation period. The volume of the sample was subsequently reduced to 0.1 mL by a SpeedVac concentrator at 30 °C. The sample (20 mg/mL) was loaded onto a superdex 75 10/30 HR column (GE Healthcare) with a flow rate of 0.25 mL/min to isolate the hSOD1 dimer from monomer and oligomeric species, and to remove non-bound metals. The column was pre-equilibrated and run with 50 mM sodium acetate pH 6.0, which has been filtered and degassed before application. Dimer containing fractions of hSOD1 (eluting at about 10.5 to 11.2 mL) were pooled. The protein was stored at 4 °C or −80 °C until further use. The protein concentration and dimer isolation via SEC was optionally performed before copper loading. In this case, non-bound metals were finally removed by using Micro Bio-Spin 6 columns (Biorad) according to manufacturer's instructions.

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

Inductively coupled plasma mass spectrometry (Agilent 7500) in the He-collision cell mode was employed for the determination of Cu and Zn in the protein solutions. The instrument was equipped with a micromist nebuliser and double pass spray chamber. Quantification was performed by external calibration using Rh as the internal standard. Calibration standards were prepared from traceable commercial single element stock solutions (Certipur, Merck). NIST 1640a natural water reference material was analyzed for quality control; mean percentage recoveries (with standard deviation) were 100.2 (1.7) for Cu and 100.8 (1.7) for Zn. Three replicate dilutions (100-fold) were prepared from each sample in 1% nitric acid (Suprapure, Merck) and analyzed. Aliquots of the buffer were analyzed in the same way for blank correction.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

NMR spectra were recorded at 25 °C using a 750-MHz Avance III spectrometer (Bruker) equipped with a cryogenically cooled Z-axis pulse-field-gradient triple-resonance probe. The NMR samples contained 16 µM [*U*–^{15}N]-hSOD1 in 50 mM sodium acetate pH 6.0, and 5% D_2O. 2D ^{1}H-^{15}N-heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra were collected with 256 complex points in the ^{15}N time domain, 80 scans per t_1 point and a 1.5 s recycle delay. Data were processed with NMRPipe and analyzed with CcpNMR.[3]

Analytical size exclusion chromatography (SEC)

Analytical SEC was performed to investigate the aggregation state of reconstituted and isolated hSOD1 dimer. 80 µL of the reconstituted hSOD1 (237 µM dimer) was applied to a superdex 75 10/30 HR column (GE Healthcare), pre-equilibrated with 50 mM sodium acetate,

pH 6.0. A flow rate of 0.25 mL/min was applied at room temperature. The experiment was repeated after sample storage for 14.5 weeks at 4 °C to investigate the dimer stability of the holoenzyme. We used a much lower amount of protein (70 µL, 3 µM dimer) to minimize protein consumption and a different SEC column (superdex 75 increase 10/300 GL) at a flow rate of 0.5 mL/min.

SOD activity assay

Specific activity of hSOD1 was quantified via the SOD activity determination kit according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). The tetrazolium salt WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) is converted into a formazan dye (absorbance at 450 nm) by reduction with superoxide. This reduction rate is linearly related to the xanthine oxidase activity, and is inhibited by the SOD1 activity. The resulting volumetric activity was subsequently converted to specific activity. All measurements were performed in triplicate (at least) with two different protein concentrations.

Semi-native PAGE

Partially native PAGE was performed as described previously.[4] Compared with standard denaturing SDS-PAGE the loading buffer contained lower amounts of SDS (0.4 %), varying amounts of reducing agent (0–20 mM DTT) and the chelating agent EDTA (0–20 mM) as indicated. Samples (2 µg hSOD1) were incubated at 37 °C for 30 min before loading to standard polyacrylamide Tris-HCl gels (15%). Gels were run at 80 V for 2 h. The standard gel running buffer consisted of 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 385 mM glycine and 0.1% SDS. The protein molecular weight marker (26610, Thermo Fisher Scientific) was boiled before loading. Gel staining was performed by incubation in Coomassie staining solution (25% 2-propanol, 10% acetic acid and 0.5 g/L Coomassie brilliant blue R-250) at RT and subsequent destaining. Images were photographed using a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Thermal melting point analysis via circular dichroism spectroscopy

Far-UV circular dichroic (CD) data were collected using a Jasco J810 spectropolarimeter (Jasco). Data corrections and processing were performed according to the Jasco Standard Analysis Program and Origin 8. Human SOD1 (0.26–0.28 mg/mL) was analyzed in 50 mM sodium acetate, pH 6.0. Spectra were sampled in a high precision quartz cell with a 1 mm path length (Hellma analytics). A temperature interval measurement collected data between 20 and 110 °C over the wavelength range of 260 to 190 nm. A scan speed of 20 nm/min was applied. Five accumulations per measurement were performed and baseline correction using the buffer solution was applied. Resulting data were smoothed by the Savitzky-Golay filter [5], converted to mean molar ellipticity and the apparent melting temperature was determined from data recorded at 230 nm via a Boltzmann sigmoidal fit (Origin 8).

[1] G. S. Wright, S. S. Hasnain, J. G. Grossmann, *Biochem J* 2011, 439, 39-44.

[2] L. Banci, I. Bertini, F. Cantini, T. Kozyreva, C. Massagni, P. Palumaa, J. T. Rubino, K. Zovo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109, 13555-13560.

[3] a). F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, *J. Biomol. NMR* 1995, 6, 277-293; b). W. F. Vranken, W. Boucher, T. J. Stevens, R. H. Fogh, A. Pajon, M. Llinas, E. L. Ulrich, J. L. Markley, J. Ionides, E. D. Laue, *Proteins* 2005, 59, 687-696.

[4] A. Tiwari, L. J. Hayward, *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 5984-5992.

[5] A. Savitzky, M. J. E. Golay, in *Anal Chem*, Vol. 36, 1964, pp. 1627-&.

3.2 Ligand-Induced Stabilization of the Native Human Superoxide Dismutase 1

Autoren: **Karoline Bianka Santur**, Elke Reinartz, Yi Lien, Markus Tusche, Tim Altendorf, Marc Sevenich, Gültekin Tamgüney, Jeannine Mohrlüder und Dieter Willbold

Journal: ACS Chemical Neuroscience, online veröffentlicht am 17.06.2021

DOI: https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00253

Impact Factor: 4,486 (2019)

Beitrag: Mitentwicklung und Durchführung der Experimente; Mitentwicklung und Etablierung der erweiterten Phagendisplay-Selektion inklusive der Kontrollselektionen und der Software TSAT zur Auswertung der resultierenden Sequenzen; Auswertung und Darstellung aller Daten; Anfertigung aller Abbildungen; statistische Analyse; Verfassen des Manuskripts

Reprinted with permission from Santur et al. (2021). Copyright 2021 American Chemical Society.

Dieser Artikel steht unter einer Creative Commons Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0; https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.de).

ACS Chemical Neuroscience

pubs.acs.org/chemneuro Research Article

Ligand-Induced Stabilization of the Native Human Superoxide Dismutase 1

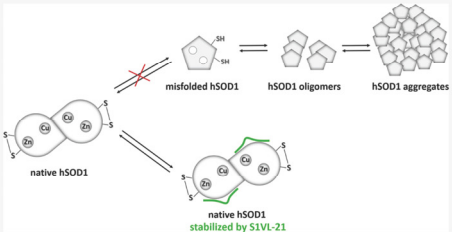
Karoline Santur, Elke Reinartz, Yi Lien, Markus Tusche, Tim Altendorf, Marc Sevenich, Gültekin Tamgüney, Jeannine Mohrlüder,* and Dieter Willbold*

Cite This: https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00253 Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations

Downloaded via 37.201.192.126 on June 18, 2021 at 07:32:46 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

ABSTRACT: A common characteristic of familial (fALS) and sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS) is the accumulation of aberrant proteinaceous species in the motor neurons and spinal cord of ALS patients—including aggregates of the human superoxide dismutase 1 (hSOD1). hSOD1 is an enzyme that occurs as a stable dimeric protein with several post-translational modifications such as the formation of an intramolecular disulfide bond and the acquisition of metal cofactors that are essential for enzyme activity and further contribute to protein stability. Some mutations and/or destabilizing factors promote hSOD1 misfolding, causing neuronal death. Aggregates containing misfolded wild-type hSOD1 have been found in the spinal cords of sALS as well as in non-hSOD1 fALS patients, leading to the hypothesis that hSOD1 misfolding is a common part of the ALS pathomechanism. Therefore, stabilizing the native conformation of SOD1 may be a promising approach to prevent the formation of toxic hSOD1 species and thus ALS pathogenesis. Here, we present the 16-mer peptide S1VL-21 that interferes with hSOD1 aggregation. S1VL-21 was identified by phage display selection with the native conformation of hSOD1 as a target. Several methods such as microscale thermophoresis (MST) measurements, aggregation assays, and cell viability assays revealed that S1VL-21 has a micromolar binding affinity to native hSOD1 and considerably reduces the formation of hSOD1 aggregates. This present work therefore provides the first important data on a potential lead compound for hSOD1-related drug development for ALS therapy.



KEYWORDS: *ALS, SOD1, aggregate elimination, treatment strategy, native conformation stabilization, phage display selection*

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal adult-onset neurodegenerative disorder that causes degeneration of upper and lower motor neurons in the primary cortex, brain stem, and spinal cord. Death occurs typically within 3−5 years after diagnosis due to respiratory failure. Approximately 90% of all ALS cases are considered sporadic (sALS), whereas familial ALS cases (fALS) account for the remaining ∼10%.[1−3] However, despite widespread research, there is still no efficient treatment for ALS. The only available FDA approved drugs are riluzole and radicava, which extend survival by only 2−3 months[4] or decelerate the rate of decline in physical functions by 33%,[5] respectively.

Mutations in the gene coding for the human superoxide dismutase 1 (hSOD1) are found in ∼1% of all ALS cases[6] and account for ∼20% of fALS cases.[5] Since 1993, when the first ALS-associated mutations in hSOD1 were found,[7] more than 200 mutations in hSOD1 have been identified (https://alsod.ac.uk/). The human SOD1 is an enzyme that converts toxic superoxide radicals to hydrogen peroxide and oxygen. The mature protein is a 32 kDa homodimer with one copper and one zinc ion per monomer that are important for the activity and stability, respectively. An intramolecular disulfide bond in each subunit further contributes to protein stability.[8] All post-translational modifications, including the dimerization, the coordination of the metals, and the disulfide bond, lead to one of the most stable proteins known.[9,10] However, mutations and/or altered post-translational modifications are linked to the pathogenesis of ALS, whereas the underlying mechanism behind hSOD1-mediated toxicity is still unclear. Loss of hSOD1 function may lead to an accumulation of toxic radicals and thus be a possible reason for the disease, but SOD1 knockout mice do not exhibit an ALS-like phenotype.[11] Some studies have suggested a toxic gain-of-function of mutant hSOD1 as a result of protein misfolding and aggregation,[8,12,13]

Received: April 20, 2021
Accepted: June 1, 2021

ACS Publications © XXXX The Authors. Published by American Chemical Society

https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00253
ACS Chem. Neurosci. XXXX, XXX, XXX−XXX

and the pathogenicity of mutant hSOD1 is proportional to the amount of toxic hSOD1 species.[14] Indeed, aggregates containing mutant and misfolded hSOD1 have been found in the spinal cord of sALS and hSOD1-fALS patients.[15−17] In addition, misfolded wild-type hSOD1 was also detected in non-hSOD1 fALS patients leading to the hypothesis that hSOD1 misfolding is a common part of the ALS pathomechanism.[18] Moreover, aggregated hSOD1 has been shown to induce aggregation of mutant and wild-type SOD1 *in vitro*[19] as well as in cell culture[20] with a prion-like behavior[21] and the overexpression of wild-type hSOD1 in mice led to an ALS-like phenotype.[13] Lacking one or several post-translational hSOD1 modifications destabilizes the native protein and generates an apo monomer, whose thermal stability is significantly reduced, and that has been shown to be the precursor for aggregation.[22,23]

In order to investigate whether the destabilization of the hSOD1 holoenzyme is crucial to ALS pathology, we want to explore whether stabilization of the native hSOD1 conformation by specifically binding ligands is able to interfere with hSOD1 aggregation. Such ligands should then be able to inhibit formation of hSOD1 aggregates *in vitro* and *in vivo*. In addition, elimination of pre-existing hSOD1 aggregates might also become feasible.

A similar approach has been applied in the transthyretin (TTR)-associated amyloidosis. It has been shown that the tetrameric protein dissociates into monomers before misfolding and aggregation.[24] However, binding of small specific molecules stabilized the native conformation of the protein and increased the kinetic barrier to tetrameric dissociation, thus preventing amyloidosis.[25] The efficacy of specific ligands in interfering with protein aggregation was also successfully demonstrated for amyloid-β protein (Aβ), whose toxic species are involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *In vitro* data revealed that the D-enantiomeric peptide RD2 binds monomeric Aβ(1−42) and inhibits concentration-dependent formation of Aβ fibrils. In addition, RD2 was able to eliminate pre-existing toxic Aβ oligomers,[26] and mouse studies demonstrated a significant reduction of Aβ oligomers as well as an improvement of cognitive properties.[26−28] Thus, stabilizing the wild-type hSOD1 native conformation by specifically binding ligands may be a beneficial approach in ALS treatment.

Here, we report the identification of a hSOD1-binding peptide selected by phage display and its analysis regarding its potential to stabilize native hSOD1 and thus inhibit hSOD1 aggregation.

RESULTS AND DISCUSSION

hSOD1-Binding Peptides Were Enriched during Phage Display Selection. To identify peptide ligands that are able to stabilize the native conformation of hSOD1, the TriCo-16 phage display peptide library was used in a phage display selection. After four selection rounds, the success of the selection was analyzed by an enrichment ELISA.

As shown by ELISA analysis (Figure 1), the phage display selection enriched phages that bind to hSOD1-coated wells (Figure 1; dark green) more than to noncoated wells (Figure 1; light green). The weak binding of the wild-type phage to hSOD1 with an intensity similar to the control without phages indicates that the measured values result from the binding of the presented peptides and not from that of the phage itself. The signal intensity of the wells with and without hSOD1 are

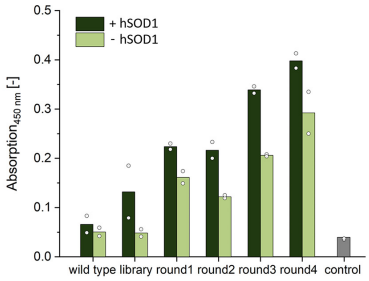


Figure 1. hSOD1-binding peptides were enriched during phage display selection. Enrichment ELISA of the hSOD1 phage display was performed to verify the enrichment of hSOD1-binding peptides during the selection. Relative binding affinities of the phage samples ($5 * 10^{10}$ phages) of the wild type, library, and each selection round to immobilized hSOD1 (dark green) and to empty wells without hSOD1 (light green) were investigated in a double determination (points: corresponding values) as well as a control without hSOD1 and phages (gray).

not considerably different. As shown by the increased signal intensity with each selection round starting from the library, hSOD1-binding peptides accumulated during the selection. The library already contains hSOD1-binding peptides as indicated by the higher signal intensity for hSOD1-coated wells compared to noncoated wells.

Sequence Analysis Led to the Identification of hSOD1-Binding Peptide S1VL-21. Next-generation sequencing (NGS) analysis followed by processing via the Target Sequencing Analysis Tool (TSAT) and Hammock led to the identification of the peptide S1VL-21. In total, 60 937 sequences were identified during this selection after analysis. The sequence at position 1 in the scoring according to the parameter Empty Score (EmS) exhibited a value of 83 but displayed an Enrichment Factor (EnF) value of only 6. In contrast, another sequence with an EnF value of 271 was most enriched, whereby this sequence was also highly present in the controls (EmS of 6). S1VL-21 was ranked at position 25 in the scoring according to the parameter EmS (value of 23) and at position 38 according to the parameter EnF (value of 25). Moreover, it formed the largest cluster in sequence alignment with 2469 sequences including 2393 unique sequences of the remaining 60 751 sequences. Thus, the peptide S1VL-21 and its three randomized control peptides S1VL-21_Rdm1, S1VL-21_Rdm2, and S1VL-21_Rdm3 were further investigated according to their potential to bind and stabilize native hSOD1 as well as their potential to prevent hSOD1 from aggregation.

S1VL-21 Exhibits Micromolar Binding Affinity to hSOD1. Microscale thermophoresis (MST) measurements were used to determine the equilibration dissociation constant (K_D) of hSOD1 to the selected peptide S1VL-21. As a control for the sequence specificity of the binding affinity, three peptides with the same amino acid residues, but in randomized sequence order, where also measured for affinity to hSOD1 (Figure 2A). Therefore, 250 nM hSOD1 labeled with CF633 was used, whereas nonlabeled peptide was added with different concentrations. The S1VL-21 exhibits the strongest binding affinity to hSOD1 with a resulting K_D of 5.3 ± 0.3 μM (Figure

https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00253
ACS Chem. Neurosci. XXXX, XXX, XXX−XXX

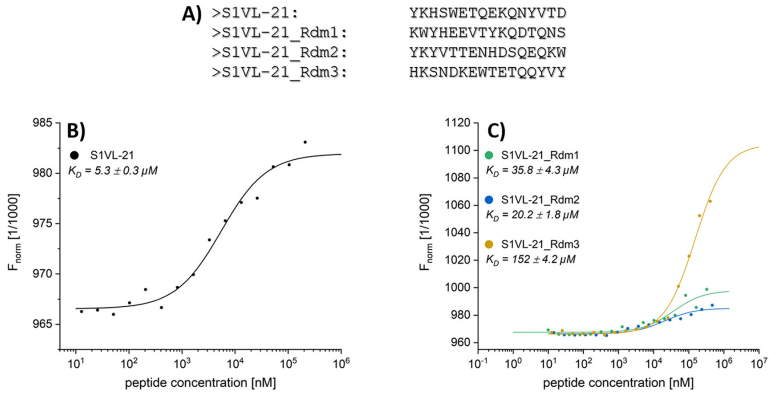


Figure 2. S1VL-21 exhibits a micromolar binding affinity to hSOD1. (A) Sequences of the selected peptide S1VL-21 and its randomized control peptides S1VL-21_Rdm1, S1VL-21_Rdm2, and S1VL-21_Rdm3, which were measured for affinity to hSOD1. (B) MST measurement of hSOD1-CF633 (250 nM) and S1VL-21 as well as (C) its randomized control peptides with increasing concentrations (10 nM−470 μM) in 50 mM sodium acetate buffer pH 6 containing 150 mM NaCl and 0.05% Tween-20 were performed at 25 °C with an LED power of 40%. Changes in thermophoresis at 40% MST power were plotted against the peptide concentrations and evaluated through thermophoresis for determining the K_D values of 5.3 ± 0.3 μM for S1VL-21 (B) and 35.8 ± 4.3 μM (C; green), 20.2 ± 1.8 μM (C; blue), and 152 ± 4.2 μM (C; orange) for the randomized control peptides S1VL-21_Rdm1, S1VL-21_Rdm2, and S1VL-21_Rdm3, respectively.

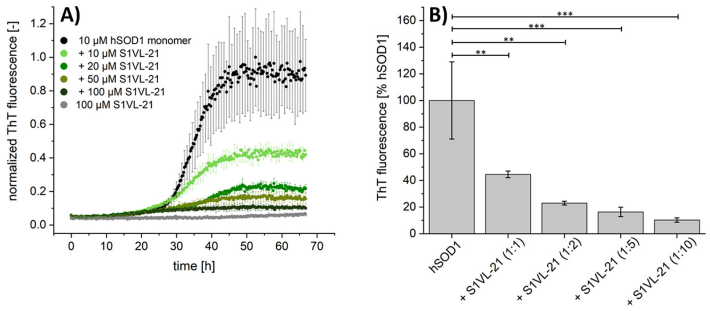


Figure 3. S1VL-21 exhibits an influence on the formation of amyloid-like hSOD1 aggregates. The ThT assay was performed to investigate the influence of S1VL-21 on amyloid-like hSOD1 aggregation. All samples containing 5 μM dimeric hSOD1 with and without the corresponding peptide concentration as well as peptide alone were incubated in 50 mM sodium acetate buffer pH 6 with 10 mM TCEP, 5 mM EDTA, 150 mM sodium chloride, and 5 μM ThT for 15 min at 37 °C before the fluorescence progression measurement was started in a 96-well half-area flat-bottom microplate (Corning, New York, USA) containing one stainless steel bead (3.2 mm). The progression of fluorescence intensity was measured every 15 min at λ_{ex} = 448 nm and λ_{em} = 482 nm with 30 s of agitation at 400 rpm before every measurement using a microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). The ThT fluorescence intensity was normalized to the highest value and plotted against the time. (A) The ThT assay of hSOD1 (black) and with different concentrations of S1VL-21 (green colors) in 3- to 5-fold determination. Gray: 100 μM S1VL-21 without hSOD1. The ThT fluorescence is decreased with S1VL-21. (B) Comparison of the ThT fluorescence intensity (Figure 3A) of all samples present in A after 52.5 h. S1VL-21-containing samples were normalized to the fluorescence intensity of the sample with hSOD1 alone. One-way ANOVA (analysis of variance) with Fisher post hoc analysis was used for statistical analysis. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. The ThT fluorescence was significantly reduced by 90% by addition of a 10-fold molar excess of S1VL-21.

2B). In contrast, the measurements with the randomized control peptides S1VL-21_Rdm1, S1VL-21_Rdm2, and S1VL-21_Rdm3 led to K_D values of 36, 20, and 152 μM, respectively (Figure 2C). Thus, the selected S1VL-21 has an enhanced affinity with a 4- to 30-fold lower K_D value for the hSOD1 interaction compared to the randomized control peptides.

S1VL-21 Exhibits an Influence on the Formation of Amyloid-Like hSOD1 Aggregates. To investigate the influence of S1VL-21 on amyloid-like hSOD1 aggregation, a thioflavin T (ThT) assay was performed. Briefly, 5 μM dimeric hSOD1 was incubated with and without the corresponding peptide in 50 mM sodium acetate buffer pH 6 containing 10 mM TCEP, 5 mM EDTA, 150 mM sodium chloride, and 5 μM ThT for 15 min at 37 °C before the fluorescence progression measurement was started in a microplate containing one 3.2 mm stainless steel bead per well. The

https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00253
ACS Chem. Neurosci. XXXX, XXX, XXX−XXX

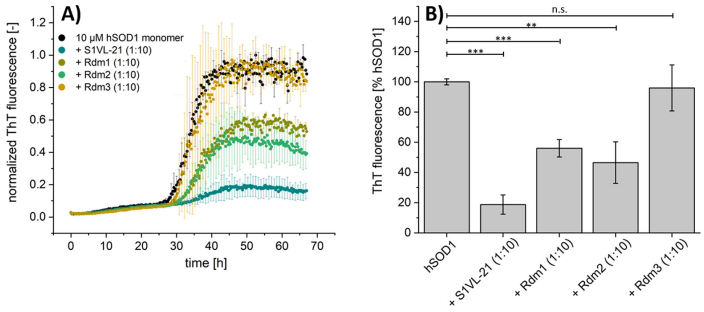


Figure 4. Randomized control peptides S1VL-21_Rdm1−3 revealed to be less effective in the inhibition of amyloid-like hSOD1 aggregation compared to S1VL-21. The ThT assay was performed to investigate the influence of S1VL-21 as well as its randomized control peptides S1VL-21_Rdm1−3 on amyloid-like hSOD1 aggregation. All samples containing 5 μM dimeric hSOD1 with and without the corresponding peptide were incubated in 50 mM sodium acetate buffer pH 6 with 10 mM TCEP, 5 mM EDTA, 150 mM sodium chloride, and 5 μM ThT for 15 min at 37 °C before the fluorescence progression measurement was started in a 96-well half-area flat-bottom microplate (Corning, New York, USA) containing one stainless steel bead (3.2 mm). The progression of fluorescence intensity was measured every 15 min at λ_{ex} = 448 nm and λ_{em} = 482 nm with 30 s of agitation at 400 rpm before every measurement using a microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). The ThT fluorescence intensity was normalized to the highest value and plotted against the time. (A) The ThT assay of hSOD1 (black) was performed in a 3-fold determination with a 10-fold molar excess of peptides (100 μM; other colors) related to the monomeric concentration of hSOD1. The peptides alone showed no increase in fluorescence (data not shown). The ThT fluorescence is most reduced with S1VL-21. (B) Comparison of the ThT samples after 52.5 h. Samples containing peptides are normalized to the fluorescence of the sample with hSOD1 alone. One-way ANOVA (analysis of variance) with Fisher post hoc analysis was used for statistical analysis. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; n.s. not significant ($p > 0.05$). The ThT fluorescence was significantly reduced by 44 and 53% with a 10-fold molar excess of S1VL-21_Rdm1 and S1VL-21_Rdm2, respectively. S1VL-21_Rdm3 did not reduce the ThT fluorescence.

effect of S1VL-21 on hSOD1 aggregation was determined by adding increasing concentrations of S1VL-21 to the fibrillation samples. Furthermore, the randomized control peptides were also analyzed for their influence on amyloid-like hSOD1 aggregate formation. In order to exclude aggregation of the peptide itself, the respective peptide was also investigated under the given conditions without hSOD1. Due to the high concentrations of TCEP and EDTA, which reduces the disulfide bond and complexes the metal ions, respectively, and the given stainless steel bead that causes mechanical agitation and thus fragmentation, hSOD1 unfolds and aggregates.[29]

The results were analyzed by comparing the relative fluorescence emission after 52.5 h, where the control (without peptide) reached its fluorescence maximum (Figure 3A; black). As shown in Figure 3A, the maximal fluorescence emission was decreased by addition of S1VL-21, and this effect was more evident the more peptide was added. With a 10-fold molar excess, the fluorescence was reduced by 90% (Figure 3B).

Compared to S1VL-21, its randomized peptides S1VL-21_Rdm1, S1VL-21_Rdm2, and S1VL-21_Rdm3 indicated less influence on ThT fluorescence and thus on the formation of amyloid-like hSOD1 aggregates as shown in Figure 4. While S1VL-21_Rdm1 and S1VL-21_Rdm2 reduced the plateau of the hSOD1 aggregation-dependent ThT fluorescence by about 44 and 53%, respectively, S1VL-21_Rdm3 did not exhibit any effect at all (Figure 4B). Thus, the randomized control peptides with the same amino acid composition but in a different sequence order were less effective in inhibition of amyloid-like hSOD1 aggregation compared to S1VL-21.

Incubation of hSOD1 with S1VL-21 during Aggregation Resulted in hSOD1 Species That Were Significantly Less Toxic to Neuro2a Cells than Non-peptide-Treated hSOD1 Aggregates. In order to confirm that resulting hSOD1 species are less toxic to Neuro2a cells when hSOD1 was incubated with S1VL-21 under reducing conditions during the aggregation assay, a cell viability assay using the reduction of MTT was performed in a 5-fold determination (Figure 5). Therefore, Neuro2a cells were treated with samples that have been collected after 65 h of hSOD1 aggregation incubated with and without increasing concentrations of S1VL-21.

The cell proliferation was normalized to the mean value of cells treated with medium. Subsequently, the rate of cells that were rescued due to the initial addition of S1VL-21 during hSOD1 aggregation was determined by normalizing the proliferation level to that of cells treated with hSOD1 aggregates. Cells treated with hSOD1 that has been incubated with different concentrations of S1VL-21 during the aggregation assay yielded a concentration-dependent increase in rescue rate (Figure 5; 1:1:14 ± 6%; 1:5:35 ± 7%; 1:10:48 ± 8). Notably, compared to cells treated with hSOD1 aggregates, 48% of cells have been rescued after treatment with hSOD1 species, where hSOD1 was initially incubated with a 10-fold molar excess of S1VL-21. Thus, the incubation of hSOD1 with S1VL-21 during the aggregation assay resulted in hSOD1 species that were significantly less toxic to Neuro2a cells than non-peptide-treated hSOD1 aggregates.

■ CONCLUSION

It has been shown that destabilizing of hSOD1 by mutations and/or post-translational modifications possibly leads to hSOD1 misfolding and aggregation, whereas *in vitro* and *in vivo* studies revealed an important role of hSOD1 aggregates in the progression of ALS. These aggregates containing mutant and misfolded wild-type hSOD1 were found in sALS patients

https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00253
ACS Chem. Neurosci. XXXX, XXX, XXX−XXX

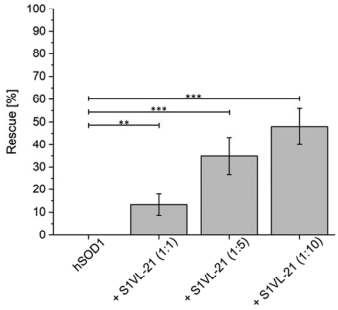


Figure 5. Incubation of hSOD1 with S1VL-21 during aggregation resulted in significantly less toxic hSOD1 species to Neuro2a cells than non-peptide-treated hSOD1 aggregates. A cell viability assay was performed in Neuro2a cells (2500 cells/well) cultured in flat-bottomed 96-well plates in DMEM including 10% FBS and 1% streptomycin and penicillin. After 6 h, the cells were treated with the pellet of samples containing hSOD1 alone and hSOD1 that was incubated with increasing concentrations of S1VL-21 during 65 h under aggregating conditions as described in Figure 3. Therefore, the samples were centrifuged at 100 000*g* for 1 h at 4 °C, and the pellet was solvated and diluted (1:1) in medium. After 3 days, the cell viability was measured using the cell proliferation Kit I according to the manufacturer's instructions (Roche, Basel, Switzerland) in a 5-fold determination. The proliferation was normalized to the mean value of the medium-treated cells. The rate of cells that could be rescued due to the initial addition of S1VL-21 during hSOD1 aggregation was determined by normalizing the proliferation level to that of cells treated with hSOD1 aggregates. One-way ANOVA (analysis of variance) with Fisher post hoc analysis was used for statistical analysis. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. Cells treated with hSOD1 that has been incubated with different concentration of S1VL-21 during aggregation led to a concentration-dependent increase in the rescue rate compared to non-peptide-treated hSOD1 aggregates.

as well as in hSOD1-fALS and non-hSOD1 fALS patients.[8,16,18]

Our intention was to explore whether stabilization of the native hSOD1 conformation by specifically binding ligands is able to interfere with hSOD1 aggregation.

Here, we report a 16-mer peptide S1VL-21 selected by phage display that was identified as a ligand to stabilize the native conformation of hSOD1. MST measurements revealed a micromolar binding affinity of S1VL-21 to native hSOD1. ThT assays were used to investigate the inhibition efficacy of S1VL-21 on hSOD1 aggregation. As the emission at 482 nm is proportional to the amount of amyloid fibrils and amyloid-like aggregates, the aggregation of hSOD1 was followed by measuring the ThT fluorescence.[30] We observed that coincubation of hSOD1 with S1VL-21 during the aggregation assay resulted in a concentration-dependent inhibition of the ThT fluorescence emission increase. For example, incubation of hSOD1 with an equimolar amount of S1VL-21 under hSOD1-aggregating conditions resulted in a reduced formation of amyloid-like hSOD1 aggregates by 55%, whereas with a 10-fold molar excess of S1VL-21, the formation of amyloid-like hSOD1 aggregates was reduced by even 90%. Additionally, we were able to show that these remaining species are less toxic to Neuro2 cells than non-peptide-treated hSOD1 aggregates, also in a concentration-dependent manner, probably due to the lower amount of aggregates. Although the mechanism of hSOD1 aggregation has not yet been clearly elucidated, Chattopadhyay et al. demonstrated *in vitro* that even small amounts of metal-free and reduced monomeric hSOD1 can initiate the formation of amyloid species in disulfide-bridge-intact forms of hSOD1 and that elongation is driven by recruitment of apo or partially metalated, dimeric, disulfide-intact hSOD1.[31] We suggest that the specific binding of S1VL-21 to the native hSOD1 leads to a reduction or even a prevention in the formation of misfolded, ThT-positive hSOD1 species. Moreover, the effect of S1VL-21 is sequence-specific as indicated by the analyses using sequence randomized control peptides. Whereas Rdm1 and Rdm2 also showed a reducing but considerably smaller effect on the formation of amyloid-like hSOD1 aggregates compared to S1VL-21, Rdm3 did not exhibit an influence in interfering with hSOD1 aggregation. It cannot be excluded that there are still similarities in parts of the sequences between the two randomized control peptides and S1VL-21 (e.g., amino acid combinations/positions or charge distributions) that may explain the existing influence on hSOD1 aggregate formation. However, compared to S1VL-21, the randomized control peptides showed a lower affinity to native hSOD1 and significantly less inhibition of aggregate formation.

In summary, we used phage display including control selections and NGS analysis for the identification of peptide ligands for native hSOD1. In this way and together with subsequent characterization methods, we were able to identify S1VL-21 and we showed that this peptide has an impact on hSOD1 aggregation. Further investigations to figure out the binding site of S1VL-21 to hSOD1 are necessary to understand the mechanism of impairment of hSOD1 aggregation. S1VL-21 will be further optimized in order to reduce the required concentration at which the same inhibition rate of aggregate formation is achieved as with S1VL-21 to become a potential lead for drug development.

■ MATERIALS & METHODS

Protein Expression, Purification, and Reconstitution. Heterologous expression of human SOD1 (hSOD1) in *E. coli* and its purification and fully reconstitution to natively folded dimeric holoenzyme was performed as described previously in Santur et al.[31]

Peptides. Peptide S1VL-21 (YKHSWETQEKQNYVTD-NH_2) as well as its randomized control peptides (S1VL-21_Rdm1: KWYHE-EVTYKQDTQNS-NH_2; S1VL-21_Rdm2: YKYVTTENHD-SQEQKW-NH_2; S1VL-21_Rdm3: HKSNDKEWTETQQYVY-NH_2) were purchased from Caslo (Lyngby, Denmark) with >98% purity. They are C-terminal-amidated and consist of 16 L-enantiomeric amino acid residues with a molecular mass of 2055 Da.

Phage Display. Phage display with four selection rounds was performed to obtain peptides that specifically bind to native hSOD1. Therefore, 25 μg/mL of dimeric hSOD1 diluted in 100 μL of 50 mM sodium acetate pH 6 was immobilized on a NHS-preactivated surface (3D-NHS 96-well plate, 100 μL functionalization volume, polystyrene; PolyAn, Berlin, Germany) for 1 h at RT. In all selection rounds, the surface was quenched after the hSOD1 solution was removed with 200 μL of quenching solution (50 mM ethanolamine and 100 mM Tris in 10 mM sodium phosphate pH 9) for 1 h at RT followed by five washing steps with 200 μL of washing buffer (150 mM sodium chloride and 0.05% Tween-20 in 50 mM sodium acetate pH 6). In addition before washing, the surface was blocked with 200 μL of 10 mg/mL of bovine serum albumin (BSA) in 50 mM sodium acetate pH 6 in the second round and with 200 μL of 10 mg/mL of milk powder in 50 mM sodium acetate pH 6 in the third round for 15 min at RT to reduce unspecific binding events. During those rounds, 2

https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00253
ACS Chem. Neurosci. XXXX, XXX, XXX−XXX

mg/mL of BSA or milk powder was added to the washing buffer, respectively. In the first as well as in the fourth round, the surface was not additionally blocked to vary the selection conditions. Then, 2.8 * 10^{11} phages (TriCo-16 phage display peptide library; Creative Biolabs, New York, USA) in 50 mM sodium acetate pH 6 were added and incubated for 30 min at RT in each round. After the nonbinding phages were removed, the well was washed with 200 μL of the respective washing buffer of the corresponding round. The number of washing steps after phage incubation was increased until round 3 (5/10/15/15). Elution of phages was done by incubation with 100 μL of 0.2 M glycine−HCl pH 2.2 for 10 min at RT. The phage-containing solution was then removed from the plate and neutralized by transferring it to a tube containing 25 μL of 1 M Tris-HCl pH 9.1. To determine the output titer, 5 μL of eluted phages were used. Therefore, a dilution series from 10^{-2} to 10^{-8} was prepared with the eluted phages in a total volume of 100 μL in lysogeny broth (LB) medium. Each dilution was mixed with 100 μL of *E. coli* K12 ER2738 (OD_{600} of 0.6) and plated together with 800 μL of top agar on plates (35 × 10 mm; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) containing LB-Agar-IPTG-XGal. After overnight incubation at 37 °C, the plaques were counted to determine the output titer.

The remaining eluted phages (120 μL) were amplified in 20 mL of *E. coli* K12 ER2738, starting with an OD_{600} of 0.1, for 4 h at 37 °C. Subsequently, the culture was centrifuged for 20 min at 2700*g* at 4 °C. For phage precipitation, the supernatant was added to 7 mL of PEG-8000/2.5 M sodium chloride, incubated overnight at 4 °C, and centrifuged at 2700*g* at 4 °C for 1 h. The supernatant was discarded, while the phage-containing pellet was dissolved in 1 mL of 1× PBS before another centrifugation at 4 °C and 11 000*g* for 5 min to get rid of residual bacterial components. Afterward, the supernatant was added to 200 μL of PEG-8000/2.5 M sodium chloride and incubated for 1 h on ice followed by a final centrifugation step for 45 min at 2700*g* and 4 °C. The phage-containing pellet was properly resuspended in 100 μL of 1× PBS. The input titer was determined by spectrophotometry[32] in 1× PBS using a 1:10 dilution. The resulting phages were then used in the next selection round with the same phage amount as before and further used for an enrichment ELISA as well as prepared for next-generation sequencing (NGS) analysis.

Besides the main selection with hSOD1 as a target (target selection, TS), two control selections were performed as illustrated in Figure 6



Figure 6. Schematic overview of the phage display selection with target (target selection, TS) and the corresponding control selections empty selection (ES) and direct control (DC) without target. In the first round, the phages from the peptide library are used for the target selection (TS) as well as for the control selection without target called empty selection (ES). One further control without target is performed from the second selection round called direct control (DC), where in contrast to ES, the phages resulting from previous TS are used.

to improve the sequence evaluation efficiency after NGS analysis. The first control selection, called empty selection (ES), was performed in the same way as TS but without hSOD1. During immobilization, 50 mM sodium acetate pH 6 was used instead of hSOD1. All further steps are the same as for TS so that in the end two separate selections with enriched phages were present. One further control was performed starting from the second selection round (direct control, DC). In contrast to ES, here the phages resulting from each round of TS were used for the next selection round that was performed without target protein. After four rounds, four samples for TS and ES (TS1−TS4 and ES1−ES4) and three for DC (DC2−DC4) with enriched phages were present, which were subsequently used together with the phage display peptide library for further analysis.

Enrichment ELISA. An enrichment ELISA was performed to validate the success of the phage display selection. Therefore, 25 μg/mL of dimeric hSOD1 diluted in 100 μL of 50 mM sodium acetate pH 6 was immobilized on an amino plate (Nunc Immobilizer Amino 96-well plate, polystyrene; Thermo Scientific, Waltham, USA) for 1 h at RT. Noncoated wells (50 mM sodium acetate pH 6 without hSOD1) were used as a control for each selection round. The solution was removed, and the surface was quenched with 200 μL of quenching solution (50 mM ethanolamine and 100 mM Tris in 10 mM sodium phosphate pH 9) for 1 h at RT followed by a blocking step with 200 μL of blocking solution (10 mg/mL BSA in 50 mM sodium acetate pH 6) for 15 min at RT. After three washing steps with 200 μL of washing buffer (150 mM sodium chloride, 0.05% Tween-20, 2 mg/mL of BSA in 50 mM sodium acetate pH 6), the amplified and purified phages of each target selection round were diluted in washing buffer to a total amount of 5 * 10^{10} phages in 100 μL. The wells immobilized with hSOD1 as well as noncoated wells were incubated with the corresponding phage solution for 1 h at RT. Unbound phages were removed by three washing steps with 150 μL of washing buffer. The anti-M13 antibody (horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse monoclonal antibacteriophage M13 antibody; Sino Biological, Peking, China) was diluted 1:2500 in washing buffer, and 100 μL was added into each well for 1 h at RT. After six washing steps with 150 μL of washing buffer, the supernatant was completely removed, 100 μL of the 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine (TMB) solution (TMB was previously dissolved in 1 mL of DMSO and diluted with 9 mL of 0.05 M phosphate citrate buffer pH 5) was added into each well, and after 10 min of incubation at RT, the reaction was stopped with 100 μL of 2 M H_2SO_4. The absorption was quantified at 450 nm using a microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

In addition to the samples from the target selection (TS1, TS2, TS3, TS4), the library as well as the wild-type phage without peptide were analyzed. The measurement was performed in double determination. Noncoated wells that were incubated with washing buffer without phages were used as a control for background signal.

Extraction and Amplification of ssM13 DNA for Sequencing. The single-stranded phage DNA from each sample from the phage display selection (all samples from TS, ES, and DC containing enriched phages in 1× PBS as well as the library) were purified and prepared for next-generation sequencing (NGS). Therefore, 10 μL of each input sample was diluted in 600 μL of 1× PBS and incubated with 200 μL of PEG-8000/2.5 M sodium chloride for 20 min at RT after the samples were inverted eight times. The samples were then centrifuged at 20 800*g* for 10 min at 4 °C. The supernatant was removed, and the pellet was carefully resuspended in 200 μL of a 10:1 mixture of 3 M sodium acetate (pH 5.2) and TE. The samples were incubated with 500 μL of 99% ethanol for 15 min at RT before centrifugation at 20 800*g* and 4 °C for 10 min. The supernatant was discarded, and the pellet was washed with 250 μL of 70% ethanol. After a final centrifugation step for again 10 min at 20 800*g* and 4 °C, the supernatant was removed, and the pellet was dried at 30 °C for 8 min before being resuspended in 40 μL of 10 mM Tris pH 8. The concentration of the DNA was determined by the absorption at 260 nm.

The ssDNA was amplified using the KAPA HiFi HotStart ReadyMixPCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, USA) and the polymerase chain reaction (PCR) for the subsequent NGS. For each 25 ng of phage DNA, 5 μM primers (forward: 5′-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGCAATTCCTTTAGTGGTACC-3′, reverse: 5′-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTCATAGTTAGCGTAACG-3′) and 12.5 μL of KAPA Hifi Hot Start Ready Mix were added and filled up to 25 μL with ddH_2O. The PCR protocol was composed as follows: initial step at 95 °C for 3 min, followed by 25 cycles with denaturation of DNA at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s. A final step of the extension at 72 °C was done for 5 min. The concentration of the amplified DNA was measured by the absorption

https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00253
ACS Chem. Neurosci. XXXX, XXX, XXX−XXX

at 260 nm and the success of the PCR was evaluated using a 1% agarose gel. Further sample processing and NGS analysis was performed by the Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum at the Heinrich Heine University in Düsseldorf, Germany.

Sequence Analysis. The resulting sequencing from the NGS analysis was processed and evaluated with the Target Sequencing Analysis Tool (TSAT), an evaluation software that has been developed by our research group. The use of advanced controls during the phage display selection as well as the establishment of NGS analysis including further sequencing processing via TSAT enabled a high throughput for the identification of target-specific binders.

TSAT is a program that is based on a Python script with front-end access for user. The following modules were used during its creation: Tkinter,[33] Bio,[34] base64,[35] re,[36] collections,[37] sqlite3,[38] time,[39] datetime,[40] sys,[41] and threading.[42]

TSAT screens a given document for the fixed regions directly upstream and downstream of the randomized peptide coding region in the phage genome. The peptide coding sequence is excised and checked for its length. If the length of the nucleotides is dividable by 3, it is translated into the corresponding amino acids. Otherwise, the code is discarded and listed in a document of incomplete sequences. The translated sequences are temporarily saved in a dictionary, which documents the amino acid composition and the total count of each single sequence. For further analysis, the resulting data are transferred to and saved in a data bank. The frequencies of each translated sequence are then normalized to the total number of all translated sequences of the corresponding selection and converted into a parts per million (ppm) format to allow easier comparison between different selections. This is done for each sample of the selection rounds containing the target selection (TS), direct control (DC), and the empty selection (ES) as described in 0. Subsequently, the resulting data from each selection round are compared with each other, whereby only those sequences are considered at the end that have accumulated during the selection starting from the library and that are more or equally frequently present in the TS than in the corresponding ES and DC, respectively. Thus, enriched unspecific binders such as plate binders are removed from the evaluation by directly comparing the selection with target with those without target. The filtered sequences are then assigned two parameters called empty score (EmS) and enrichment factor (EnF). EnF is the frequency of a sequence in the last target selection round divided by the frequency of the same sequence in the library, whereas EmS represents the frequency of a sequence in the last target selection round divided by the frequency of the same sequence in the last empty selection round. As a last step, a scoring list is created based on the EmS values, and the sequences are saved in a FASTA format for the subsequent sequence alignment using the open source software Hammock[43] using default parameters expect that sequence input was done sorted by the EmS values.

Labeling of Native hSOD1 with Fluorophore CF633. CF633 succinimidyl ester (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was used for labeling native hSOD1 according to the manufacturer's instructions with a few modifications. Therefore, 10 μL of a 50 mM dye stock solution in anhydrous DMSO was added to 190 μL of 180 μM hSOD1 (monomeric concentration) in 50 mM sodium acetate pH 6, which corresponds to a dye/protein molar ration of 15:1 and results in a final concentration of 5% DMSO. All further steps were performed as described in the manufacturer's manual. Free dye was removed by dialysis against 50 mM sodium acetate pH 6. The concentration of labeled CF633-hSOD1 was determined by Bradford assay.[44]

Microscale Thermophoresis Measurements for K_D Determination. In order to determine the equilibration dissociation constant (K_D) of hSOD1 to the selected peptide, microscale thermophoresis (MST) measurements were performed using a Monolith NT.115 blue/red instrument (Nanotemper Technologies, Munich, Germany). Fluorescently labeled hSOD1 (CF633-hSOD1; DOL of 0.5) with a final dimeric concentration of 250 nM was added to samples containing increasing concentrations of unlabeled peptide. Therefore, a 1:1 serial dilution of peptide and a 500 nM CF33-hSOD1 stock solution were prepared in 50 mM sodium acetate pH 6 containing 150 mM sodium chloride and 0.05% Tween-20. The 16 samples were then transferred into specialized glass capillaries (Monolith NT.155 premium capillaries MO-K025; Nanotemper Technologies, Munich, Germany). The measurement was performed at 25 °C using the blue/red channel with an MST and LED power of 40% leading to fluorescence levels between 700 and 900 units. For all experiments, standard parameters were used as recommend by the manufacturer (delay time of heating period of 30 s and re-equilibration period of 5 s). The data were evaluated through the thermophoresis effect using the manufacturer supplied NT analysis software (version 1.5.41).

Thioflavin T Assay. Thioflavin T (ThT) assay was performed to analyze the influence of peptide on hSOD1 fibrillation and/or amyloid-like aggregation. Lyophilized peptides were solved in filtered ddH_2O. Buffers and solutions were then sterile filtered (for larger volumes: Minisart-Plus syringe filter, 0.2 μm, Sartorius, Göttingen, Germany; for smaller volumes: Anotop 10 syringe filter, 0.2 μm, Cytiva, Chicago, USA), while the hSOD1 stock solution in 50 mM sodium acetate buffer pH 6 was centrifuged for 10 min at 20 800g and 21 °C to remove larger particles. Before pipetting together, all components were prewarmed for 1 h at 37 °C. Then, 5 μM dimeric hSOD1 was mixed with 5 μM ThT, 10 mM TCEP, 5 mM EDTA, 150 mM sodium chloride, and the corresponding concentration of peptide (protein/peptide molar ratios of 1:1, 1:2, 1:5, and 1:10 related to the monomeric concentration of hSOD1) in 50 mM sodium acetate buffer pH 6. As controls, a sample with hSOD1 and without peptide and a sample without hSOD1 and with peptide were used. All prepared samples were incubated for 15 min at 37 °C without agitation. Then, 120 μL of each sample was transferred into a well of a 96-well half-area flat-bottom microplate (Corning, New York, USA) containing one 3.2 mm stainless steel bead (Biospec Products, Bartlesville, USA), and the plate was sealed with a foil for 96-well microplates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The progression of fluorescence intensity was measured using a microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at 37 °C every 15 min at λ_{ex} = 448−10 nm and λ_{em} = 482−10 nm with 30 s of agitation at 400 rpm before every measurement. The measurements were performed in a 3- to 5-fold determination.

Cell Viability Assay. A cell viability assay using the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was performed to investigate the cytotoxicity of hSOD1 species that were previously incubated with and without S1VL-21 under aggregating conditions. Therefore, Neuro2a cells were cultivated in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin and streptomycin. A total of 2500 cells per well in a volume of 100 μL were seeded on flat-bottomed 96-well plates (VWR, Radnor, USA) and incubated in a 95% humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37 °C for 6 h. Aggregates of hSOD1 alone and hSOD1 incubated with increasing concentrations of S1VL-21 (1:1; 1:5; 1:10) under aggregating conditions were prepared as described in 0. The samples were collected after 65 h and centrifuged for 1 h at 4 °C and 100 000g. The supernatant was completely removed, whereas the pellet was dissolved in the same volume of cell culture medium (DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin and 1% streptomycin) and diluted to 1:1. Neuro2a cells were then treated with 30 μL of each sample and were further incubated for 3 days in a 95% humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37 °C. Cell viability was measured using the Cell Proliferation Kit I according to the manufacturer's instructions (Roche, Basel, Switzerland) in a 5-fold determination. The absorbance of the formazan product was determined by measuring the absorption at 570 nm subtracted by the absorbance at 690 nm in a microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). The results were normalized to the mean value of cells treated with medium only. As a positive control for cytotoxicity, 10% DMSO diluted in medium was used.

https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00253
ACS Chem. Neurosci. XXXX, XXX, XXX−XXX

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Jeannine Mohrlüder − *Institute of Biological Information Processing: Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany;* orcid.org/0000-0002-9922-2986; Phone: +49-2461-613518; Email: j.mohrlueder@fz-juelich.de

Dieter Willbold − *Institute of Biological Information Processing: Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany; Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany;* orcid.org/0000-0002-0065-7366; Phone: +49-2461-612100; Email: d.willbold@fz-juelich.de

Authors

Karoline Santur − *Institute of Biological Information Processing: Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany; Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany*

Elke Reinartz − *Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany*

Yi Lien − *Institute of Biological Information Processing: Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany*

Markus Tusche − *Institute of Biological Information Processing: Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany*

Tim Altendorf − *Institute of Biological Information Processing: Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany; Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany*

Marc Sevenich − *Institute of Biological Information Processing: Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany; Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany*

Gültekin Tamgüney − *Institute of Biological Information Processing: Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany; Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany*

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acschemneuro.1c00253

Author Contributions

K.S. contributed to the design of the TSAT software, contributed to the design of experiments, performed most of the experiments, analyzed data, and wrote the initial draft of the manuscript; E.R. contributed to the design of experiments and provided feedback on experimental results; Y.L. and M.T. performed cell cultivation; T.A. contributed to the design of TSAT and edited the manuscript; M.S. contributed to the design of TSAT; G.T. contributed to the design of the cell viability assay as well as provided feedback on experimental results; J.M. contributed to the study conception and design and edited the manuscript; D.W. designed the overall study and edited the manuscript. All authors contributed to the preparation of this manuscript as well as read and approved the final manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their thanks to the Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum of the Heinrich Heine University Düsseldorf for performing the NGS analysis.

REFERENCES

(1) Bento-Abreu, A., Van Damme, P., Van Den Bosch, L., and Robberecht, W. (2010) The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci 31*, 2247−2265.

(2) Sreedharan, J., and Brown, R. H., Jr (2013) Amyotrophic lateral sclerosis: problems and prospects. *Ann. Neurol. 74*, 309−316.

(3) Grad, L. I., Rouleau, G. A., Ravits, J., and Cashman, N. R. (2017) Clinical spectrum of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Cold Spring Harbor Perspect. Med. 7*, a024117.

(4) Gordon, P. H. (2013) Amyotrophic lateral sclerosis: an update for 2013 clinical features, pathophysiology, management and therapeutic trials. *Aging Dis 04*, 295−310.

(5) Zhao, B., Marciniuk, K., Gibbs, E., Yousefi, M., Napper, S., and Cashman, N. R. (2019) Therapeutic vaccines for amyotrophic lateral sclerosis directed against disease specific epitopes of superoxide dismutase 1. *Vaccine 37*, 4920−4927.

(6) Baskoylu, S. N., Yersak, J., O'Hern, P., Grosser, S., Simon, J., Kim, S., Schuch, K., Dimitriadi, M., Yanagi, K. S., Lins, J., et al. (2018) Single copy/knock-in models of ALS SOD1 in C. elegans suggest loss and gain of function have different contributions to cholinergic and glutamatergic neurodegeneration. *PLoS Genet. 14*, No. e1007682.

(7) Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide-dismutase gene are associated with familial amyotrophic-lateral-sclerosis. *Nature 362*, 59−62.

(8) Valentine, J. S., Doucette, P. A., and Zittin Potter, S. (2005) Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu. Rev. Biochem. 74*, 563−593.

(9) Roe, J. A., Butler, A., Scholler, D. M., Valentine, J. S., Marky, L., and Breslauer, K. J. (1988) Differential scanning calorimetry of Cu,Zn-superoxide dismutase, the apoprotein, and its zinc-substituted derivatives. *Biochemistry 27*, 950−958.

(10) Rodriguez, J. A., Valentine, J. S., Eggers, D. K., Roe, J. A., Tiwari, A., Brown, R. H., Jr, and Hayward, L. J. (2002) Familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations decrease the thermal stability of distinctly metallated species of human copper/zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem. 277*, 15932−15937.

(11) Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., Wilcox, H. M., Flood, D. G., Beal, M. F., Brown, R. H., Jr, et al. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet. 13*, 43−47.

(12) Jonsson, P. A., Graffmo, K. S., Brannstrom, T., Nilsson, P., Andersen, P. M., and Marklund, S. L. (2006) Motor neuron disease in mice expressing the wild type-like D90A mutant superoxide dismutase-1. *J. Neuropathol. Exp. Neurol. 65*, 1126−1136.

(13) Graffmo, K. S., Forsberg, K., Bergh, J., Birve, A., Zetterstrom, P., Andersen, P. M., Marklund, S. L., and Brannstrom, T. (2013) Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet. 22*, 51−60.

(14) van Zundert, B., and Brown, R. H., Jr (2017) Silencing strategies for therapy of SOD1-mediated ALS. *Neurosci. Lett. 636*, 32−39.

(15) Bosco, D. A., Morfini, G., Karabacak, N. M., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, B. A., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., et al. (2010) Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat. Neurosci. 13*, 1396−1403.

https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00253
ACS Chem. Neurosci. XXXX, XXX, XXX−XXX

(16) Forsberg, K., Jonsson, P. A., Andersen, P. M., Bergemalm, D., Graffmo, K. S., Hultdin, M., Jacobsson, J., Rosquist, R., Marklund, S. L., and Brannstrom, T. (2010) Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients. *PLoS One 5*, No. e11552.
(17) Forsberg, K., Andersen, P. M., Marklund, S. L., and Brannstrom, T. (2011) Glial nuclear aggregates of superoxide dismutase-1 are regularly present in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. 121*, 623−634.
(18) Grad, L. I., Yerbury, J. J., Turner, B. J., Guest, W. C., Pokrishevsky, E., O'Neill, M. A., Yanai, A., Silverman, J. M., Zeineddine, R., Corcoran, L., et al. (2014) Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111*, 3620−3625.
(19) Chia, R., Tattum, M. H., Jones, S., Collinge, J., Fisher, E. M., and Jackson, G. S. (2010) Superoxide dismutase 1 and tgSOD1 mouse spinal cord seed fibrils, suggesting a propagative cell death mechanism in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One 5*, No. e10627.
(20) Furukawa, Y., Kaneko, K., Watanabe, S., Yamanaka, K., and Nukina, N. (2013) Intracellular seeded aggregation of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis. *FEBS Lett. 587*, 2500−2505.
(21) Grad, L. I., Pokrishevsky, E., Silverman, J. M., and Cashman, N. R. (2014) Exosome-dependent and independent mechanisms are involved in prion-like transmission of propagated Cu/Zn superoxide dismutase misfolding. *Prion 8*, 331−335.
(22) Rakhit, R., Crow, J. P., Lepock, J. R., Kondejewski, L. H., Cashman, N. R., and Chakrabartty, A. (2004) Monomeric Cu,Zn-superoxide dismutase is a common misfolding intermediate in the oxidation models of sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem. 279*, 15499−15504.
(23) Ding, F., Furukawa, Y., Nukina, N., and Dokholyan, N. V. (2012) Local unfolding of Cu, Zn superoxide dismutase monomer determines the morphology of fibrillar aggregates. *J. Mol. Biol. 421*, 548−560.
(24) Lai, Z., Colon, W., and Kelly, J. W. (1996) The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid. *Biochemistry 35*, 6470−6482.
(25) Wiseman, R. L., Johnson, S. M., Kelker, M. S., Foss, T., Wilson, I. A., and Kelly, J. W. (2005) Kinetic stabilization of an oligomeric protein by a single ligand binding event. *J. Am. Chem. Soc. 127*, 5540−5551.
(26) van Groen, T., Schemmert, S., Brener, O., Gremer, L., Ziehm, T., Tusche, M., Nagel-Steger, L., Kadish, I., Schartmann, E., Elfgen, A., et al. (2017) The Abeta oligomer eliminating D-enantiomeric peptide RD2 improves cognition without changing plaque pathology. *Sci. Rep. 7*, 16275.
(27) Kutzsche, J., Schemmert, S., Tusche, M., Neddens, J., Rabl, R., Jurgens, D., Brener, O., Willuweit, A., Hutter-Paier, B., and Willbold, D. (2017) Large-scale oral treatment study with the four most promising D3-derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules 22*, 1693.
(28) Schemmert, S., Schartmann, E., Zafiu, C., Kass, B., Hartwig, S., Lehr, S., Bannach, O., Langen, K. J., Shah, N. J., Kutzsche, J., et al. (2019) Abeta oligomer elimination restores cognition in transgenic Alzheimer's mice with full-blown pathology. *Mol. Neurobiol. 56*, 2211−2223.
(29) Abdolvahabi, A., Shi, Y. H., Rasouli, S., Croom, C. M., Chuprin, A., and Shaw, B. F. (2017) How do gyrating beads accelerate amyloid fibrillization? *Biophys. J. 112*, 250−264.
(30) Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., and Takeda, T. (1989) Fluorometric-determination of amyloid fibrils invitro using the fluorescent dye, thioflavine-T. *Anal. Biochem. 177*, 244−249.
(31) Santur, K. B., Sevenich, M. M., Schwarten, M., Nischwitz, V., Willbold, D., and Mohrluder, J. (2018) In vitro reconstitution of the highly active and natively folded recombinant human superoxide dismutase 1 holoenzyme. *Chemistryselect 3*, 7627−7632.
(32) Casadevall, A., and Day, L. A. (1982) DNA packing in the filamentous viruses fd, Xf, Pf1 and Pf3. *Nucleic Acids Res. 10*, 2467−2481.
(33) Lundh, F. (1999) An introduction to Tkinter, https://docs.python.org/3/library/tkinter.html.
(34) Cock, P. J. A., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., et al. (2009) Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics 25*, 1422−1423.
(35) base64 — Base16, Base32, Base64, Base85 Data Encodings, https://docs.python.org/3/library/base64.html?highlight=base64#module-base64.
(36) re — regular expression operations, https://docs.python.org/3/library/re.html?highlight=re#module-re.
(37) collections — container datatypes, https://docs.python.org/3/library/collections.html?highlight=collections#module-collections.
(38) Hipp, D. R. (2020) SQLite, https://www.sqlite.org/index.html.
(39) time — time access and conversions, https://docs.python.org/3/library/time.html.
(40) datetime — basic date and time types, https://docs.python.org/3/library/datetime.html?highlight=datetime#module-datetime.
(41) sys — system-specific parameters and functions, https://docs.python.org/3/library/sys.html?highlight=sys#module-sys.
(42) threading — thread-based parallelism, https://docs.python.org/3/library/threading.html.
(43) Krejci, A., Hupp, T. R., Lexa, M., Vojtesek, B., and Muller, P. (2016) Hammock: a hidden Markov model-based peptide clustering algorithm to identify protein-interaction consensus motifs in large datasets. *Bioinformatics 32*, 9−16.
(44) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem. 72*, 248−254.

https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00253
ACS Chem. Neurosci. XXXX, XXX, XXX−XXX

4 Weitere Resultate

4.1 Materialien & Methoden

4.1.1 Peptide

Die in dieser Arbeit selektierten und ausgewählten Peptide wurden von der Firma Caslo (Lyngby, Dänemark) synthetisiert. Bei allen Peptiden lag der C-Terminus amidiert vor. Informationen bezüglich der Anzahl an Aminosäuren, der Sequenz und des Molekulargewichts der einzelnen Peptide sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Auflistung der im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit analysierten Peptide mit Angabe der Sequenz, Aminosäurenanzahl und des Molekulargewichts der jeweiligen Peptide. Die Peptide wurden von der Firma Caslo (Lyngby, Dänemark) synthetisiert und sind am C-Terminus amidiert.

Peptid	Sequenz	Aminosäurenanzahl	Molekulargewicht [g/mol]
S1VL-1	RPYNPSHYWHEIHTVQ	16	2063
S1VL-2	EEPWNRPDWKMSHNKH	16	2090
S1VL-3	QFGSPSVQQYRHLYFR	16	2012
S1VL-4	MPGHQESIKVQNWNRV	16	1922
S1VL-5	KISPRDTHGWYNMPWQ	16	2015
S1VL-6	EHVVWMRHAEHGWAPM	16	1972
S1VL-7	WGKQPQTHPTIWSPPV	16	1858
S1VL-8	YDTPKHKDKTWPMMHH	16	2051
S1VL-9	SVSVWVKPAAWEYGIH	16	1828
S1VL-10	WPHHKQQVGRPAAQSM	16	1857
S1VL-11	YDPMKWQITHWALRP	15	1941
S1VL-12	FHDTLTHPMQPWDWPP	16	2004
S1VL-13	YTNEIERYRPHQTNYR	16	2139
S1VL-14	GDEYYKSYQRKSHQLW	16	2087
S1VL-15	THRHHESMDVTHFVKH	16	1997
S1VL-16	GELQKKMDWLSTMPIM	16	1907
S1VL-17	HPFQMLDINTIRDPVP	16	1892
S1VL-18	KWTTFSQPGTENWFYQ	16	2019
S1VL-19	LPVPSYYSFGSPQYDY	16	1882
S1VL-20	HEVTRWINPLRPIYAL	16	1977
S1VL-21	YKHSWETQEKQNYVTD	16	2055
S1VL-22	YPTYPWYYFWHQEDEITRRD	20	2765
S1VL-23	HVEKYWHHNQHHKNVQ	16	2120
S1VL-24	ASFGEKFHPFV	11	1264
S1VL-25	EQYNWVDWIITYTQHE	16	2124
S1VL-26	HYQQYEWLHPDWQEAG	16	2086
S1VL-27	FGGTYEWEWHWETLAW	16	2097
S1VL-21_Rdm1	KWYHEEVTYKQDTQNS	16	2055
S1VL-21_Rdm2	YKYVTTENHDSQEQKW	16	2055
S1VL-21_Rdm3	HKSNDKEWTETQQYVY	16	2055

4.1.2 *Microscale thermophoresis* (MST)-Messungen zur Bestimmung der Bindungsaffinität der selektierten Peptide zu nativer hSOD1

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität der im Rahmen dieser Arbeit selektierten Peptide (Tabelle 1) zu nativer hSOD1 wurden *microscale thermophoresis* (MST)-Messungen durchgeführt.

MST ist eine biophysikalische Methode zur Analyse von Interaktionen zwischen Biomolekülen, welche auf dem Prinzip der Thermophorese, d.h. der gerichteten Bewegung von Molekülen innerhalb eines Temperaturgradienten basiert. Die Thermophorese ist dabei abhängig von den Eigenschaften des zu untersuchenden Analyten wie der Größe, Ladung und der Hydratationshülle. Kleinste Veränderungen dieser Eigenschaften, beispielsweise hervorgerufen durch einen Liganden, ermöglichen die Quantifizierung molekularer Ereignisse wie die Bindung zweier Moleküle. Dabei werden die thermophoretischen Eigenschaften eines fluoreszenzmarkierten Analyten in Abhängigkeit eines nicht-markierten Liganden in mehreren, kleinen Glaskapillaren, die eine Lösung bestehend aus konstanter Analyt- und steigender Ligandenkonzentration enthalten, verfolgt. Ein Infrarot-Laser, welcher einen präzisen Temperaturgradienten von 2-6 K induziert, wird durch ein Objektiv auf die Glaskapillaren fokussiert. Gleichzeitig wird die emittierte Fluoreszenz des fluoreszenzmarkierten Analyten durch dasselbe Objektiv erfasst, wodurch eine Thermophorese-abhängige Abnahme oder Akkumulation der Fluoreszenz innerhalb des Temperaturgradienten verfolgt werden kann. Eine Änderung der Fluoreszenzintensität ist jedoch nicht nur auf die Thermophorese zurückzuführen, sondern auch ein Resultat der intrinsischen Temperaturabhängigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes und wird als sogenannter Temperatursprung (T-Jump) bezeichnet, welcher in den ersten Millisekunden der Lasereinwirkung beobachtet wird. Liegt keine bzw. eine aufgrund zu niedriger Ligandenkonzentration nicht-detektierbare Bindung zwischen den zu untersuchenden Molekülen vor, so weist der Analyt ein Laufverhalten innerhalb des Temperaturgradienten auf, welches für einen ungebundenen Zustand charakteristisch ist. Die Bindung eines Liganden und die daraus resultierende Veränderung der Moleküleigenschaften des fluoreszenzmarkierten Analyten führen zu einem veränderten Laufverhalten innerhalb des Temperaturgradienten. In einigen Fällen beeinflusst die Bindung nicht nur die thermophoretischen Eigenschaften des fluoreszenzmarkierten Analyten, sondern auch dessen Reaktion auf die Temperaturänderung. Je nach Auswertungsmodus der Messdaten, die in die Analyse der Fluoreszenzänderung und der damit verbundenen veränderten Thermophorese des Analyten resultierend aus der Titration eines nicht-fluoreszenzmarkierten Liganden einfließen, können die Effekte der Thermophorese und des T-Jumps zur Berechnung der Dissoziationskonstante K_D unterschiedlich stark berücksichtigt werden [167, 168].

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität der selektierten Peptide (Tabelle 1) zur hSOD1 mit Hilfe von MST-Messungen wurde die mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF633 über primäre Amine gekoppelte, rekonstituierte hSOD1 (siehe Manuskript 3.2, S. 37; *Labeling of Native hSOD1 with Fluorophore CF633*) mit einer konstanten dimeren Endkonzentration von 250 nM zu Proben mit steigender Konzentration an nicht-markiertem Peptid hinzugefügt. Hierfür wurden je 0,5 mg der Peptide in 200 µL 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6 mit 150 mM NaCl und 0,05% Tween-20 gelöst. Die Konzentration wurde über die Absorption bei 280 nm (Formel 1) bestimmt bzw. über Einwiegen (Formel 2) berechnet, falls eine photometrische Messung aufgrund eines fehlenden Extinktionskoeffizienten nicht möglich war. Anschließend wurde eine serielle 1:1-Verdünnungsreihe des Peptides mit insgesamt 16 Konzentrationen und eine 500 nM CF633-hSOD1-Lösung in dem zuvor genannten Puffer hergestellt. Die einzelnen Peptidlösungen wurden dann im gleichen Volumenverhältnis mit CF633-hSOD1 versetzt und in die für die Messung vorgesehenen Glaskapillaren (MO-K025 bzw. MO-K022; Nanotemper technologies, München, Deutschland) transferiert. Um eine Verdunstung der Proben zu vermeiden, wurde Wachs-haltiges Material (NT wax tight sealing; Nanotemper technologies, München, Deutschland) zur Versiegelung der Kapillaren verwendet. Die Messung der 16 Proben erfolgte am Monolith NT.115 Blue/Red (Nanotemper technologies, München, Deutschland) bei 25 °C mit einer LED-Leistung von 40%, was zu Fluoreszenzwerten zwischen 650 und 950 Einheiten führte, wobei lediglich die Messungen berücksichtigt wurden, die eine Abweichung der Fluoreszenzwerte von maximal 10% innerhalb einer Messreihe aufwiesen. Für alle Messungen wurden die vom Hersteller empfohlenen Standardparameter verwendet und die Messdaten wurden mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten Analyse-Software (NT analysis software, Version 1.5.21) unter Berücksichtigung des Thermophorese-Effekts bei einer MST-Leistung von 40% zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) ausgewertet.

$$c = \frac{A_{280\,nm}}{\epsilon * d} * VF \qquad \text{(Formel 1)}$$

c: Konzentration [mol/L]
$A_{280\,nm}$: gemessene Absorption bei 280 nm
ϵ: Extinktionskoeffizient [$L*mol^{-1}*cm^{-1}$]
d: Schichtdicke der Küvette [cm]
VF: Verdünnungsfaktor

$$c = \frac{m}{MW} * V \qquad \text{(Formel 2)}$$

c: Konzentration [mol/L]
m: Masse [g]
M: Molekulargewicht [g/mol]
V: Volumen [L]

4.1.3 Thioflavin T (ThT)-Assay zur Analyse des Einflusses der selektierten Peptide auf das amyloidähnliche Aggregationsverhalten von hSOD1

Um den Einfluss der im Rahmen dieser Arbeit selektierten Peptide (Tabelle 1) auf die amyloidähnliche Aggregation von hSOD1 zu bestimmen, wurde ein Thioflavin T (ThT)-Assay durchgeführt. Seit der Darstellung des Potentials von ThT im Jahre 1959 durch Vassar und Culling [169] ist die Nutzung des Benzothiazolfarbstoffes heute eines der meistgenutzten Methoden zur Analyse der Bildung von amyloiden Strukturen [170, 171]. In Lösung besitzt ThT nur eine geringe Fluoreszenzemission. Bei Bindung von ThT an β-Faltblatt-reichen Strukturen wird die Fluoreszenzintensität verstärkt und es kommt zu einer Verschiebung des Anregungs- (385 → 450 nm) und des Emissionsmaximums (445 → 482 nm) [172, 173]. Dabei ist in Proteinlösungen die Interaktion zwischen ThT und amyloiden Strukturen spezifisch und eine Erhöhung der ThT-Fluoreszenzintensität wird mit amorphen Aggregaten oder löslichen Proteinen nicht beobachtet [170]. Naiki *et al.* wiesen nach, dass die Emissionsintensität linear von der Menge an amyloiden Strukturen abhängt [172], sodass die amyloidähnliche Aggregation von hSOD1 und der Einfluss der Peptide in Abhängigkeit der Zeit anhand der Entwicklung der ThT-Fluoreszenzintensität verfolgt werden kann. Normalerweise zeigt die zunehmende ThT-Fluoreszenzemission und die damit verbundene Menge der amyloidähnlichen Aggregate in Abhängigkeit der Zeit einen charakteristischen, sigmoidalen Verlauf. In der Regel beginnt die Assemblierung amyloider Spezies mit einer Verzögerungsphase, die sogenannte Lag-Phase, in der es zur Bildung von Nukleationskeimen aus einer (partiell) fehlgefalteten, monomeren Vorstufe kommt. Die anschließende Elongationsphase wird durch ein schnelles, exponentielles Wachstum durch die Anlagerung von weiteren Monomeren gekennzeichnet. Dabei beeinflussen weitere sekundäre Prozesse wie die sekundäre Nukleation, in der es zur Bildung eines neuen Keims beginnend an der Oberfläche einer bereits existierenden Fibrille kommt, und/oder die Fragmentation von Fibrillen zusätzlich die Amyloidassemblierung. Die Reaktion endet mit einem Plateau, welches durch die Konzentration an freien Monomere bedingt ist [170, 174, 175].

Zur Analyse des Einflusses der selektierten Peptide auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation wurde zunächst lyophilisiertes Peptid in gefiltertem ddH_2O gelöst und steril filtriert. Alle weiteren Lösungen sowie der finale Puffer wurden ebenfalls steril filtriert mit Hilfe der Spritzenvorsatzfilter Minisart-Plus (0,2 µm; Sartorius, Göttingen, Deutschland) für größere Volumina und Anotop 10 (0,2 µm; Cytiva, Chicago, USA) für kleinere Volumina. Lediglich die rekonstituierte hSOD1-Stocklösung in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6 (Manuskript 3.1) wurde kurz vor der Verwendung für 10 min bei 20800 x g und 21 °C zentrifugiert, um gegebenfalls vorhandene größere Bestandteile zu entfernen und so

einen Probenverlust durch Filtration zu vermeiden. Im Laufe der Arbeit zeigte sich, dass eine Vorinkubation der Materialien und Lösungen bei 37 °C zu homogeneren Messdaten führte, sodass bei späteren Versuchen (in den Ergebnissen vermerkt) zunächst alle Bestandteile für 1 h bei 37 °C inkubiert wurden bevor die Lösungen zusammen pipettiert wurden. Anschließend wurden 5 µM dimere hSOD1 in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6 mit 5 µM ThT, 5 mM EDTA, 10 mM TCEP, 50 mM bzw. 150 mM NaCl und mit der zu untersuchenden Konzentration an Peptid versetzt. Als Kontrolle diente eine Probe mit hSOD1 ohne Peptid. Um eine Fibrillierung bzw. amyloidähnliche Aggregation des Peptides selbst auszuschließen, wurde die Fluoreszenzentwicklung der jeweiligen Peptide mit ThT ohne hSOD1 ebenfalls verfolgt. Die Ansätze, bei denen eine Vorinkubation der Materialien bei 37 °C durchgeführt wurde, wurden anschließend erneut für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert bevor die Messung der Fluoreszenzintensitätsentwicklung in einer Mikrotiterplatte (Corning; New York, USA) mit je einer 3,2 mm Edelstahlperle (Biospec products; Waltham, USA) und mit einem Probenvolumen von 120 µL pro Vertiefung mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (BMG Labtech; Ortenberg, Deutschland) gestartet wurde. Die Mikrotiterplatte wurde nach dem Befüllen mit einer Folie versiegelt (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA) und der Verlauf der Fluoreszenzintensität wurde bei 37 °C alle 15 min mit einer Anregungswellenlänge (λ_{ex}) von 448 nm und einer Emissionswellenlänge (λ_{em}) von 482 nm gemessen, wobei die Platte für 30 s mit 400 rpm vor jeder Messung geschüttelt wurde. Die Messungen wurden in einer 3- bis 5-fach Bestimmung durchgeführt. Die ThT-Fluoreszenzintensität jedes Assays wurde auf den höchsten Wert normiert und gegen die Zeit aufgetragen. Die Berechnung der *lag time* (t_{lag})-Werte erfolgte anhand der sigmoidalen Anpassung der einzelnen Messreihen mit Hilfe der Boltzmann-Fitfunktion (Formel 3) der Software OriginPro 2019.

$$A = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x - x_0)/dx}} + A_2 \qquad \text{(Formel 3)}$$

mit: $t_{lag}\,[\mathrm{h}] = x_0 - 2 * dx$

Einfluss von S1VL-21 auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation abhängig vom Zeitpunkt der Peptidzugabe

Das im Rahmen dieser Arbeit genauer untersuchte Peptid S1VL-21 wurde außerdem auf dessen Einfluss auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation abhängig vom Zeitpunkt der Peptidzugabe analysiert. Hierfür wurde ein ThT-Assay wie zuvor beschrieben (4.1.3) mit einer Vorinkubation bei 37 °C durchgeführt mit der Ausnahme, dass die Peptidzugabe erst nach Beginn der Messung der Fluoreszenzemission erfolgte. Dazu wurde kurz vor der Peptidzugabe lyophilisiertes Peptid in ddH_2O aufgenommen und nach steriler Filtration in einem 10-fachen molaren Überschuss bezogen auf die hSOD1-Monomerkonzentration zu den hSOD1-Fibrillationsproben nach 20 h, 27,5 h und 44,5 h ab Beginn der Fluoreszenzintensitätsaufzeichnung hinzugefügt. Als Kontrolle wurde statt des Peptides das gleiche Volumen an ddH_2O zu den hSOD1-Fibrillationsproben hinzugefügt.

4.1.4 Analyse der resultierenden hSOD1-Spezies nach Aggregation mit und ohne S1VL-21 Inkubation mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie

Zur Untersuchung der Morphologie der nach Aggregation resultierenden hSOD1-Spezies mit und ohne Inkubation des Peptids S1VL-21 wurden mikroskopische Aufnahmen der Proben am Rasterkraftmikroskop durchgeführt.

Die Rasterkraftmikroskopie wurde im Jahre 1986 von Binnig, Quate und Gerber [176] eingeführt und ermöglicht u.a. das Abbilden der Morphologie einer Probe im Sub-Nanometer-Bereich. Vereinfacht ausgedrückt ist das Prinzip des Rasterkraftmikroskops das rasterförmige Abtasten der Oberfläche der zu messenden Probe mit Hilfe einer nanoskopischen Messspitze. Die daraus resultierende Wechselwirkung, die auf die Messspitze ausgeübt wird, wird registriert und ein Oberflächenprofil der Probe entsteht. Die Spitze ist dabei an einer Blattfeder, dem sogenannten Cantilever, befestigt, welcher mit Hilfe von Piezokristallen, deren räumliche Ausdehnung abhängig von der Ausrichtung der angelegten Spannung ist, über die Probe bewegt wird. Die Bewegung der Spitze über das zu messende Objekt führt abhängig zur Höhe der Probenoberfläche zur Auslenkung des Cantilevers. Die Auslenkung des Cantilevers wird anschließend mit Hilfe eines positionssensitiven Photodetektors und eines vom Cantilever reflektierendem Laserstrahls erfasst. Je nach Betriebsmodus können mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops atomare bis subatomare Auflösungen erzielt werden. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde der intermittierende Modus, auch *tapping mode* [177] genannt, verwendet. Dabei wird der Cantilever nahe seiner Resonanzfrequenz, d.h. die Frequenz, bei der die Amplitude maximal wird, angeregt. Die Spitze am Cantilever tastet mit einer definierten Amplitude die Probe Stück für Stück ab und aufgrund der kurzzeitigen

Berührung mit der Probenoberfläche wird die Schwingung des Cantilevers eingeschränkt und es kommt zu einer Veränderung der Amplitude. Da jedoch die Schwingungsamplitude konstant gehalten wird, wird die Höhe bzw. der Abstand zwischen Probe und Messspitze nachreguliert. Die Auftragung der daraus resultierenden Veränderung auf der Z-Piezo-Achse gegen den Ort ermöglicht so eine Abbildung der Oberflächentopographie [178, 179].

Mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops wurden hSOD1-Proben, die mit und ohne S1VL-21 während der Aggregation inkubiert wurden (siehe 4.1.3; Beispiel in Manuskript 3.2, S. 33), auf die Verteilung und Morphologie der resultierenden hSOD1-Spezies analysiert. Verglichen wurden dabei Proben von hSOD1 ohne Peptid und mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-21 nach einer 65-stündigen Inkubation unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen. Als Kontrolle wurde die Probe, bei der das Peptid ohne hSOD1 vorlag, ebenfalls analysiert. Dazu wurden die jeweiligen Proben der Mehrfachbestimmung aus der Mikrotiterplatte entnommen und entsprechend zusammengeführt. Jeweils 10 µL der Proben wurden dann auf eine frisch-gespaltene Mica für 10 min bei RT inkubiert und anschließend 4x mit 100 µL ddH_2O gewaschen bevor diese mit Hilfe von N_2 vorsichtig getrocknet wurden. Die Proben wurden im intermittierenden Kontaktmodus unter Umgebungsbedingungen mit einem Silizium-Cantilever (OMCL-AC160TS; Olympus, Tokio, Japan) mit einer nominalen Federkonstante von 26 N/m und einem nominalen Spitzenradius von 7 nm gemessen. Die Höhenbilder wurden mit Hilfe des Nanowizard3-Systems (JPK Instruments, Berlin, Deutschland) aufgenommen und anschließend mittels der Datenverarbeitungssoftware des Herstellers (JPK Data 280 Processing Software 5.0.69) prozessiert.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Weitere Ergebnisse zum Einfluss des selektierten Peptides S1VL-21 auf die hSOD1-Aggregation

Das mittels Phagendisplay selektierte Peptid S1VL-21 weist wie im Manuskript 3.2 ausführlich beschrieben eine mikromolare Affinität zur nativen hSOD1 auf und einen Einfluss auf deren Aggregation. Es wurde u.a. gezeigt, dass die Inkubation von hSOD1 mit S1VL-21 zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Bildung an amyloidähnlichen hSOD1-Aggregaten führt. Mit Hilfe von weiteren, den hier nachfolgenden Experimenten wurde der Einfluss des Peptides auf die hSOD1-Aggregation genauer analysiert.

4.2.1.1 Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen weisen auf eine geringere Bildung von großen hSOD1-Aggregaten durch die Zugabe von S1VL-21 während der hSOD1-Aggregation hin

Zur Untersuchung der Morphologie und zur vorsichtigen Beurteilung der Verteilung der nach Aggregation resultierenden hSOD1-Spezies mit und ohne Inkubation des Peptids S1VL-21 wurden Aufnahmen der jeweiligen Proben am Rasterkraftmikroskop durchgeführt (4.1.4). Verglichen wurden dabei Proben von hSOD1 ohne und mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-21, die nach der 65-stündigen Inkubation unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen resultierten. Als Kontrolle wurde die Probe mit S1VL-21 ohne hSOD1 ebenfalls analysiert.

Wie in Abbildung 7 exemplarisch zu erkennen ist, zeigen die Aufnahmen eine unterschiedliche Verteilung und Morphologie der hSOD1-Spezies, die aus der Inkubation mit und ohne S1VL-21 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen resultieren. Während hSOD1 ohne Peptid mehrere große Aggregate mit einer Höhe von etwa 600 nm formt (Abbildung 7, A), deuten die hier vorliegenden Aufnahmen auf die Bildung von deutlich weniger großen hSOD1-Aggregaten bei einer Inkubation mit S1VL-21 während der hSOD1-Aggregation hin (Abbildung 7, B). Anhand der Aufnahmen ist daher zu vermuten, dass die verbleibenden hSOD1-Aggregate nicht nur in der Menge, sondern auch hinsichtlich ihrer Größe verringert sind (Abbildung 7, Vergleich A.II und B.II). Mit Hilfe der Analyse der Kontrollprobe mit S1VL-21 ohne hSOD1 (Abbildung 7, C) konnten seltene Artefakte identifiziert werden. Weitere Analysen der hSOD1-Proben mit verschiedenen Messflächen verdeutlichen die Anhäufung von größeren hSOD1-Aggregaten, wenn hSOD1 nicht mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-21 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen inkubiert wurde (Anhang, Abbildung 12).

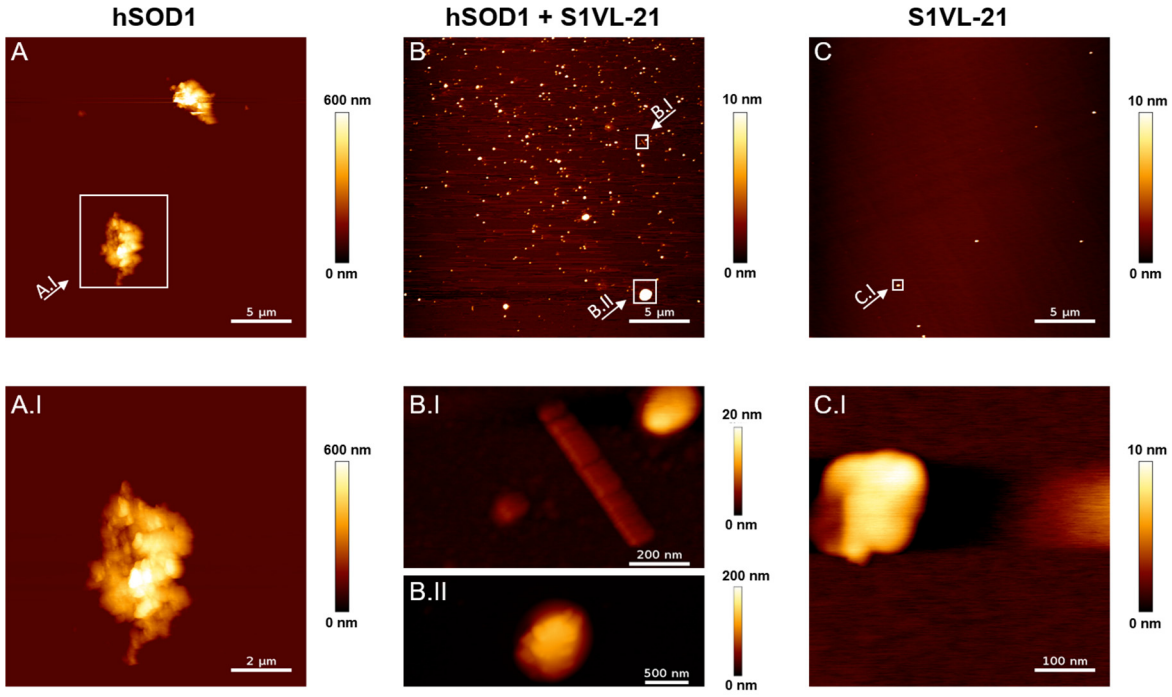


Abbildung 7: Aufnahmen mittels Rasterkraftmikroskopie der resultierenden hSOD1-Spezies nach Aggregation weisen auf eine geringere Bildung von großen hSOD1-Aggregaten bei Inkubation mit S1VL-21. Die Höhenbilder wurden mit einem Nanowizard3-System (JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland) mit 10 µL der Proben aus dem wie in 4.1.3 beschriebenen ThT-Assay nach 65 h der Aggregation durchgeführt. Die Proben wurden auf einer frisch-gespaltenen Mica für 10 min bei RT inkubiert und anschließend 4x mit 100 µL ddH_2O gewaschen bevor diese mit N_2 vorsichtig getrocknet wurden. Die Messungen erfolgten mit einer Auflösung von 512 Pixeln bei einer Zeilenrate von 0,5 bis 2 Hz im intermittierenden Kontaktmodus mit einem Silizium-Cantilever mit einer nominalen Federkonstante von 26 N/m und einem nominalen Spitzenradius von 7 nm. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit Hilfe der Datenverarbeitungssoftware des Herstellers (JPK Data Processing software 5.0.69). **A.** Aufnahmen der hSOD1-Probe ohne S1VL-21 nach 65 h der Aggregation. Zu erkennen sind große hSOD1-Aggregate mit einer Höhe von etwa 600 nm. **B.** Aufnahmen der hSOD1-Probe, bei der hSOD1 mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-21 während der Aggregation inkubiert wurde. Es wurden nur wenige Bereiche gefunden, die einige größere Aggregate enthielten, die jedoch nicht nur in der Menge, sondern auch in ihrer Größe im Vergleich zur hSOD1-Probe ohne Peptid deutlich reduziert waren. **C.** Aufnahmen der Kontrollprobe mit S1VL-21 ohne hSOD1. Es wurden vereinzelt Artefakte gefunden.

4.2.1.2 S1VL-21 reduziert die Bildung von hSOD1-Aggregaten auch bei Zugabe des Peptides zu Beginn der Elongationsphase der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation

Um den Einfluss des selektierten Peptides S1VL-21 auf die hSOD1-Aggregation abhängig vom Zeitpunkt der Peptidzugabe zu analysieren, wurde ein ThT-Assay wie in 4.1.3 beschrieben durchgeführt mit der Ausnahme, dass die Zugabe von S1VL-21 im 10-fachen molaren Überschuss bezogen auf die hSOD1-Mononomer-Konzentration erst nach 20 h, 27,5 h und 44,5 h ab Beginn der Fluoreszenzintensitätsaufzeichnung erfolgte. Als Kontrolle wurde statt des Peptides das gleiche Volumen an ddH_2O zu den hSOD1-Fibrillationsproben hinzugefügt. Um eine Fibrillierung bzw. amyloidähnliche Aggregation des Peptides auszuschließen, wurde die Fluoreszenzintensitätsentwicklung von S1VL-21 mit ThT ohne hSOD1 in der gleichen Konzentration ebenfalls verfolgt. Die ThT-Fluoreszenzintensität wurde auf den höchsten Wert normiert und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 8).

Die initiale Zugabe von S1VL-21 zu hSOD1 kurz vor der Aggregation resultiert in einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Fluoreszenzemission. Mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-21 bezogen auf die hSOD1-Monomer-Konzentration konnte die Fluoreszenzemission bis zu 90% reduziert werden (Manuskript 3.2, S. 33). Ein ähnlicher Effekt des Peptides auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation konnte auch beobachtet werden, wenn S1VL-21 erst nach 20 h ab Beginn der Fluoreszenzintensitätsmessung unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen hinzugefügt wurde (Abbildung 8, A). So war das Peptid in der Lage, die Fluoreszenzintensität um 82% im Vergleich zur hSOD1-Probe ohne S1VL-21 zu reduzieren (Abbildung 8, B). Die Zugabe von S1VL-21 in der Elongationsphase (nach 27,5 h; Abbildung 8, C) als auch in der stationären Phase des sigmoidalen hSOD1-Aggregationsverlaufes (nach 44,5 h; Abbildung 8, D) führte jedoch zu keiner Reduktion der Fluoreszenzemission. Zusammenfassend resultiert sowohl die initiale als auch die Zugabe des Peptides zu Beginn der Elongationsphase der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzemission.

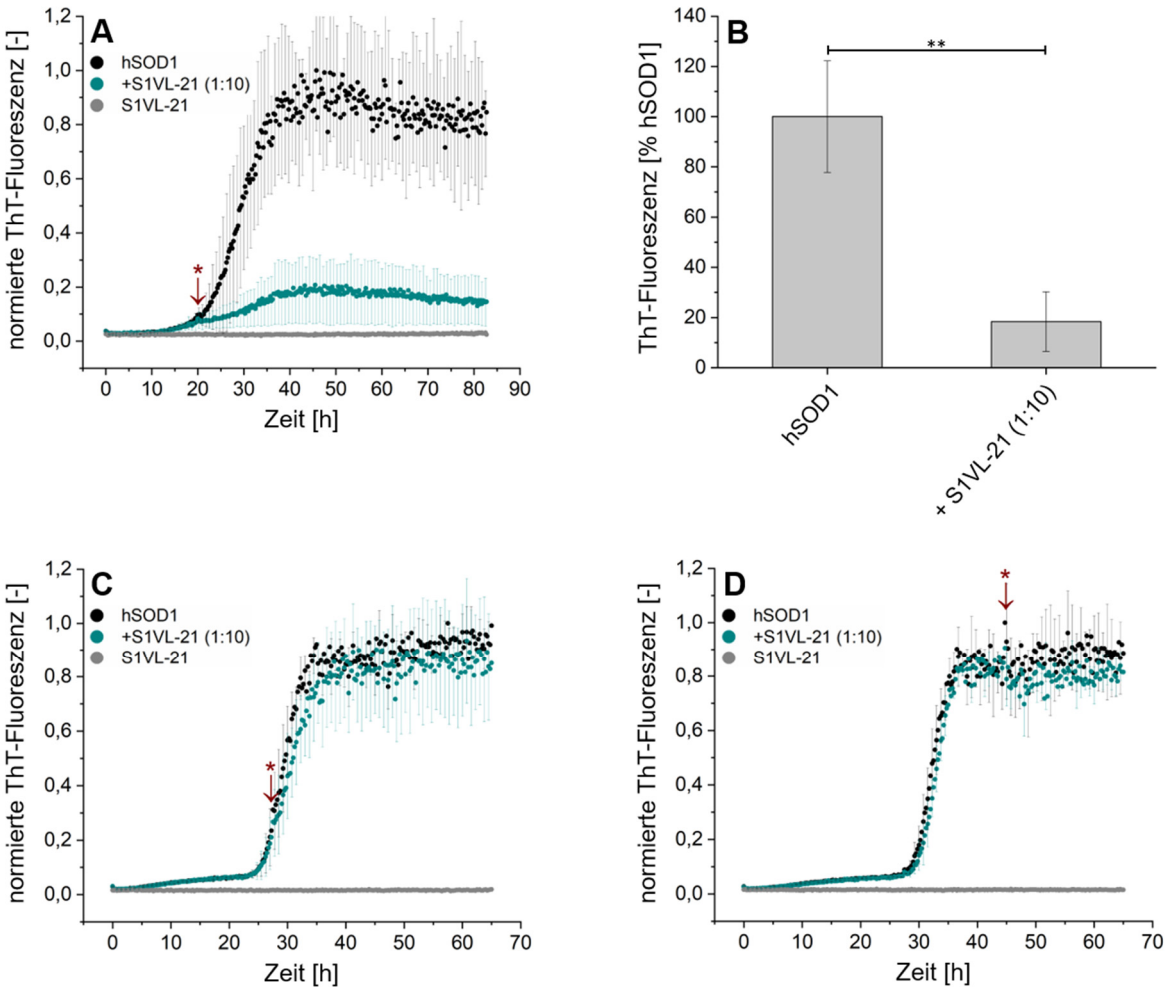


Abbildung 8: ThT-Assays von hSOD1 mit Zugabe von S1VL-21 zu verschiedenen Zeitpunkten der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation verweisen auf eine reduzierte Bildung von hSOD1-Aggregaten auch bei Zugabe des Peptides zu Beginn der Elongationsphase. Die ThT-Assays wurden wie in 4.1.3 beschrieben durchgeführt, um den Einfluss von S1VL-21 bei Zugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation zu untersuchen. Dazu wurde 5 µM dimere hSOD1 in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6 mit 10 mM TCEP, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl und 5 µM ThT für 15 min bei 37 °C inkubiert bevor die Messung der Fluoreszenzintensitätsentwicklung in einer Mikrotiterplatte mit je einer Edelstahlkugel (3,2 mm) gestartet wurde. Die Messungen erfolgten dabei in 3- bzw. 5-fach Bestimmung. Die ThT-Fluoreszenzintensität wurde auf den höchsten Wert normiert und gegen die Zeit aufgetragen. Der rote Stern markiert die Zugabe von S1VL-21 im 10-fachen molaren Überschuss bezogen auf die monomere hSOD1-Konzentration, welche nach 20 h (**A**), 27,5 h (**C**) und 44,5 h (**D**) ab Beginn der Fluoreszenzintensitätsaufzeichnung erfolgte. Verfolgt wurde als Kontrolle neben der hSOD1-Aggregation mit S1VL-21 (cyan) und ohne S1VL-21 (schwarz) auch die Fluoreszenzintensitätsentwicklung von Peptid ohne hSOD1 (grau). In **B** ist der Vergleich der relativen ThT-Fluoreszenzintensitäten der in Abbildung A enthaltenen hSOD1-Probe mit und ohne S1VL-21 nach 46 h, wo das Fluoreszenzsignal für die Probe mit hSOD1 ohne Peptid maximal ist, als Mittelwert ± Standardabweichung (n=3) dargestellt. Eine einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit Fisher-Post-hoc-Test wurde für die statistische Auswertung genutzt (** $p \leq 0.01$). Die Zugabe von S1VL-21 zur hSOD1-Aggregation nach 20 h führte zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität um 82%, während kein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzintensitätsentwicklung bei Zugabe des Peptids nach 27,5 und 44,5 h beobachtet werden konnte.

4.2.2 Ergebnisse weiterer Peptide

Es wurden einige Phagendisplay-Selektionen durchgeführt, um Peptide zu identifizieren, die native hSOD1 binden und die hSOD1-Aggregation inhibieren. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich der Affinität zur hSOD1 und des Einflusses auf die hSOD1-Aggregation der im Rahmen dieser Arbeit selektierten Peptide (Tabelle 1) ist der Tabelle 4 im Anhang zu entnehmen. Nachfolgend werden die Ergebnisse des Peptides S1VL-11, das neben S1VL-21 ebenfalls eine Bindung zu nativer hSOD1 und einen inhibierenden Einfluss auf deren Aggregation aufweist, näher dargestellt.

4.2.2.1 Peptid S1VL-11 weist ebenfalls eine Bindung zur hSOD1 und einen Einfluss auf deren Aggregation auf

Neben S1VL-21 wurde ein weiteres Peptid, S1VL-11 (Abbildung 9, A), mittels Phagendisplay selektiert, welches nativ gefaltete hSOD1 bindet und einen signifikanten Einfluss auf die hSOD1-Aggregation besitzt.

Mit Hilfe von MST-Messungen konnte die Bindungsaffinität von S1VL-11 zur hSOD1 bestimmt werden. Die MST-Messung erfolgte wie in 4.1.2 beschrieben mit konstanter Konzentration an hSOD1, welches zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF633 über primäre Amine gekoppelt wurde, und steigender Peptidkonzentration. Es konnte eine mikromolare Affinität von S1VL-11 zu nativer hSOD1 mit einer Dissoziationskonstante von 34,1 ± 2,5 µM nachgewiesen werden (Abbildung 9, B).

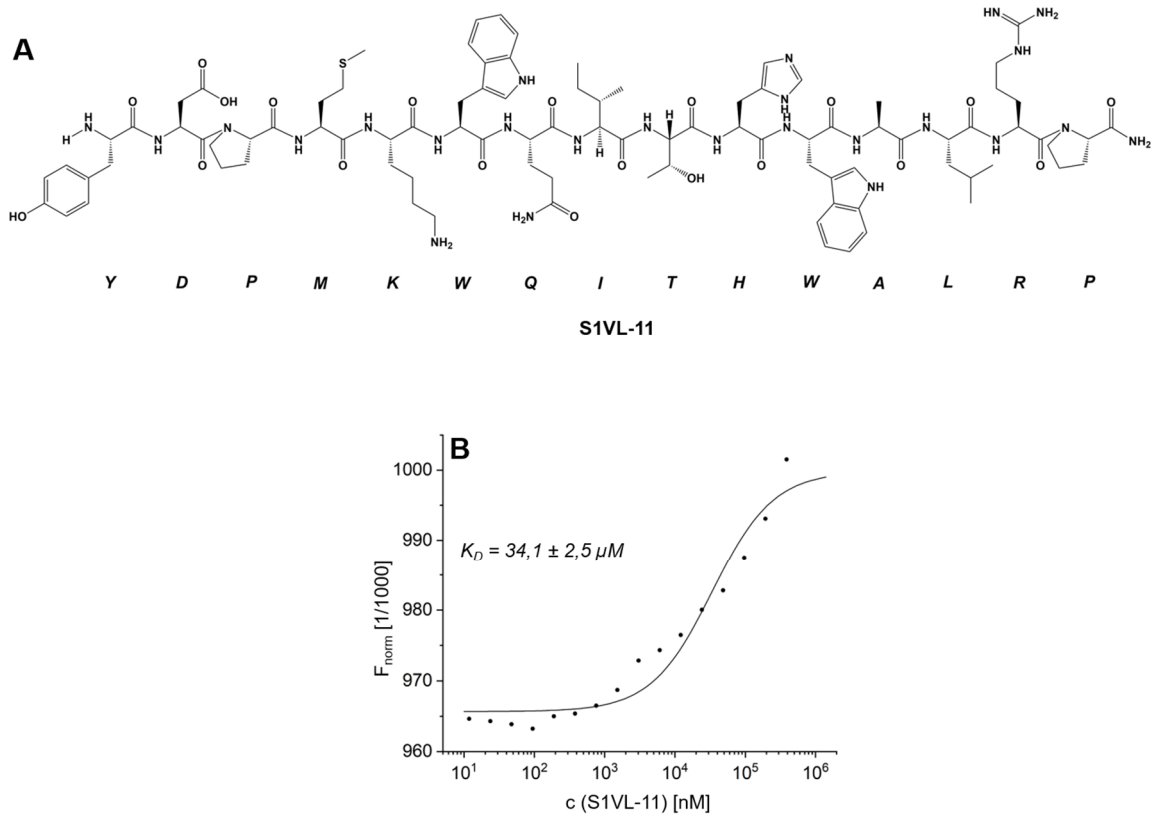


Abbildung 9: Peptid S1VL-11 weist eine mikromolare Bindungsaffinität zu nativer hSOD1 auf. A. Darstellung der Strukturformel des Peptides S1VL-11, welches mit Hilfe von MST-Messungen in Bezug auf die Bindungsaffinität zu nativer hSOD1 analysiert wurde. Der C-Terminus liegt amidiert vor. Die Strukturformel wurde mit Hilfe der Software ChemDraw Professional 16.0 gezeichnet. **B.** MST-Messung der mit CF633-fluoreszenzmarkierten hSOD1 (250 nM) und S1VL-11 mit steigender Konzentration (12 nM - 389 µM) wurde in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6 inklusive 150 mM NaCl und 0,05% Tween-20 bei 25 °C mit einer LED-Leistung von 40% durchgeführt. Änderungen in der Thermophorese, die als Änderungen der normierten Fluoreszenz (Fnorm) wiedergegeben werden, wurden gegen die jeweilige Peptidkonzentration aufgetragen und mit Hilfe der Analysesoftware des Herstellers (NT-analysis software version 1.5.41; Nanotemper technologies; München, Deutschland) bei einer MST-Leistung von 40% unter Berücksichtigung des Thermophorese-Effekts ausgewertet. Die durchgezogene Linie repräsentiert die gefitteten Daten mit einer resultierenden Dissoziationskonstante (K_D) von 34,1 ± 2,5 µM.

Um den Einfluss von S1VL-11 auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation zu analysieren, wurde wie in 4.1.3 beschrieben unter der Verwendung des Peptides S1VL-11 ein ThT-Assay in 3-fach Bestimmung durchgeführt. Um eine Fibrillierung bzw. amyloidähnliche Aggregation des Peptides auszuschließen, wurde die Fluoreszenzintensitätsentwicklung von S1VL-11 mit ThT ohne hSOD1 in der höchsten, getesteten Konzentration ebenfalls verfolgt. Die ThT-Fluoreszenzintensität wurde auf den höchsten Wert normiert und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 10, A).

Die Inkubation von hSOD1 mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-11 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen resultierte in einer Reduktion der maximalen Fluoreszenzemission um 69% (Abbildung 10, B). Darüber hinaus führte die Inkubation von hSOD1 mit S1VL-11 während der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation nicht nur zu einer signifikanten Abnahme der absoluten ThT-Fluoreszenz, sondern auch zu einer

konzentrationsabhängigen Verlängerung der Verzögerungsphase (*lag time*; t_{lag}) (Abbildung 11, B), welche die Zeit der Verzögerung bis zum Beginn der Elongationsphase des sigmoidalen Fluoreszenzemissionsverlaufes beschreibt und in der typischerweise die Bildung von eines oder mehreren Nukleationskeimen erfolgt [174]. Die Bestimmung der t_{lag}-Werte erfolgte dabei anhand der sigmoidalen Anpassung der einzelnen Messungen von hSOD1 und hSOD1 mit Peptid mit Hilfe der Boltzmann-Fitfunktion (4.1.3) wie in Abbildung 11-A beispielhaft für hSOD1 ohne und mit S1VL-11 (1:10) dargestellt. So resultierte die Inkubation von hSOD1 mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-11 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen in einer signifikanten Verschiebung von t_{lag} um +7 h im Vergleich zu hSOD1 ohne Peptid (Abbildung 11, B).

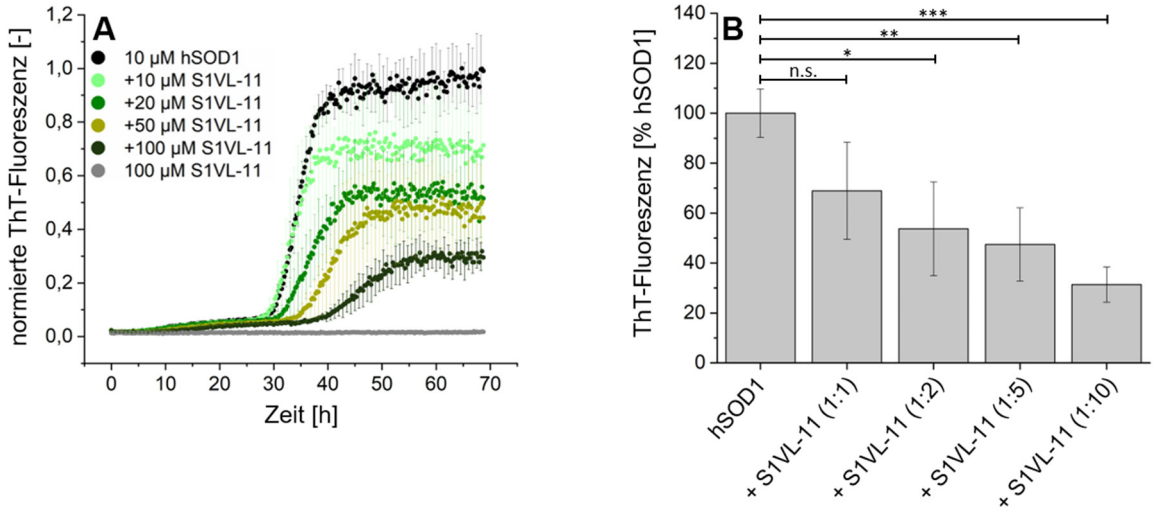


Abbildung 10: S1VL-11 weist einen Einfluss auf die Bildung von amyloidähnlichen hSOD1-Aggregaten auf. A. Es wurde wie in 4.1.3 beschrieben ein ThT-Assay durchgeführt, um den Einfluss von S1VL-11 auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation zu analysieren. Dazu wurde 5 µM dimere hSOD1 (entspricht 10 µM monomerer hSOD1) mit und ohne steigender S1VL-11-Konzentration in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6 inklusive 10 mM TCEP, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl und 5 µM ThT für 15 min bei 37 °C inkubiert bevor die Messung der Fluoreszenzintensitätsentwicklung in einer Mikrotiterplatte mit je einer Edelstahlkugel (3,2 mm) gestartet wurde. Die Messung erfolgte in 3-fach Bestimmung. Die ThT-Fluoreszenzintensität wurde auf den höchsten Wert normiert und gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Die Inkubation von hSOD1 mit S1VL-11 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen führte zur konzentrationsabhängigen Abnahme der ThT-Fluoreszenzemission. **B.** Vergleich der in A dargestellten relativen ThT-Fluoreszenzintensitäten nach 64,5 h, wo das Fluoreszenzsignal für die Probe mit hSOD1 ohne Peptid maximal ist. Eine einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit Fisher-Post-hoc-Test wurde für die statistische Auswertung genutzt (n.s. = nicht signifikant; * $p \leq 0{,}05$; ** $p \leq 0{,}01$; *** $p \leq 0{,}001$). Die Inkubation von hSOD1 mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-11 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen führte zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensität um 69%.

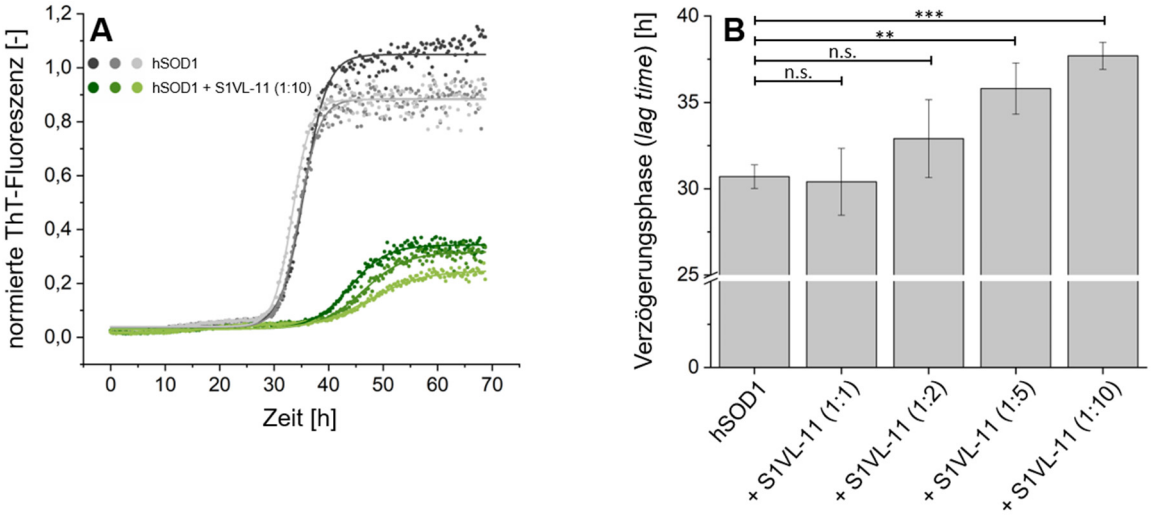


Abbildung 11: Inkubation von hSOD1 mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-11 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen führt zur Verlängerung der Verzögerungsphase (*lag time*, t_{lag}) der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation. A. Beispielhafte Darstellung der einzelnen Messreihen (Punkte) der 3-fach Bestimmung und der sigmoidalen Anpassung (durchgezogene Linie) von hSOD1 (graue Farbreihe) und hSOD1 mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-11 (grüne Farbreihe) des ThT-Assays aus Abbildung 10-A zur Bestimmung von t_{lag} [h]. Die angepassten Werte der Messreihen, sowie die Berechnung von t_{lag} wurden mit Hilfe der Boltzmann-Fitfunktion $y = ((A_1-A_2)/(1+\exp((x-x_0)/dx)))+A_2$ der Software OriginPro 2019 ermittelt mit $t_{lag} = x_0 - 2dx$. **B.** Vergleich der ermittelten t_{lag}-Werte [h] von hSOD1 und hSOD1 mit steigender Konzentration an S1VL-11. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Eine einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit Fisher-Post-hoc-Test wurde für die statistische Auswertung genutzt (n.s. = nicht signifikant; ** $p \leq 0{,}01$; *** $p \leq 0{,}001$). Die Inkubation von hSOD1 mit einem 5-fachen bzw. 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-11 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen führte zu einer signifikanten Verschiebung der Verzögerungsphase (t_{lag}) der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation um +5 h bzw. +7 h im Vergleich zu hSOD1 ohne Peptid.

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Amyotrophe Lateralsklerose ist eine tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankung des motorischen Nervensystems und die Überlebenszeit der Betroffenen beträgt in der Regel lediglich 3 bis 5 Jahre nach Ausbruch der Symptome. Bisher existiert keine Therapie zur vollständigen Heilung von ALS auch bedingt durch die fehlenden Informationen bezüglich der genauen Ursachen und des exakten Pathomechanismus von ALS. Ein gemeinsames Merkmal der familiären und sporadischen ALS ist jedoch die Akkumulation von aberranten Proteinspezies – einschließlich Aggregate der humanen Superoxiddismutase 1 – in den Motoneuronen und im Rückenmark von ALS-Patienten. Es wurde gezeigt, dass die Destabilisierung von hSOD1 durch Mutationen und/oder durch den Verlust einer oder mehrerer posttranslationalen Modifikationen eine Fehlfaltung des Proteins und dessen Aggregation begünstigen [8, 12, 65]. Aus diesem Grund ist die Stabilisierung der nativen Konformation von hSOD1 ein vielversprechender Ansatz zur ALS-Therapie, bei der die Bildung toxischer hSOD1-Spezies reduziert bzw. ganz verhindert werden soll.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Stabilisierung der nativen hSOD1-Konformation durch spezifisch bindende Liganden in der Lage sind, die hSOD1-Aggregation zu stören. Hierfür wurde zunächst die heterologe Expression von hSOD1 in *E. coli* und die *in vitro* Rekonstitution des vollständig prozessierten Holoenzyms etabliert, um anschließend eine Phagendisplay-Selektion zur Identifizierung von hSOD1-bindenden Peptidliganden durchzuführen. Dabei ermöglichte die Einführung von geeigneten Kontrollselektionen und der in der Arbeitsgruppe Mohrlüder entwickelten Software TSAT mit u.a. zwei definierten Scores eine effizientere Beurteilung des Selektionserfolges und eine erleichterte Identifikation von hSOD1-bindenden Peptiden. Ausgewählte Peptide wurden anschließend hinsichtlich ihrer Bindung zur hSOD1 und deren Einfluss auf die Bildung von amyloidähnlichen hSOD1-Aggregaten analysiert.

5.1 Es konnte nativ gefaltete hSOD1 mit hoher enzymatischer Aktivität durch die *in vitro* Rekonstitution gewonnen werden

Die humane SOD1 ist ein 32 kDa schweres Homodimer mit je einem gebundenem Kupfer- und einem Zinkion pro Monomer, welche für die Aktivität und Stabilität des Proteins wichtig sind. Eine intramolekulare Disulfidbrücke in jeder Untereinheit trägt darüber hinaus weiter zur Proteinstabilität bei. Das vollständig prozessierte Holoenzym resultiert so zu einem der thermisch stabilsten bekannten Proteine [65, 84].

Die Herstellung von rekombinant exprimierter hSOD1 ist nicht nur für die Aufklärung des molekularen Pathomechanismus der hSOD1-assoziierten ALS wichtig, sondern auch für die Entwicklung von therapeutischen Strategien zur Bekämpfung der Erkrankung. Für die hier vorliegende Arbeit war die *in vitro* Rekonstitution zum vollständig prozessierten hSOD1-Holoenzym notwendig, um nachfolgend Peptidliganden zu identifizieren, die native hSOD1 binden und die hSOD1-Aggregation stören. Die bislang publizierten *in vitro* Präparationen von in *E. coli* exprimierter hSOD1 führten jedoch häufig zu einer unvollständigen Beladung mit Metallionen insbesondere mit Kupfer. Dabei lagen die bisherigen dokumentierten spezifischen Aktivitäten von heterolog exprimierter hSOD1 bei maximal ~ 6 000 U/mg [180], während die aus Erythrozyten isolierte hSOD1 eine spezifische Aktivität von 23 700 U/mg aufwies [181]. Für die Selektion von Peptidliganden, die native hSOD1 binden, war jedoch die Herstellung des korrekt gefalteten Proteins einschließlich der Metallionenbeladung erforderlich. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Protokoll zur *in vitro* Rekonstitution von in *E. coli* exprimierter hSOD1 etabliert, welches zum nativ gefaltetem Holoenzym mit einer nahezu vollständigen Metallionenbeladung und der bisher höchsten berichteten spezifischen Aktivität für rekombinante hSOD1 führte (Manuskript 3.1) [182].

Zusammengefasst wurde die in *E. coli* heterolog exprimierte und mittels hydrophober Interaktionschromatographie aufgereinigte hSOD1 zunächst mit 6 M Guanidinhydrochlorid denaturiert, um eine vollständige Entfaltung und so eine Homogenität der vorliegenden hSOD1-Spezies zu gewährleisten. Anschließend wurde das Protein mit Hilfe eines 500-fachen molaren Überschusses an DTT reduziert und die Zugabe von EDTA führte zur Komplexierung von möglicher Weise bereits gebundenen Metallionen, die aus der Expression in *E. coli* stammen. Das so denaturierte und reduzierte Apo-hSOD1 wurde anschließend mit Hilfe von Dialysen mit abnehmender Konzentration an Guanidinhydrochlorid und äquimolarer Menge an $ZnSO_4$ bezogen auf die hSOD1-Monomer-Konzentration mit Zink beladen. Die Reduktion der hSOD1 zu Beginn bzw. die Zugabe von reduzierenden Additiven während der Dialysen erfolgte, um die Aufnahme der Metallionen zu erleichtern, da gezeigt wurde, dass die fehlende Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke zu einer Erhöhung der strukturellen Flexibilität des Loops IV (Zink-Loop) führt [74]. Leinartaite *et al.* zeigten, dass das Zink-Ion zunächst die korrekte Faltung des Monomers katalysiert, indem es transient in der Kupfer-Bindestelle koordiniert wird bevor dieses auf die thermodynamisch günstigere Zink-Bindestelle übertragen wird. Die Bindung von Zink führt wiederum zur korrekten Ausrichtung der funktionellen Loops, wodurch die Kupfer-Koordination ermöglicht wird [86, 183]. Daraus resultiert, dass der Einbau von Zink nicht nur zur einer erhöhten Stabilität des Intermediats führt, sondern auch dass die nachfolgende Bindung des Kupferions und die

Reifung des Holoenzyms erleichtert wird [77, 86]. Die Beladung mit Kupfer erfolgte dabei während der hier beschriebenen Rekonstitution mit $Cu(II)Cl_2$ im zweifachen molaren Überschuss bezogen auf die hSOD1-Monomer-Konzentration bei 37 °C abhängig von der eingesetzten Proteinmenge für mindestens 7 Tage. Bereits Goto *et al.* zeigten, dass die sequentielle Zugabe von Zink gefolgt von Kupfer nach Entfernung von bereits gebundenen Metallionen in eine voll-beladene SOD1 mit hoher enzymatischer Aktivität resultieren kann [184]. Anhand vorheriger Versuche im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit (Ergebnisse hier nicht gezeigt) stellte sich heraus, dass die Beladungseffizienz je nach Proteinmenge von der Beladungszeit und -temperatur abhängt. Je länger die Beladung bei 37 °C mit Kupfer stattgefunden hat, desto höher war die Beladungseffizienz. Während der Beladung mit Kupfer wurde kein weiteres DTT hinzugefügt, um die Ausbildung der Disulfidbrücke zu ermöglichen. Die Disulfidbrücke verbindet dabei den Loop IV mit dem zentralen β-Sandwich. Darüber hinaus sind einige Aminosäurereste (Aminosäureposition 50-54) des Loops IV Teil der Dimergrenzfläche, sodass die Metallionenkoordination nicht nur zur korrekten Ausrichtung des Loops führt, sondern folglich auch die Ausbildung der Disulfidbrücke und die Dimerisierung maßgeblich beeinflusst [74].

Entscheidend für die Isolierung des nativen Holoenzyms mit nahezu vollständiger Beladung waren somit insbesondere der Oxidationszustand, sowie die Inkubationszeit und -temperatur während der Rekonstitution von hSOD1. Nach Aufreinigung des Rekonstitutionsansatzes mit Hilfe der Größenauschlusschromatographie für eine konformationell homogenere Probe und zur Entfernung von nicht-gebundenen Metallionen, konnte so dimere hSOD1 isoliert werden, welche nicht nur eine hohe thermische Stabilität, sondern auch die bisher höchste berichtete, spezifische Aktivität für rekombinant exprimierte hSOD1 aufwies. Die isolierte hSOD1 wies eine Beladung von durchschnittlich 0,7 Äquivalenten gebundenem Kupfer- und Zinkion pro Monomer und eine Schmelztemperatur von bis zu 86 °C auf. Es konnte eine auf den Kupferanteil normierte, durchschnittliche spezifische Aktivität von 20 900 U/mg erzielt werden. Zudem wurde nachgewiesen, dass die so hergestellte hSOD1 auch nach mehreren Wochen Lagerung bei 4 °C stabil als Dimer vorlag [182].

Zusammenfassend konnte mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Rekonstitutionsprotokolls ein Verfahren etabliert werden, welches die Herstellung von nativ gefalteter, in *E. coli* exprimierter hSOD1 ermöglicht.

5.2 Es wurden hSOD1-bindende Peptidliganden, die einen Einfluss auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation besitzen, identifiziert

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Peptidliganden, die die native hSOD1 binden und stabilisieren, sodass deren Aggregation im besten Fall vollständig inhibiert oder zumindest reduziert wird. Dabei stellt die Stabilisierung der nativen Konformation von hSOD1 einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie aller hSOD1-assoziierten ALS-Formen dar, da auch die Fehlfaltung von wildtypischer hSOD1 in einigen ALS-Fällen ohne vorliegende hSOD1-Mutation zu toxischen, in der ALS-Pathogenese involvierten hSOD1-Spezies führt, sodass der Fokus auf einzelne hSOD1-Mutationen als Ziel von ALS-Therapieansätzen nicht ausreicht, um das Fortschreiten der Krankheit vollständig aufzuhalten [111, 185]. Die identifizierten Peptidliganden sollen dabei nicht nur wildtypische hSOD1, sondern bestenfalls auch die nicht-pathologische Konformation der hSOD1-Varianten stabilisieren und so die Progression der Erkrankung trotz vorliegender hSOD1-Mutation mindestens verzögern, wenn nicht sogar ganz verhindern.

Mittels Phagendisplay konnten potentielle hSOD1-Peptidliganden selektiert werden. Die Einführung von Kontrollselektionen, aber auch die NGS-Analyse der resultierenden Proben nach der Selektion erleichterten dabei erheblich die Identifizierung von hSOD1-bindenden L-Peptiden. So konnten in der Regel hunderttausende Peptide sequenziert werden, die aus einer einzelnen Selektion resultierten. Die Durchführung von verschiedenen Selektionen mit veränderten Selektionsbedingungen (Anhang, Tabelle 2) erhöhte zudem die Wahrscheinlichkeit, potentielle Peptidliganden zu finden, die native hSOD1 stabilisieren. Dabei wurden die nach der NGS-Analyse resultierenden Peptidsequenzen im Hinblick auf deren Anreicherung nach Selektionsende und im Vergleich zu den Kontrollselektionen mit Hilfe der in der Arbeitsgruppe Mohrlüder entwickelten Software TSAT [155] mittels speziellen Filtereinstellungen prozessiert und analysiert. Zwei definierte Parameter – *Empty Score* und *Enrichment Factor* – dienten zudem zur numerischen Bewertung der Anreicherungsstärke der Peptide im Vergleich zu Beginn der Selektion und im Vergleich zur Kontrollselektion ohne hSOD1 (Anhang, Tabelle 3).

So wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 27 Peptide ausgewählt, die anschließend hinsichtlich ihrer Bindung zur nativen hSOD1 und deren Einfluss auf die hSOD1-Aggregation analysiert wurden (Anhang, Tabelle 4). Hierfür wurden MST-Messungen zur Bestimmung der Bindungsaffinität und ThT-Assays zur Analyse des amyloidähnlichen Aggregationsverhaltens von hSOD1 mit und ohne Peptid durchgeführt (Anhang, Tabelle 4). Zusammenfassend wiesen 14 der hier 27 untersuchten Peptide einen K_D-Wert

im mikromolaren Bereich auf (Anhang, Tabelle 4; S1VL-2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -16, -20, -21, -23, -26). Von diesen 14 Peptiden zeigten 8 Peptide in den ersten Screeninganalysen einen signifikanten Einfluss auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation (S1VL-3, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -21). Alle 8 Peptide verringerten die ThT-Gesamtfluoreszenz, während 5 dieser Peptide zusätzlich eine Verzögerung der *lag time* (t_{lag}) bewirkten (S1VL-9, -11, -12, -13, -21). Bei zwei weiteren Peptiden wurde dahingegen ein beschleunigtes ThT-aktives Aggregationsverhalten beobachtet, auch wenn unter den gegebenen Bedingungen keine Bindung zu nativer hSOD1 in den MST-Messungen nachgewiesen wurde (S1VL-4 und S1VL-15). In den nachfolgenden Analysen wurden anschließend jene Peptide näher untersucht, die in den ersten Screeninganalysen einen signifikanten Einfluss im Hinblick auf eine um mindestens 50% reduzierte und gleichzeitig verzögerte Bildung von amyloidähnlichen hSOD1-Aggregaten aufwiesen (S1VL-11, S1VL-13 und S1VL-21).

5.2.1 Insbesondere die Peptide S1VL-11 und S1VL-21 können die Bildung von toxischen hSOD1-Aggregaten konzentrationsabhängig reduzieren

Insbesondere die Peptide S1VL-11, S1VL-13 und S1VL-21 zeigten in den ersten Screeninganalysen mittels ThT-Assays im zweifachen molaren Überschuss bezogen auf die hSOD1-Monomer-Konzentration einen signifikanten Einfluss auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation (Anhang, Tabelle 4). So wurde die ThT-Fluoreszenzemission nicht nur um mehr als 63% reduziert, sondern auch die *lag time* wurde um mindestens 2,9 h verlängert.

In anschließenden Analysen wurde der konzentrationsabhängige Einfluss der Peptide auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Zugabe von S1VL-13 mit einem 10-fachen molaren Überschuss zur amyloidähnlichen Aggregation von hSOD1 in einen Anstieg der ThT-Fluoreszenzemission um 113% und in einer beschleunigten *lag time* um 7,4 h im Vergleich zu hSOD1 ohne Peptid resultierte (unveröffentlichte Daten), sodass S1VL-13 hier nicht näher untersucht wurde.

Dahingegen resultierte sowohl die Zugabe von S1VL-11 (Abbildung 10) als auch die von S1VL-21 (Manuskript 3.2) in einer konzentrationsabhängigen Abnahme der ThT-Fluoreszenzemission. So führte beispielsweise die Inkubation von hSOD1 mit äquimolarer Menge an S1VL-11 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen zu einer reduzierten, relativen ThT-Fluoreszenzemission von 69 ± 19%, während die Zugabe eines 10-fachen molaren Überschusses an S1VL-11 die relative ThT-Fluoreszenzemission auf insgesamt 31 ± 7% verringerte (Abbildung 10). Auch mit S1VL-21 konnte ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation

beobachtet werden. Dabei führte die Inkubation von hSOD1 mit äquimolarer Menge an S1VL-21 zu einer relativen ThT-Fluoreszenzemission von 45 ± 3%, während die Zugabe eines 10-fachen molaren Überschusses an S1VL-21 diese um 90% auf 10 ± 2% im Vergleich zu hSOD1 ohne Peptid reduzierte (Manuskript 3.2). Da die Signalintensität bei konstanter ThT-Konzentration proportional zur Konzentration an amyloiden Strukturen ist [170, 172], resultiert die Inkubation von hSOD1 mit S1VL-11 bzw. S1VL-21 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen somit in einer konzentrationsabhängigen, reduzierten Bildung von amyloidähnlichen hSOD1-Aggregaten.

Darüber hinaus konnte durch die Zugabe von S1VL-11 zur amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation auch die *lag time* konzentrationsabhängig bis zu 7 h mit einem 10-fachen molaren Überschuss an Peptid verlängert werden (Abbildung 11), während jedoch für S1VL-21 die aus den ersten Screeninganalysen resultierende *lag time*-Verschiebung von 2,9 h (Anhang, Tabelle 4) nicht reproduziert werden konnte (Manuskript 3.2). Die nicht-reproduzierbaren Daten bzw. die teils hohe Variation in der Kinetik der SOD1-Aggregation wurde bereits in der Literatur thematisiert [186]. Es wurde gezeigt, dass die Auswahl der Bedingungen für die Analyse der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation mittels ThT, insbesondere die Auswahl der Beads, die für die Fragmentation der Probe nötig sind, einen erheblichen Einfluss auf die Homogenität der Messdaten besitzt [187] und dass auch bereits geringe Unterschiede im pH-Wert der verwendeten Pufferlösung die Morphologie der resultierenden SOD1-Spezies beeinflussen [188]. Ob jedoch die Inhomogenität das alleinige Resultat von experimentellen Artefakten oder auch der intrinsischen Eigenschaften der SOD1-Aggregation selbst ist, ist bislang noch ungeklärt. In einigen *in vitro*-Studien konnte bereits der Einfluss bestimmter Bedingungen wie Temperatur, Molekülkonzentration und der Einfluss von Verunreinigungen auf die SOD1-Aggregation analysiert werden, auch wenn diese lediglich eine Erklärung für geringe Variationen - wie hier vorliegend - lieferten [186]. Nichtsdestotrotz konnte die signifikante Reduktion der ThT-Fluoreszenzemission der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation durch das im Rahmen dieser Arbeit selektierte Peptid S1VL-21 in mehreren, unabhängigen Versuchen reproduziert werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass S1VL-21 auch die Fluoreszenzemission bei Zugabe des Peptides zu Beginn der Elongationsphase signifikant reduziert (um 82%; Abbildung 8, B).

In der Regel kann die Bildung von amyloidähnlichen Aggregaten anhand der Fluoreszenzemission von ThT *in vitro* als Funktion der Zeit verfolgt werden, wobei die Funktion einen charakteristischen, wie hier vorliegend, sigmoidalen Verlauf aufweist und sich in Lag-Phase, exponentieller Elongationsphase und einer abschließenden Plateau-Phase unterteilt [170, 171]. Jedoch ist es mit Hilfe des ThT-Assays allein nicht möglich, die Morphologie der gebildeten amyloiden Spezies zu bestimmen und die molekularen

Prozesse bzw. deren Anteil zu identifizieren, die an der Amyloidassemblierung beteiligt sind [175]. Zudem ist der genaue Mechanismus der SOD1-Aggregation bislang nicht eindeutig geklärt, auch wenn Chattopadhyay *et al*. bereits nachweisen konnten, dass bereits kleine Mengen an metallfreier und reduzierter, monomerer SOD1 die Bildung von amyloiden Spezies aus Disulfidbrücken-intakten SOD1 initiieren können und dass die Elongation durch Rekrutierung von Apo- oder partiell metallbeladener, dimerer SOD1 mit intramolekularer Disulfidbrücke vorangetrieben wird [189]. Aus diesem Grund kann mit Hilfe des hier durchgeführten ThT-Assays nur die Vermutung aufgestellt werden, dass die Peptide S1VL-11 und S1VL-21 in einigen Fällen die Keimbildung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation verzögert (charakterisiert durch die Verschiebung von t_{lag}) und/oder lösliche, (partiell) nativ-gefaltete hSOD1-Moleküle insoweit stabilisieren, dass diese nicht zur Elongation von bereits bestehenden amyloiden Spezies zur Verfügung stehen, wodurch die verminderte ThT-Fluoreszenzemission auch bei Zugabe von S1VL-21 zu Beginn der Elongationsphase erklärt werden kann. Dahingegen führte die Zugabe von S1VL-21 während der Elongationsphase und am Ende der sigmoidalen Reaktionskinetik in der Plateau-Phase der amyloidähnlichen hSOD1-Aggregation nicht zur reduzierten ThT-Fluoreszenzemission (Abbildung 8, C & D), was unter anderem damit begründet werden kann, dass S1VL-21 gegen native und beispielsweise nicht gegen wie in der Plateau-Phase vermehrt vorliegende aggregierte hSOD1 selektiert wurde und so grundsätzlich keine Interaktion mit nicht-löslichen hSOD1-Molekülen vorliegen sollte. Anzumerken ist jedoch, dass mittels des ThT-Assays lediglich die Bildung an ThT-aktiven Spezies und nicht an beispielsweise amorphen hSOD1-Aggregaten verfolgt werden kann [170].

Erste Hinweise, dass S1VL-21 tatsächlich zur reduzierten Bildung von großen hSOD1-Aggregaten führt und die verminderte ThT-Fluoreszenzemission beispielsweise nicht aus der Konkurrenz um die ThT-Bindestelle resultiert, liefern die Aufnahmen der aus der Aggregation resultierenden hSOD1-Spezies mit und ohne S1VL-21 am Rasterkraftmikroskop (Abbildung 7). Auch wenn die hier vorliegenden Ergebnisse keine statistisch-ausgewertete Aussage über die Verteilung der hSOD1-Aggregate zulassen, so konnte anhand der zahlreichen Aufnahmen von mehreren Messflächen (Anhang, Abbildung 12) der Eindruck gewonnen werden, dass die Co-Inkubation von hSOD1 mit S1VL-21 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen nicht nur die Menge an amyloidähnlichen hSOD1-Aggregaten, sondern auch die Größe der verbleibenden hSOD1-Spezies reduziert. Darüber hinaus zeigten jene hSOD1-Spezies, die aus der Inkubation mit S1VL-21 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen resultierten, eine geringere Toxizität in Zellkulturexperimenten (Manuskript 3.2). Demnach kann geschlussfolgert werden, dass das Peptid S1VL-21 in der Lage ist, auch die Bildung von

toxischen hSOD1-Spezies zu reduzieren, wenn auch dies u.U. mit der Gesamtmenge an gebildeten hSOD1-Aggregaten korreliert. Eine Reduktion der Toxizität von bereits bestehenden hSOD1-Aggregaten durch die Zugabe von S1VL-21 konnte mit Hilfe von ersten Zellkulturexperimenten nicht nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten), was vermutlich aus der zuvor beschriebenen Spezifität gegen native hSOD1 resultiert. Dass jedoch der Effekt von S1VL-21 auf die hSOD1-Aggregation sequenzspezifisch ist, liefern die Experimente mit den randomisierten Kontrollpeptiden S1VL-21_Rdm1, S1VL-21_Rdm2 und S1VL-21_Rdm3. Diese zeigten im Vergleich zu S1VL-21 eine weniger affine Bindung zu nativer hSOD1 und einen deutlich geringeren bis keinen Effekt in der Reduktion von amyloidähnlichen hSOD1-Aggregaten (Manuskript 3.2).

Zusammenfassend konnten im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit hSOD1-bindende Peptide selektiert werden, die einen inhibitorischen Einfluss auf die amyloidähnliche Aggregation von hSOD1 besitzen. Insbesondere die hier ausführlicher untersuchten Peptide S1VL-21 sowie S1VL-11 führten zur signifikanten Reduktion der Bildung von toxischen hSOD1-Aggregaten, auch wenn der Einfluss der Peptide mit weiteren Versuchen hinsichtlich des Bindungsmotives und des Wirkmechanismus genauer analysiert werden muss. Die hier vorliegende Arbeit liefert somit erste wichtige Daten zu potentiellen Leitsubstanzen für die Entwicklung von hSOD1-assoziierten Therapeutika zur ALS-Therapie.

6 Ausblick

Es wurden Aggregate bestehend aus fehlgefalteter, wildtypischer hSOD1 nicht nur bei sALS-, sondern auch bei fALS-Patienten mit keiner vorliegenden hSOD1-Mutation gefunden [114, 120]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch die Aggregation von WT-SOD1 durch fehlgefaltete, mutierte SOD1 initiiert werden kann [189], sodass die Stabilisierung der nativen Konformation von hSOD1 durch Peptidliganden einen vielsprechenden Ansatz zur Entwicklung von Therapiemöglichkeiten aller hSOD1-assoziiierten ALS-Formen darstellt mit dem Ziel, die Bildung von toxischen hSOD1-Spezies zu inhibieren bzw. zumindest reduzieren.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten Peptide identifiziert werden, die native hSOD1 binden und einen Einfluss auf die hSOD1-Aggregation besitzen. Insbesondere für das hier näher untersuchte Peptid S1VL-21 konnte gezeigt werden, dass dieses die Bildung von amyloidähnlichen hSOD1-Aggregaten *in vitro* reduziert. Jedoch sind nicht nur strukturelle Untersuchungen zum Verständnis der Interaktion zwischen hSOD1 und S1VL-21 nötig, sondern auch weitere Analysen hinsichtlich dessen Einfluss auf die hSOD1-Aggregation, um den Wirkmechanismus zu verstehen und optimieren zu können. Auch wenn der ThT-Assay eine zeitabhängige Verfolgung der Bildung von bestimmten amyloiden Spezies *in vitro* erlaubt, ist beispielsweise der Nachweis der in der Verzögerungsphase (*lag time*) gebildeten Nukleationskeime oder von Oligomeren, die keine *Cross*-β-Struktur aufweisen, ohne Weiteres nicht möglich [170, 190]. Aus diesem Grund sind weitere Analysen mittels biochemischer und/oder biophysikalischer Methoden wie z.B. die dynamische Lichtstreuung (DLS) nötig, um auch so den Einfluss des Peptides auf frühe Intermediate der hSOD1-Aggregation und auf nicht ThT-aktive Spezies zu untersuchen. Mit Hilfe von ersten rasterkraftmikroskopischen Analysen der resultierenden hSOD1-Spezies mit und ohne Inkubation von S1VL-21 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen konnte zwar bereits die Hypothese aufgestellt werden, dass das Peptid nicht die ThT-Bindung verhindert, sondern dass die geminderte ThT-Fluoreszenzemission das Resultat der geringeren Bildung von amyloidähnlichen hSOD1-Aggregaten ist. Um jedoch auch eine quantitative Aussage über die Bildung von amyloidähnlichen hSOD1-Spezies treffen zu können, müssen weitere Analysen hinsichtlich der Verteilung der verbliebenen hSOD1-Aggregate durchgeführt werden. Ferner muss die Frage geklärt werden, ob S1VL-21 in der Lage ist, bestehende hSOD1-Aggregate wieder in nicht-toxische Komponenten aufzulösen. Hierfür können weitere Zellkulturanalysen durchgeführt werden, mit denen der Einfluss von S1VL-21 auf bestehende hSOD1-Aggregate und deren Toxizität in der Zelle untersucht wird. Ob hierbei eine ergänzende Zugabe von Kupfer- und Zinkionen für die Disassemblierung von hSOD1-Aggregaten

vorteilhaft ist, sollte ebenfalls überprüft werden. Zu prüfen ist auch der Einfluss von S1VL-21 auf die hSOD1-Aggregation, die durch Nukleationskeime induziert wird (*seeding assay*). Zusätzlich muss untersucht werden, ob S1VL-21 die katalytische Aktivität von hSOD1 unerwünscht beeinflusst.

Des Weiteren wird eine Optimierung von S1VL-21 nicht nur im Hinblick der therapeutischen Wirksamkeit, sondern auch hinsichtlich der oralen Bioverfügbarkeit des Peptides angestrebt. So sollte die benötigte Konzentration an Peptid, die mindestens eine ähnlich hohe Wirksamkeit in der Inhibierung der hSOD1-Aggregation wie S1VL-21 erzielt, reduziert werden, um auch so mögliche Nebenwirkungen zu minimieren. Beispielsweise könnten hierfür Tandempeptide bestehend aus z.B. zwei S1VL-21-Peptiden oder aus einer Kombination von S1VL-21 und S1VL-11, welches ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation besaß, eingesetzt werden. Hierbei ist auch der Einsatz von geeigneten Linkern denkbar. Zu diesem Zweck ist eine nähere Analyse auch von S1VL-11, sowie der Tandempeptide bezüglich der zuvor beschriebenen Fragestellungen erforderlich. Um die orale Bioverfügbarkeit der Peptide zu steigern, können zukünftig die hier identifizierten und gegebenenfalls bereits optimierten Peptide in retro-inverser Konformation bestehend aus D-enantiomeren Aminosäuren untersucht werden. Diese sollen analog zu den L-Leitpeptiden hinsichtlich ihrer Wirksamkeit in der Inhibierung der Bildung von toxischen hSOD1-Spezies analysiert werden.

Zusammenfassend müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um den Wirkmechanismus der hier identifizierten Peptide zu verstehen und in Bezug auf ihre therapeutische Effizienz zu optimieren. Ungeachtet dessen liefert die hier vorliegende Arbeit erste wichtige Daten zu potentiellen Leitsubstanzen für die Entwicklung von hSOD1-assoziierten Wirkstoffen für die ALS-Therapie.

Literaturverzeichnis

1. Cleveland, D.W. and J.D. Rothstein, *From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS.* Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(11): p. 806-19.
2. Rowland, L.P. and N.A. Shneider, *Amyotrophic lateral sclerosis.* N Engl J Med, 2001. **344**(22): p. 1688-700.
3. Charcot, J.-M. and A. Joffroy, *Deux cas d'atrophie musculaire progressive : avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière*. 1869, Paris: Masson.
4. Chio, A., et al., *Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature.* Neuroepidemiology, 2013. **41**(2): p. 118-30.
5. Logroscino, G., et al., *Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010. **81**(4): p. 385-90.
6. Grad, L.I., et al., *Clinical spectrum of amyotrophic lateral sclerosis (ALS).* Cold Spring Harb Perspect Med, 2017. **7**(8).
7. Mehta, P.R., et al., *Younger age of onset in familial amyotrophic lateral sclerosis is a result of pathogenic gene variants, rather than ascertainment bias.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2019. **90**(3): p. 268-271.
8. Wijesekera, L.C. and P.N. Leigh, *Amyotrophic lateral sclerosis.* Orphanet J Rare Dis, 2009. **4**: p. 3.
9. Pasinelli, P. and R.H. Brown, *Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: Insights from genetics.* Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(9): p. 710-23.
10. van Zundert, B. and R.H. Brown, Jr., *Silencing strategies for therapy of SOD1-mediated ALS.* Neurosci Lett, 2017. **636**: p. 32-39.
11. Chio, A., et al., *Prognostic factors in ALS: A critical review.* Amyotroph Lateral Scler, 2009. **10**(5-6): p. 310-23.
12. Mejzini, R., et al., *ALS genetics, mechanisms, and therapeutics: Where are we now?* Front Neurosci, 2019. **13**: p. 1310.
13. Petrov, D., et al., *ALS clinical trials review: 20 years of failure. Are we any closer to registering a new treatment?* Front Aging Neurosci, 2017. **9**: p. 68.
14. Cetin, H., et al., *Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis and effect of riluzole on disease course.* Neuroepidemiology, 2015. **44**(1): p. 6-15.
15. Bensimon, G., et al., *A controlled trial of Riluzole in amyotrophic lateral sclerosis.* New England Journal of Medicine, 1994. **330**(9): p. 585-591.
16. Bellingham, M.C., *A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade?* CNS Neurosci Ther, 2011. **17**(1): p. 4-31.
17. De Carvalho, M., et al., *A randomized, placebo-controlled trial of memantine for functional disability in amyotrophic lateral sclerosis.* Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2010. **11**(5): p. 456-460.
18. Tabrizchi, R., *Edaravone Mitsubishi-Tokyo.* Curr Opin Investig Drugs, 2000. **1**(3): p. 347-54.
19. Abe, K., et al., *Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients.* Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener, 2014. **15**(7-8): p. 610-7.
20. Sawada, H., *Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis.* Expert Opin Pharmacother, 2017. **18**(7): p. 735-738.
21. Alsultan, A.A., et al., *The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights.* Degener Neurol Neuromuscul Dis, 2016. **6**: p. 49-64.
22. Boylan, K., *Familial amyotrophic lateral sclerosis.* Neurol Clin, 2015. **33**(4): p. 807-30.

23. Zou, Z.Y., et al., *Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2017. **88**(7): p. 540-549.
24. Al-Chalabi, A., et al., *An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010. **81**(12): p. 1324-6.
25. Zhang, X., et al., *In vivo stress granule misprocessing evidenced in a FUS knock-in ALS mouse model.* Brain, 2020. **143**(5): p. 1350-1367.
26. Colombrita, C., et al., *TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult.* Journal of Neurochemistry, 2009. **111**(4): p. 1051-1061.
27. Chen, C., et al., *Fused in sarcoma: Properties, self-assembly and correlation with neurodegenerative diseases.* Molecules, 2019. **24**(8).
28. Protter, D.S.W. and R. Parker, *Principles and properties of stress granules.* Trends Cell Biol, 2016. **26**(9): p. 668-679.
29. Baradaran-Heravi, Y., C. Van Broeckhoven, and J. van der Zee, *Stress granule mediated protein aggregation and underlying gene defects in the FTD-ALS spectrum.* Neurobiol Dis, 2020. **134**: p. 104639.
30. Bosco, D.A., et al., *Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules.* Human Molecular Genetics, 2010. **19**(21): p. 4160-4175.
31. Wolozin, B. and P. Ivanov, *Stress granules and neurodegeneration.* Nat Rev Neurosci, 2019. **20**(11): p. 649-666.
32. Liu-Yesucevitz, L., et al., *Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: Analysis of cultured cells and pathological brain tissue.* Plos One, 2010. **5**(10).
33. Vance, C., et al., *Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6.* Science, 2009. **323**(5918): p. 1208-1211.
34. Ramesh, N. and U.B. Pandey, *Autophagy dysregulation in ALS: When protein aggregates get out of hand.* Frontiers in Molecular Neuroscience, 2017. **10**.
35. Kelekar, A., *Autophagy.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1066**(1): p. 259-271.
36. Finley, D., *Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome.* Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 477-513.
37. Sasaki, S., *Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.* J Neuropathol Exp Neurol, 2011. **70**(5): p. 349-59.
38. Neumann, M., et al., *Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.* Science, 2006. **314**(5796): p. 130-3.
39. De Vos, K.J., et al., *Role of axonal transport in neurodegenerative diseases.* Annual Review of Neuroscience, 2008. **31**: p. 151-173.
40. Hollenbeck, P.J. and W.M. Saxton, *The axonal transport of mitochondria.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 23): p. 5411-9.
41. Perlson, E., et al., *Retrograde axonal transport: Pathways to cell death?* Trends Neurosci, 2010. **33**(7): p. 335-44.
42. Millecamps, S. and J.P. Julien, *Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases.* Nature Reviews Neuroscience, 2013. **14**(3): p. 161-176.
43. Sasaki, S. and M. Iwata, *Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis.* Neuroscience Letters, 1996. **204**(1-2): p. 53-56.
44. Williamson, T.L. and D.W. Cleveland, *Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons.* Nature Neuroscience, 1999. **2**(1): p. 50-56.
45. Rao, M.V. and R.A. Nixon, *Defective neurofilament transport in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis: A review.* Neurochemical Research, 2003. **28**(7): p. 1041-1047.
46. Shaw, P.J., et al., *Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord.* Ann Neurol, 1995. **38**(4): p. 691-5.

47. Ferrante, R.J., et al., *Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis.* J Neurochem, 1997. **69**(5): p. 2064-74.
48. Shibata, N., et al., *Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients.* Brain Research, 2001. **917**(1): p. 97-104.
49. Carri, M.T., N. D'Ambrosi, and M. Cozzolino, *Pathways to mitochondrial dysfunction in ALS pathogenesis.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017. **483**(4): p. 1187-1193.
50. Wiedemann, F.R., et al., *Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis.* J Neurol Sci, 1998. **156**(1): p. 65-72.
51. Vielhaber, S., et al., *Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.* Brain, 2000. **123 (Pt 7)**: p. 1339-48.
52. Wiedemann, F.R., et al., *Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients.* J Neurochem, 2002. **80**(4): p. 616-25.
53. Van Damme, P., et al., *Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis.* Neurodegener Dis, 2005. **2**(3-4): p. 147-59.
54. Kwak, S., et al., *AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS.* Neuropathology, 2010. **30**(2): p. 182-8.
55. Rothstein, J.D., et al., *Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis.* Ann Neurol, 1990. **28**(1): p. 18-25.
56. Shaw, P.J., et al., *CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: Elevation of CSF glutamate in a subset of patients.* Neurodegeneration, 1995. **4**(2): p. 209-16.
57. Liddelow, S.A., et al., *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia.* Nature, 2017. **541**(7638): p. 481-487.
58. Sekizawa, T., et al., *Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases.* J Neurol Sci, 1998. **154**(2): p. 194-9.
59. Henkel, J.S., et al., *Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue.* Ann Neurol, 2004. **55**(2): p. 221-35.
60. Turner, M.R., et al., *Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study.* Neurobiol Dis, 2004. **15**(3): p. 601-9.
61. Corcia, P., et al., *Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52941.
62. Cudkowicz, M.E., et al., *Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis.* Ann Neurol, 2006. **60**(1): p. 22-31.
63. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein).* J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
64. Banci, L., et al., *SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: Mutations and oligomerization.* PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1677.
65. Valentine, J.S., P.A. Doucette, and S. Zittin Potter, *Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis.* Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 563-93.
66. Raha, S. and B.H. Robinson, *Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing.* Trends Biochem Sci, 2000. **25**(10): p. 502-8.
67. Strange, R.W., et al., *The structure of holo and metal-deficient wild-type human Cu, Zn superoxide dismutase and its relevance to familial amyotrophic lateral sclerosis.* J Mol Biol, 2003. **328**(4): p. 877-91.
68. Fridovich, I., *Superoxide dismutases.* Annu Rev Biochem, 1975. **44**: p. 147-59.
69. Banci, L., et al., *Structure and dynamics of copper-free SOD: The protein before binding copper.* Protein Sci, 2002. **11**(10): p. 2479-92.
70. Tainer, J.A., et al., *Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase.* J Mol Biol, 1982. **160**(2): p. 181-217.

71. Boissinot, M., et al., *Function of the Greek key connection analysed using circular permutants of superoxide dismutase.* EMBO J, 1997. **16**(9): p. 2171-8.
72. Rakhit, R. and A. Chakrabartty, *Structure, folding, and misfolding of Cu,Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(11-12): p. 1025-37.
73. Hart, P.J., et al., *A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase.* Biochemistry, 1999. **38**(7): p. 2167-78.
74. Hornberg, A., et al., *The coupling between disulphide status, metallation and dimer interface strength in Cu/Zn superoxide dismutase.* J Mol Biol, 2007. **365**(2): p. 333-42.
75. Lindberg, M.J., et al., *Folding of human superoxide dismutase: Disulfide reduction prevents dimerization and produces marginally stable monomers.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 15893-8.
76. Culotta, V.C., M. Yang, and T.V. O'Halloran, *Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(7): p. 747-58.
77. Sheng, Y.W., et al., *SOD1 aggregation and ALS: Role of metallation states and disulfide status.* Current Topics in Medicinal Chemistry, 2012. **12**(22): p. 2560-2572.
78. Rodriguez, J.A., et al., *Familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations decrease the thermal stability of distinctly metallated species of human copper/zinc superoxide dismutase.* J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15932-7.
79. Culik, R.M., et al., *Effects of maturation on the conformational free-energy landscape of SOD1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(11): p. E2546-E2555.
80. Smith, A.P. and N.M. Lee, *Role of zinc in ALS.* Amyotroph Lateral Scler, 2007. **8**(3): p. 131-43.
81. Sala, F.A., et al., *Molecular recognition and maturation of SOD1 by its evolutionarily destabilised cognate chaperone hCCS.* PLoS Biol, 2019. **17**(2): p. e3000141.
82. Subramaniam, J.R., et al., *Mutant SOD1 causes motor neuron disease independent of copper chaperone-mediated copper loading.* Nat Neurosci, 2002. **5**(4): p. 301-7.
83. Carroll, M.C., et al., *Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 5964-9.
84. Arnesano, F., et al., *The unusually stable quaternary structure of human Cu,Zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status.* J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47998-8003.
85. Roe, J.A., et al., *Differential scanning calorimetry of Cu,Zn-superoxide dismutase, the apoprotein, and its zinc-substituted derivatives.* Biochemistry, 1988. **27**(3): p. 950-8.
86. Leinartaite, L., et al., *Folding catalysis by transient coordination of Zn2+ to the Cu ligands of the ALS-associated enzyme Cu/Zn superoxide dismutase 1.* J Am Chem Soc, 2010. **132**(38): p. 13495-504.
87. Furukawa, Y. and T.V. O'Halloran, *Amyotrophic lateral sclerosis mutations have the greatest destabilizing effect on the apo- and reduced form of SOD1, leading to unfolding and oxidative aggregation.* J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17266-74.
88. Shaw, B.F. and J.S. Valentine, *How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein?* Trends in Biochemical Sciences, 2007. **32**(2): p. 78-85.
89. Rosen, D.R., et al., *Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis.* Nature, 1993. **362**(6415): p. 59-62.
90. Yamashita, S. and Y. Ando, *Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis.* Translational Neurodegeneration, 2015. **4**.
91. Bento-Abreu, A., et al., *The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis.* Eur J Neurosci, 2010. **31**(12): p. 2247-65.

92. Baskoylu, S.N., et al., *Single copy/knock-in models of ALS SOD1 in C. elegans suggest loss and gain of function have different contributions to cholinergic and glutamatergic neurodegeneration.* PLoS Genet, 2018. **14**(10): p. e1007682.
93. Hough, M.A., et al., *Dimer destabilization in superoxide dismutase may result in disease-causing properties: Structures of motor neuron disease mutants.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 5976-81.
94. Lelie, H.L., et al., *Copper and zinc metallation status of copper-zinc superoxide dismutase from amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice.* J Biol Chem, 2011. **286**(4): p. 2795-806.
95. Tiwari, A. and L.J. Hayward, *Familial amyotrophic lateral sclerosis mutants of copper/zinc superoxide dismutase are susceptible to disulfide reduction.* J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5984-92.
96. Juneja, T., et al., *Prognosis in familial amyotrophic lateral sclerosis: progression and survival in patients with glu100gly and ala4val mutations in Cu,Zn superoxide dismutase.* Neurology, 1997. **48**(1): p. 55-7.
97. Li, H.F. and Z.Y. Wu, *Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis.* Transl Neurodegener, 2016. **5**: p. 3.
98. Andersen, P.M., et al., *Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients.* Brain, 1996. **119 (Pt 4)**: p. 1153-72.
99. Robberecht, W., et al., *D90A heterozygosity in the SOD1 gene is associated with familial and apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis.* Neurology, 1996. **47**(5): p. 1336-9.
100. Deng, H.X., et al., *Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase.* Science, 1993. **261**(5124): p. 1047-51.
101. Gurney, M.E., et al., *Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation.* Science, 1994. **264**(5166): p. 1772-5.
102. Reaume, A.G., et al., *Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury.* Nat Genet, 1996. **13**(1): p. 43-7.
103. Bruijn, L.I., et al., *ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions.* Neuron, 1997. **18**(2): p. 327-38.
104. Johnston, J.A., et al., *Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12571-6.
105. Watanabe, M., et al., *Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues.* Neurobiol Dis, 2001. **8**(6): p. 933-41.
106. Bosco, D.A., et al., *Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS.* Nat Neurosci, 2010. **13**(11): p. 1396-403.
107. Forsberg, K., et al., *Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients.* PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11552.
108. Rakhit, R., et al., *Monomeric Cu,Zn-superoxide dismutase is a common misfolding intermediate in the oxidation models of sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis.* J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15499-504.
109. Ding, F., et al., *Local unfolding of Cu, Zn superoxide dismutase monomer determines the morphology of fibrillar aggregates.* J Mol Biol, 2012. **421**(4-5): p. 548-60.
110. Furukawa, Y., et al., *Complete loss of post-translational modifications triggers fibrillar aggregation of SOD1 in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis.* J Biol Chem, 2008. **283**(35): p. 24167-76.

111. Forsberg, K., et al., *Misfolded SOD1 inclusions in patients with mutations in C9orf72 and other ALS/FTD-associated genes.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2019. **90**(8): p. 861-869.
112. Pare, B., et al., *Misfolded SOD1 pathology in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 14223.
113. Graffmo, K.S., et al., *Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis.* Hum Mol Genet, 2013. **22**(1): p. 51-60.
114. Grad, L.I., et al., *Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(9): p. 3620-5.
115. Chia, R., et al., *Superoxide dismutase 1 and tgSOD1 mouse spinal cord seed fibrils, suggesting a propagative cell death mechanism in amyotrophic lateral sclerosis.* PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10627.
116. Munch, C., J. O'Brien, and A. Bertolotti, *Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(9): p. 3548-53.
117. Tokuda, E., et al., *Wild-type Cu/Zn-superoxide dismutase is misfolded in cerebrospinal fluid of sporadic amyotrophic lateral sclerosis.* Mol Neurodegener, 2019. **14**(1): p. 42.
118. Zetterstrom, P., et al., *Misfolded superoxide dismutase-1 in CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients.* J Neurochem, 2011. **117**(1): p. 91-9.
119. Vijayalakshmi, K., et al., *Cerebrospinal fluid from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients induces degeneration of a cultured motor neuron cell line.* Brain Res, 2009. **1263**: p. 122-33.
120. Forsberg, K., et al., *Glial nuclear aggregates of superoxide dismutase-1 are regularly present in patients with amyotrophic lateral sclerosis.* Acta Neuropathol, 2011. **121**(5): p. 623-34.
121. Lee, J.P., et al., *No correlation between aggregates of Cu/Zn superoxide dismutase and cell death in familial amyotrophic lateral sclerosis.* Journal of Neurochemistry, 2002. **82**(5): p. 1229-1238.
122. Lindberg, M.J., et al., *Systematically perturbed folding patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated SOD1 mutants.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(28): p. 9754-9.
123. Da Cruz, S., et al., *Misfolded SOD1 is not a primary component of sporadic ALS.* Acta Neuropathol, 2017. **134**(1): p. 97-111.
124. Rakhit, R., et al., *An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS.* Nat Med, 2007. **13**(6): p. 754-9.
125. Liu, H.N., et al., *Lack of evidence of monomer/misfolded superoxide dismutase-1 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.* Ann Neurol, 2009. **66**(1): p. 75-80.
126. Grad, L.I. and N.R. Cashman, *Prion-like activity of Cu/Zn superoxide dismutase: Implications for amyotrophic lateral sclerosis.* Prion, 2014. **8**(1): p. 33-41.
127. Lai, Z., W. Colon, and J.W. Kelly, *The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid.* Biochemistry, 1996. **35**(20): p. 6470-82.
128. Wiseman, R.L., et al., *Kinetic stabilization of an oligomeric protein by a single ligand binding event.* J Am Chem Soc, 2005. **127**(15): p. 5540-51.
129. Reixach, N., et al., *Cell based screening of inhibitors of transthyretin aggregation.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(3): p. 889-97.
130. Sekijima, Y., M.A. Dendle, and J.W. Kelly, *Orally administered diflunisal stabilizes transthyretin against dissociation required for amyloidogenesis.* Amyloid, 2006. **13**(4): p. 236-49.
131. Rosenblum, H., et al., *TTR (transthyretin) stabilizers are associated with improved survival in oatients with TTR cardiac amyloidosis.* Circ Heart Fail, 2018. **11**(4): p. e004769.

132. Ray, S.S., et al., *Small-molecule-mediated stabilization of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase mutants against unfolding and aggregation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3639-44.
133. Nowak, R.J., et al., *Improving binding specificity of pharmacological chaperones that target mutant superoxide dismutase-1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis using computational methods.* J Med Chem, 2010. **53**(7): p. 2709-18.
134. Vlieghe, P., et al., *Synthetic therapeutic peptides: Science and market.* Drug Discov Today, 2010. **15**(1-2): p. 40-56.
135. Fosgerau, K. and T. Hoffmann, *Peptide therapeutics: Current status and future directions.* Drug Discov Today, 2015. **20**(1): p. 122-8.
136. Latham, P.W., *Therapeutic peptides revisited.* Nat Biotechnol, 1999. **17**(8): p. 755-7.
137. Craik, D.J., et al., *The future of peptide-based drugs.* Chem Biol Drug Des, 2013. **81**(1): p. 136-47.
138. Sato, A.K., et al., *Therapeutic peptides: Technological advances driving peptides into development.* Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(6): p. 638-42.
139. Hamamoto, K., et al., *Antimicrobial activity and stability to proteolysis of small linear cationic peptides with D-amino acid substitutions.* Microbiol Immunol, 2002. **46**(11): p. 741-9.
140. van Groen, T., et al., *The Abeta oligomer eliminating D-enantiomeric peptide RD2 improves cognition without changing plaque pathology.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 16275.
141. Kutzsche, J., et al., *Large-scale oral treatment study with the four most promising D3-derivatives for the treatment of Alzheimer's disease.* Molecules, 2017. **22**(10).
142. Schemmert, S., et al., *Abeta oligomer elimination restores cognition in transgenic Alzheimer's mice with full-blown pathology.* Mol Neurobiol, 2019. **56**(3): p. 2211-2223.
143. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.* Science, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
144. Smith, G.P. and V.A. Petrenko, *Phage display.* Chem Rev, 1997. **97**(2): p. 391-410.
145. Sidhu, S.S., W.J. Fairbrother, and K. Deshayes, *Exploring protein-protein interactions with phage display.* Chembiochem, 2003. **4**(1): p. 14-25.
146. De Berardinis, P. and N.L. Haigwood, *New recombinant vaccines based on the use of prokaryotic antigen-display systems.* Expert Rev Vaccines, 2004. **3**(6): p. 673-9.
147. Hawinkels, L.J., et al., *Efficient degradation-aided selection of protease inhibitors by phage display.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **364**(3): p. 549-55.
148. Sidhu, S.S., et al., *Phage display for selection of novel binding peptides.* Methods Enzymol, 2000. **328**: p. 333-63.
149. Jung, S., A. Honegger, and A. Pluckthun, *Selection for improved protein stability by phage display.* J Mol Biol, 1999. **294**(1): p. 163-80.
150. van Wezenbeek, P.M., T.J. Hulsebos, and J.G. Schoenmakers, *Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: Comparison with phage fd.* Gene, 1980. **11**(1-2): p. 129-48.
151. Ledsgaard, L., et al., *Basics of antibody phage display technology.* Toxins (Basel), 2018. **10**(6).
152. Bazan, J., I. Calkosinski, and A. Gamian, *Phage display - a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications.* Hum Vaccin Immunother, 2012. **8**(12): p. 1817-28.
153. Fagerlund, A., A.H. Myrset, and M.A. Kulseth, *Construction and characterization of a 9-mer phage display pVIII-library with regulated peptide density.* Appl Microbiol Biotechnol, 2008. **80**(5): p. 925-36.
154. O'Callaghan, R., R. Bradley, and W. Paranchych, *The effect of M13 phage infection upon the F pili of E. coli.* Virology, 1973. **54**(1): p. 220-9.

155. Santur, K., et al., *Ligand-Induced Stabilization of the Native Human Superoxide Dismutase 1*. ACS Chem Neurosci, 2021.
156. Schumacher, T.N., et al., *Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display.* Science, 1996. **271**(5257): p. 1854-7.
157. Wiesehan, K. and D. Willbold, *Mirror-image phage display: Aiming at the mirror.* Chembiochem, 2003. **4**(9): p. 811-815.
158. Liu, M., et al., *D-peptides as recognition molecules and therapeutic agents.* Chemical Record, 2016. **16**(4): p. 1772-1786.
159. Goodman, M. and M. Chorev, *Concept of linear modified retro-peptide structures.* Accounts of Chemical Research, 1979. **12**(1): p. 1-7.
160. Cardoso, M.C., E.; Oshiro K., Rezende S., Franco, O., *Peptides containing D-amino acids and retro-inverso peptides: General applications and special focus on antimicrobial peptides.* Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering, 2017.
161. Feng, Z. and B. Xu, *Inspiration from the mirror: D-amino acid containing peptides in biomedical approaches.* Biomol Concepts, 2016. **7**(3): p. 179-87.
162. Biswas, N., et al., *Novel peptide isomer strategy for stable inhibition of catecholamine release: Application to hypertension.* Hypertension, 2012. **60**(6): p. 1552-9.
163. Taylor, E.M., et al., *Retro-inverso prosaptide peptides retain bioactivity, are stable in vivo, and are blood-brain barrier permeable.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000. **295**(1): p. 190-194.
164. Vlieghe, P., et al., *Synthetic therapeutic peptides: Science and market.* Drug Discovery Today, 2010. **15**(1-2): p. 40-56.
165. Bagheri, M. and R.E. Hancock, *High-performance liquid chromatography and mass spectrometry-based design of proteolytically stable antimicrobial peptides.* Methods Mol Biol, 2017. **1548**: p. 61-71.
166. Chorev, M., *The partial retro-inverso modification: A road traveled together.* Biopolymers, 2005. **80**(2-3): p. 67-84.
167. Wienken, C.J., et al., *Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis.* Nat Commun, 2010. **1**: p. 100.
168. Jerabek-Willemsen, M., et al., *Molecular interaction studies using microscale thermophoresis.* Assay Drug Dev Technol, 2011. **9**(4): p. 342-53.
169. Vassar, P.S. and C.F. Culling, *Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues.* Arch Pathol, 1959. **68**: p. 487-98.
170. Gade Malmos, K., et al., *ThT 101: A primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation.* Amyloid, 2017. **24**(1): p. 1-16.
171. Biancalana, M. and S. Koide, *Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils.* Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(7): p. 1405-12.
172. Naiki, H., et al., *Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1.* Anal Biochem, 1989. **177**(2): p. 244-9.
173. LeVine, H., 3rd, *Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution.* Protein Sci, 1993. **2**(3): p. 404-10.
174. Linse, S., *Mechanism of amyloid protein aggregation and the role of inhibitors.* Pure and Applied Chemistry, 2019. **91**(2): p. 211-229.
175. Shoffner, S.K. and S. Schnell, *Estimation of the lag time in a subsequent monomer addition model for fibril elongation.* Phys Chem Chem Phys, 2016. **18**(31): p. 21259-68.
176. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic force microscope.* Phys Rev Lett, 1986. **56**(9): p. 930-933.
177. Zhong, Q., et al., *Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy.* Surface Science Letters, 1993. **290**(1–2): p. L688-L692.
178. Ruggeri, F.S., et al., *AFM-based single molecule techniques: Unraveling the amyloid pathogenic species.* Curr Pharm Des, 2016. **22**(26): p. 3950-70.

179. Ruggeri, F.S., et al., *Atomic force microscopy for single molecule characterisation of protein aggregation.* Arch Biochem Biophys, 2019. **664**: p. 134-148.
180. Zhang, K., et al., *Production of human Cu,Zn SOD with higher activity and lower toxicity in E. coli via mutation of free cysteine residues.* Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 4817376.
181. Saito, T., et al., *Determination of true specific activity of superoxide dismutase in human erythrocytes.* Clin Sci (Lond), 1982. **63**(3): p. 251-5.
182. Santur, K.B., et al., *In vitro reconstitution of the highly active and natively folded recombinant human superoxide dismutase 1 holoenzyme.* ChemistrySelect, 2018. **3**(26): p. 7627-7632.
183. Nordlund, A., et al., *Functional features cause misfolding of the ALS-provoking enzyme SOD1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9667-72.
184. Goto, J.J., et al., *Reactions of hydrogen peroxide with familial amyotrophic lateral sclerosis mutant human copper-zinc superoxide dismutases studied by pulse radiolysis.* J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30104-9.
185. Synofzik, M., et al., *Mutant superoxide dismutase-1 indistinguishable from wild-type causes ALS.* Hum Mol Genet, 2012. **21**(16): p. 3568-74.
186. Abdolvahabi, A., et al., *Stochastic formation of fibrillar and amorphous superoxide dismutase oligomers linked to amyotrophic lateral sclerosis.* ACS Chem Neurosci, 2016. **7**(6): p. 799-810.
187. Abdolvahabi, A., et al., *How do gyrating beads accelerate amyloid fibrillization?* Biophys J, 2017. **112**(2): p. 250-264.
188. Fujiwara, N., et al., *Cu/Zn-superoxide dismutase forms fibrillar hydrogels in a pH-dependent manner via a water-rich extended intermediate state.* PLoS One, 2018. **13**(10): p. e0205090.
189. Chattopadhyay, M., et al., *Initiation and elongation in fibrillation of ALS-linked superoxide dismutase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(48): p. 18663-8.
190. Fandrich, M., *Oligomeric intermediates in amyloid formation: Structure determination and mechanisms of toxicity.* J Mol Biol, 2012. **421**(4-5): p. 427-40.
191. Krejci, A., et al., *Hammock: A hidden Markov model-based peptide clustering algorithm to identify protein-interaction consensus motifs in large datasets.* Bioinformatics, 2016. **32**(1): p. 9-16.

Anhang

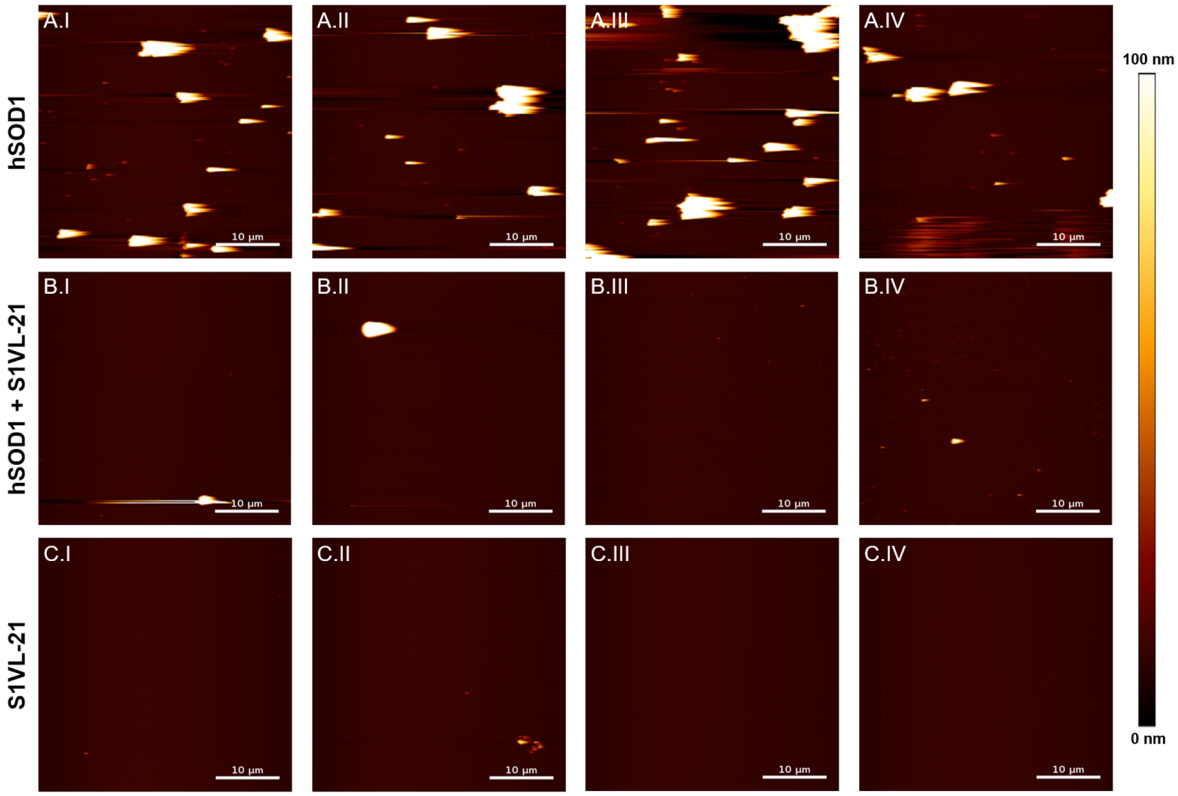


Abbildung 12: Weitere rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Proben aus Abbildung 7 für einen Überblick der Verteilung der hSOD1-Aggregate und zur vorsichtigen Beurteilung des Einflusses von S1VL-21 auf die hSOD1-Aggregation. Die Höhenbilder wurden mit einem Nanowizard3-System (JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland) mit 10 µL der Proben aus dem wie in 4.1.3 beschriebenem ThT-Assay nach 65 h der Aggregation durchgeführt. Die Proben wurden auf einer frisch-gespaltenen Mica für 10 min bei RT inkubiert und anschließend 4x mit 100 µL ddH_2O gewaschen bevor diese mit N_2 vorsichtig getrocknet wurden. Die Messungen erfolgten mit einer Auflösung von 256 Pixeln bei einer Zeilenrate von 2 Hz im intermittierenden Kontaktmodus mit einem Silizium-Cantilever mit einer nominalen Federkonstante von 26 N/m und einem nominalen Spitzenradius von 7 nm. Für einen Vergleich der Proben erfolgte die Prozessierung der Daten mit Hilfe der Datenverarbeitungssoftware des Herstellers (JPK Data Processing software 5.0.69) mit den gleichen Parametern. **A.** Aufnahmen der hSOD1-Probe ohne S1VL-21 nach 65 h der Aggregation. Zu erkennen sind in allen Messbereichen mehrere, große Ablagerungen, die aggregiertes hSOD1 enthalten. **B.** Aufnahmen der hSOD1-Probe, bei der hSOD1 mit einem 10-fachen molaren Überschuss an S1VL-21 unter hSOD1-aggregierenden Bedingungen inkubiert wurde. Im Vergleich zu den Aufnahmen ohne S1VL-21 in A sind hier deutlich weniger größere Ablagerungen zu sehen. **C.** Aufnahmen der Kontrollprobe mit S1VL-21 ohne hSOD1. Es wurden vereinzelt Artefakte gefunden.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Bedingungen der Selektionen, die zur Identifizierung der im Rahmen dieser Arbeit selektierten Peptide führten. Die Selektion zur Identifizierung von hSOD1-Peptidliganden wurde wie im Manuskript 3.2 beschrieben durchgeführt.
NaAc = Natriumacetatpuffer; TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethan; NaPi = Natriumphosphatpuffer; BSA = Bovines Serumalbumin; MP = Milchpulver; NaCl = Natriumchlorid.

Selektion	Immobilisierungsplatte	Konzentration (hSOD1)	Bedingungen	Quenchinglösung	Blockinglösung	Waschpuffer
1	Nunc Immobilizer Amino (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA); Kopplung je nach pH-Wert über Thiole und/oder primäre Amine	50 µg/mL bzw. 157 pmol in 50 mM NaAc pH 6	3 Selektionsrunden mit 5 / 5 / 5 Waschschritten nach Phageninkubation	50 mM Ethanolamin und 100 mM Tris in 10 mM NaPi pH 9	1. Runde: - 2. Runde: 10 mg/mL BSA 3. Runde: 10 mg/mL MP in 50 mM NaAc pH 6	50 mM NaAc pH 6 mit 150 mM NaCl und 0,05% Tween-20; + 2 mg/mL BSA bzw. MP bei entsprechender Selektionsrunde
2	3D-NHS 96 well plate (PolyAn; Berlin, Deutschland); Kopplung über primäre Amine	25 µg/mL bzw. 78 pmol in 50 mM NaAc pH 6	4 Selektionsrunden mit 5 / 10 / 15 / 15 Waschschritten nach Phageninkubation	50 mM Ethanolamin und 100 mM Tris in 10 mM NaPi pH 9	1. Runde: - 2. Runde: 10 mg/mL BSA 3. Runde: 10 mg/mL MP 4. Runde: - in 50 mM NaAc pH 6	50 mM NaAc pH 6 mit 150 mM NaCl und 0,05% Tween-20; + 2 mg/mL BSA bzw. MP bei entsprechender Selektionsrunde
3	Nunc Immobilizer Amino (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA); Kopplung je nach pH-Wert über Thiole und/oder primäre Amine	50 µg/mL bzw. 157 pmol in 50 mM NaAc pH 6	3 Selektionsrunden mit 4 / 6 / 8 Waschschritten nach Phageninkubation	50 mM Ethanolamin und 100 mM Tris in 10 mM NaPi pH 9	1. Runde: - 2. Runde: 10 mg/mL BSA 3. Runde: 10 mg/mL MP in 50 mM NaAc pH 6	50 mM NaAc pH 6 mit 0,05% Tween-20; + 2 mg/mL BSA bzw. MP bei entsprechender Selektionsrunde

Tabelle 3: Zusammenfassung der Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit selektierten Peptide mit Hilfe der Programme TSAT [155] und Hammock [191]. Die mittels NGS-sequenzierten Peptidsequenzen wurden mit der von der Arbeitsgruppe Mohrlüder entwickelten Software TSAT wie im Manuskript 3.2 (S. 37) beschrieben hinsichtlich der Parameter *Empty Score* (EmS) und *Enrichment Factor* (EnF) ausgewertet. Aufgelistet ist neben den ermittelten Werten auch die Positionierung in der jeweiligen Rangfolge. Die Clusteranalyse auf Grundlage von gemeinsamen Sequenzmotiven der nach TSAT prozessierten Sequenzen wurde mit Hilfe der Software Hammock mit den Standardeinstellungen durchgeführt mit der Ausnahme, dass die Sequenzeingabe sortiert nach dem EmS-Wert erfolgte. Mit n (Sequenzen)$_{total}$ wird die Anzahl aller, auch mehrfach vorkommender Sequenzen, die in das jeweilige Cluster einfließen, angegeben. Unter n (Sequenzen)$_{einfach}$ wird die Anzahl der Sequenzen gelistet, die sich in ihrer Aminosäureabfolge unterscheiden. Für die Sequenzen der Selektion 1 wurde keine Clusteranalyse durchgeführt (n.b. = nicht bestimmt). In der Clusteranalyse der Sequenzen der Selektion 2 bzw. 3 wurden insgesamt 64403 bzw. 94410 Sequenzen nach Prozessierung der Daten mittels TSAT einbezogen.

			Auswertung der Sequenzen mittels TSAT und Hammock					
			Empty Score (EmS)		*Enrichment Factor* (EnF)		Clusteranalyse	
Peptid	**Sequenz**	**Selektion**	**Position**	**Wert [-]**	**Position**	**Wert [-]**	**n (Sequenzen)$_{total}$**	**n (Sequenzen)$_{einfach}$**
S1VL-1	RPYNPSHYWHEIHTVQ	1	1	3798	67	240	n.b.	n.b.
S1VL-2	EEPWNRPDWKMSHNKH	1	2	5574	154	103	n.b.	n.b.
S1VL-3	QFGSPSVQQYRHLYFR	1	3	4312	74	218	n.b.	n.b.
S1VL-4	MPGHQESIKVQNWNRV	1	4	1808	406	34	n.b.	n.b.
S1VL-5	KISPRDTHGWYNMPWQ	1	5	3268	78	208	n.b.	n.b.
S1VL-6	EHVVWMRHAEHGWAPM	1	6	2711	182	85	n.b.	n.b.
S1VL-7	WGKQPQTHPTIWSPPV	1	7	2802	15	945	n.b.	n.b.
S1VL-8	YDTPKHKDKTWPMMHH	1	78	1072	1	5235	n.b.	n.b.
S1VL-9	SVSVWVKPAAWEYGIH	1	152	662	2	3665	n.b.	n.b.
S1VL-10	WPHHKQQVGRPAAQSM	1	14	2078	3	2875	n.b.	n.b.
S1VL-11	YDPMKWQITHWALRP	1	17	2008	4	1158	n.b.	n.b.
S1VL-12	FHDTLTHPMQPWDWPP	1	111	870	5	6021	n.b.	n.b.
S1VL-13	YTNEIERYRPHQTNYR	1	35	1293	8	8943	n.b.	n.b.
S1VL-14	GDEYYKSYQRKSHQLW	1	40	634	10	1754	n.b.	n.b.
S1VL-15	THRHHESMDVTHFVKH	1	58	1130	11	434	n.b.	n.b.
S1VL-16	GELQKKMDWLSTMPIM	1	135	348	18	964	n.b.	n.b.
S1VL-17	HPFQMLDINTIRDPVP	2	1	83	282	6	55	13
S1VL-18	KWTTFSQPGTENWFYQ	2	2	77	3	83	657	608
S1VL-19	LPVPSYYSFGSPQYDY	2	6	60	7	64	44	13
S1VL-20	HEVTRWINPLRPIYAL	2	7	58	283	5	34	5
S1VL-21	YKHSWETQEKQNYVTD	2	25	23	38	25	2469	2393
S1VL-22	YPTYPWYYFWHQEDEITRRD	2	anhand der Clusteranalyse von S1VL-21 identifiziert					
S1VL-23	HVEKYWHHNQHHKNVQ	2	952	2	144	8	35	32
S1VL-24	ASFGEKFHPFV	3	1	294	109	24	295	43
S1VL-25	EQYNWVDWIITYTQHE	3	2	247	110	24	893	400
S1VL-26	HYQQYEWLHPDWQEAG	3	3	212	2	247	1313	544
S1VL-27	FGGTYEWEWHWETLAW	3	20	120	115	23	1062	427

Tabelle 4: Zusammenfassung der Screeninganalysen der im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit selektierten Peptide bezüglich deren Affinität zu nativer hSOD1 und deren Einfluss auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) wurde wie in 4.1.2 beschrieben mittels MST-Messungen in **(a)** Premium- (MO-K025; Nanotemper technologies, München, Deutschland) oder **(b)** Standard-Kapillaren (MO-K022; Nanotemper technologies, München, Deutschland) durchgeführt. Die in grau hinterlegten Daten sind mit Vorsicht zu betrachten, da unter den gegebenen Bedingungen keine vollständige Sättigung der Messdaten für die sigmoidale Anpassung zur Berechnung der K_D-Werte erzielt wurde. Der Einfluss der Peptide auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation wurde mit einem molaren Verhältnis von 1:2 (hSOD1:Peptid) mit Hilfe des ThT-Assays wie in 4.1.3 beschrieben in einer 3- bis 6-fach Messung bestimmt. Im Laufe der Arbeit wurde der ThT-Assay angepasst, sodass einige Versuche mit 50 mM NaCl und keiner Vorinkubation **(c)** bzw. **(d)** mit 150 mM NaCl und einer Vorinkubation bei 37 °C (siehe 4.1.3 für Details) durchgeführt wurden. Eine einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit Fisher-Post-hoc-Test wurde für die statistische Auswertung genutzt (n.s. = nicht signifikant, * $p \leq 0{,}05$, ** $p \leq 0{,}01$, *** $p \leq 0{,}001$). Ausgewählte Peptide wurden genauer analysiert (S1VL-11 siehe 4.2.2.1; S1VL-21 siehe 3.2 und 4.2.1; S1VL-13 wies in späteren Messungen mit einem 10-fachen molaren Überschuss dagegen einen Anstieg der ThT-Fluoreszenzemission von +113%***, (d) und eine Verschiebung der Verzögerungsphase um -7,4 h***, (d) im Vergleich zu hSOD1 ohne Peptid auf und wurde daher nicht weiter analysiert (unveröffentlichte Daten)). Die amyloidähnliche Aggregation bzw. Fibrillierung der hier getesteten Peptide selbst wurde anhand der Verfolgung der ThT-Fluoreszenzentwicklung der jeweiligen Peptide ohne hSOD1 ausgeschlossen.

			Einfluss auf die amyloidähnliche hSOD1-Aggregation analysiert mit Hilfe von ThT-Assays	
Peptid	**Sequenz**	**K_D [µM]**	**Gesamtfluoreszenz [%]**	**Verzögerungsphase [h]**
S1VL-1	RPYNPSHYWHEIHTVQ	- (a)	n.s. (c)	n.s. (c)
S1VL-2	EEPWNRPDWKMSHNKH	37,7 ± 2,6 (a)	n.s. (c)	n.s. (c)
S1VL-3	QFGSPSVQQYRHLYFR	7,8 ± 0,6 (a)	-37** (c)	n.s. (c)
S1VL-4	MPGHQESIKVQNWNRV	- (a)	-36*** (c)	-4,1** (c)
S1VL-5	KISPRDTHGWYNMPWQ	- (a)	-19** (c)	+3,6** (c)
S1VL-6	EHVVWMRHAEHGWAPM	- (a)	n.s. (d)	n.s. (d)
S1VL-7	WGKQPQTHPTIWSPPV	48,9 ± 2,4 (a)	n.s. (d)	n.s. (d)
S1VL-8	YDTPKHKDKTWPMMHH	15,4 ± 0,6 (a)	-63** (d)	n.s. (d)
S1VL-9	SVSVWVKPAAWEYGIH	12,2 ± 0,5 (a)	-25*** (c)	+3,6** (c)
S1VL-10	WPHHKQQVGRPAAQSM	76,7 ± 2,6 (b)	-21* (c)	n.s. (c)
S1VL-11	YDPMKWQITHWALRP	34,1 ± 2,5 (a)	-63** (d)	+4,7** (d)
S1VL-12	FHDTLTHPMQPWDWPP	24,6 ± 1,3 (b)	-17** (c)	+3,4** (c)
S1VL-13	YTNEIERYRPHQTNYR	8,1 ± 0,4 (b)	-79** (d)	+2,3*** (d)
S1VL-14	GDEYYKSYQRKSHQLW	- (b)	-27** (c)	n.s. (c)
S1VL-15	THRHHESMDVTHFVKH	- (b)	n.s. (c)	-4,4*** (c)
S1VL-16	GELQKKMDWLSTMPIM	46,6 ± 1,9 (b)	n.s. (d)	n.s. (d)
S1VL-17	HPFQMLDINTIRDPVP	- (b)	n.s. (d)	n.s. (d)
S1VL-18	KWTTFSQPGTENWFYQ	in ddH_2O bzw. 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6 unlöslich		
S1VL-19	LPVPSYYSFGSPQYDY	in ddH_2O bzw. 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6 unlöslich		
S1VL-20	HEVTRWINPLRPIYAL	25,1 ± 2,1 (b)	n.s. (d)	n.s. (d)
S1VL-21	YKHSWETQEKQNYVTD	5,3 ± 0,3 (a)	-64** (d)	+2,9** (d)
S1VL-22	YPTYPWYYFWHQEDEITRRD	in ddH_2O bzw. 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6 unlöslich		
S1VL-23	HVEKYWHHNQHHKNVQ	38,8 ± 3,1 (b)	n.s. (d)	n.s. (d)
S1VL-24	ASFGEKFHPFV	- (b)	n.s. (d)	n.s. (d)
S1VL-25	EQYNWVDWIITYTQHE	in ddH_2O bzw. 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6 unlöslich		
S1VL-26	HYQQYEWLHPDWQEAG	17,6 ± 1,4 (b)	n.s. (d)	n.s. (d)
S1VL-27	FGGTYEWEWHWETLAW	in ddH_2O bzw. 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6 unlöslich		

Publikationen, Konferenzbeiträge und Patentbeteiligungen

Publikationen

Santur K., Reinartz E., Lien Y., Tusche M., Altendorf T., Sevenich M., Tamgüney G., Mohrlüder J., Willbold D. (2021). ″Ligand-Induced Stabilization of the Native Human Superoxide Dismutase 1“. *ACS Chem Neurosci*

Santur K.B.*, Sevenich M.M.*, Schwarten M., Nischwitz V., Willbold D., Mohrlüder J. (2018). ″In Vitro Reconstitution of the Highly Active and Natively Folded Recombinant Human Superoxide Dismutase 1 Holoenzyme“. *ChemistrySelect* **3**(26): p. 7627-7632

Konferenzbeiträge

Santur K.B., Mohrlüder J., Reinartz E., Willbold D. ″Ligand-mediated stabilization of the native hSOD1 conformation – an ALS treatment strategy“. Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases: Formation, aggregation and propagation of amyloids (2017; Düsseldorf, Deutschland). Posterpräsentation.

Santur K.B., Mohrlüder J., Schwarten M., Willbold D. ″Ligand-mediated stabilization of the native hSOD1 conformation – an ALS treatment strategy“. 29th International Symposium on ALS/MND (2018; Glasgow, Irland). Posterpräsentation.

Santur K.B., Mohrlüder J., Schwarten M., Willbold D. ″An ALS treatment strategy based on ligand-mediated stabilization of the native hSOD1 conformation“. 28th International Symposium on ALS/MND (2017; Boston, USA). Posterpräsentation.

Patentbeteiligungen

Willbold D., Mohrlüder J., Santur K.B., Altendorf T., Sevenich M. „Verwendung von L-enantiomeren Peptidliganden von nativ gefalteter humaner Superoxiddismutase 1 (SOD1) für die Therapie von Amyotropher Lateralsklerose (ALS)“, 22.03.2021, DE 102021107051.1

Willbold D., Mohrlüder J., Sevenich M., Altendorf T., Santur K.B. „Verwendung von D-enantiomeren Peptidliganden von monomerem α-synuclein für die Therapie verschiedener Synucleinopathien.“, 22.03.2021, DE 102021107061.9

Willbold D., Mohrlüder J., Altendorf T., Sevenich M., Santur K.B. „Verwendung von D-enantiomeren Peptidliganden von monomerem Tau für die Therapie verschiedener Tauopathien.“, 25.03.2021, DE 102021107546.7

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich beim Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation am IBI-7 in einem sehr gut ausgestatteten Labor anfertigen zu können. Ich danke Dir nicht nur für die Bereitstellung eines hoch interessanten Themas, sondern auch für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Möglichkeit, meine Arbeit an verschiedenen Konferenzen vorstellen zu können, was mich sowohl fachlich als auch menschlich gefördert hat.

Auch beim Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt möchte ich mich bedanken für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein besonderer Dank gilt Fr. Dr. Jeannine Mohrlüder. Nina, ich danke Dir für die freundschaftliche Zusammenarbeit, für die vielen Diskussionen, für Deinen Optimismus und für die zahlreichen Bemühungen, mich zu unterstützen. Du hast mich stets motiviert und Deine Tür bzw. das Telefon stand immer offen. Ich danke Dir für Dein Vertrauen.

Darüber hinaus möchte ich meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Pauline, Marc und Tim danken für die hilfsbereite und offene Zusammenarbeit. In den letzten Jahren haben wir ein sehr gutes Team aufgebaut, das sich sehr gut ergänzt hat und sich auch an nicht so erfolgreichen Tagen gegenseitig motiviert hat.

Ich danke auch meinen Kolleginnen Nici, Indra, Julia und Julia, die ich mittlerweile Freunde nennen kann. Nicht nur im Labor, in den Mittagspausen oder auf Konferenzen hattet Ihr immer ein offenes Ohr für mich. Auch privat hat es sehr großen Spaß gemacht, mit Euch meine Tage zu verbringen und gemeinsam zu lachen.

Ein besonderer Dank gilt auch Karen, Nicole, Markus, Anne, Ian und Volker für die freundliche Unterstützung und die vielen lustigen Momente im und außerhalb des Labors. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des IBI-7 und auch des IPB für das sehr gute Arbeitsklima bedanken.

Weiterhin danke ich auch allen meinen Sitznachbarn des fluktuierenden Büros Nr. 2021, die immer eine sehr gute Atmosphäre geschaffen haben. Janik, Malte, die Schere bekommt nun einen neuen Besitzer. Bettina, nicht nur meine Pflanzen danken Dir für Deine hilfsbereite Art, auch ich danke Dir für die großartigen Gespräche und die gemeinsame Zeit.

Mein persönlicher Dank gilt schließlich meinen Freunden und meiner Familie. Ich bedanke mich bei Elisa, Sonja und insbesondere bei Anja und Nina, sowie Alex und Chris. Ich danke Euch für die Bereitschaft, meine Verrücktheit zu ertragen und immer für mich mit Rat und Tat in Form von tausender Sprach- bzw. Textnachrichten und mit Wein und Käse da zu sein.

Axel, ich danke Dir für Deine Geduld, für Dein Verständnis, Deine Motivation und die bedingungslose Unterstützung mir bei allem zu helfen so gut es geht. Meinen Großeltern möchte ich mich für das Vertrauen bedanken. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich stets motiviert. Ein besonderer Dank gilt vor allem meinen Eltern. Ohne Euch wäre diese Reise niemals möglich gewesen. Ich danke Euch für alles, was Ihr für mich ermöglicht habt, für Eure Unterstützung und für den liebevollen Zusammenhalt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ferner erkläre ich, dass ich in keinem anderen Dissertationsverfahren mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Ort, Datum	Karoline Bianka Santur

Druckgenehmigungen

Copyright Clearance Center RightsLink®

My Orders My Library My Profile

Welcome k.santur@fz-juelich.de Log out | Help

My Orders > Orders > All Orders

License Details

This Agreement between Forschungszentrum Jülich, IBI -- Karoline Santur ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

Print Copy

License Number	4901330712867
License date	Sep 03, 2020
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	ChemistrySelect
Licensed Content Title	In Vitro Reconstitution of the Highly Active and Natively Folded Recombinant Human Superoxide Dismutase 1 Holoenzyme
Licensed Content Author	Jeannine Mohrlüder, Dieter Willbold, Volker Nischwitz, et al
Licensed Content Date	Jul 11, 2018
Licensed Content Volume	3
Licensed Content Issue	26
Licensed Content Pages	6
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title	Stabilisierung der nativen Konformation der humanen Superoxiddismutase 1 mittels Peptidliganden zur ALS-Therapie
Institution name	Institut für Physikalische Biologie
Expected presentation date	Jan 2021
Requestor Location	Forschungszentrum Jülich, IBI-7 Leo-Brandt Straße Juelich, 52425 Germany Attn: Forschungszentrum Jülich, IBI-7
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	**0.00 EUR**

BACK

Copyright © 2021 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. Privacy statement. Terms and Conditions. Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com