

**Abteilung für Neurologie
der Universität Ulm
Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Ludolph**

**Etablierung und Anwendung eines Zellkulturmodells aus EBV-
transformierten B-Lymphozyten zur Untersuchung des
Einflusses von zellulärem Stress auf das Protein TDP-43**

**Dissertation zur Erreichung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

**eingereicht von
Lukas Ferdinand Tümmers
aus Stuttgart**

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Otto

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Mertens

Tag der Promotion: 13.01.2017

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Amyotrophe Lateralsklerose	1
1.1.1 Krankheitsverlauf und Epidemiologie	1
1.1.2 Diagnosestellung.....	1
1.1.3 Genetik der Amyotrophen Lateralsklerose	2
1.1.4 Neuropathologie der Amyotrophen Lateralsklerose	2
1.2 TAR DNA – binding Protein 43 (TDP 43).....	4
1.2.1 Struktur und Funktion von TDP-43	4
1.2.2 TDP-43 Proteinopathien und die möglichen Pathomechanismen von TDP-43	4
1.2.3 TDP-43 in Stressgranula	8
1.3 EBV-transformierte B-Lymphozyten (LCLs) als Zellmodell für neurodegenerative Erkrankungen.....	11
1.4 Ziel meiner Arbeit	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Primärantikörper	16
2.1.3 Sekundärantikörper.....	16
2.1.4 Geräte und Laborbedarf.....	17
2.1.5 Puffer	19
2.1.6 Verwendete Zelllinien.....	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Herstellen der Zelllinien	21
2.2.2 Zellkultur der EBV-transformierten B-Lymphozyten.....	23
2.2.3 Einfrieren der EBV-transformierten B-Lymphozyten	23
2.2.4 Auftauen der EBV-transformierten B-Lymphozyten.....	23
2.2.5 Hitzestress der EBV-transformierten B-Lymphozyten	24
2.2.6 Herstellung von Lysaten mithilfe von RIPA-Puffer.....	24
2.2.7 Auftrennung der Lymphozyten in Zytoplasma und Nukleusfraktion	25
2.2.8 BCA-Assay	27

2.2.9	Gelelektrophorese / Westernblot.....	28
2.2.10	Immunfluoreszenz (IF)	31
3	ERGEBNISSE.....	33
3.1	Western Blot	33
3.1.1	Auftrennung der EBV-transformierten humanen B-Lymphozyten in Zytoplasma und Nukleus... 33	
3.1.2	Untersuchung von TDP-43 im Zytoplasma und Nukleus vor und nach Hitzestress	35
3.2	Immunfluoreszenz-Färbungen.....	40
3.2.1	Bildung von Ablagerungen in LCLs nach Applikation von Hitzestress	40
3.2.2	Kolokalisation von TDP-43 und TIA-1	44
4	DISKUSSION.....	46
4.1	Etablierung des Modells	46
4.2	TDP-43 Translokation	47
4.3	Unterschiede die TDP-43 Mutation	51
4.4	Fazit	52
4.5	Ausblick.....	52
5	ZUSAMMENFASSUNG	54
6	LITERATURVERZEICHNIS	56
7	DANKSAGUNG	69
8	LEBENS LAUF	70

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
C9ORF72	Chromosom 9 open reading frame 72
CD19	Cluster of Differentiation 19
CSA	Cyclosporin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	Eukaryotic initiation factor
FCS	Fetales Kälberserum
FTLD	Frontotemporale Lobärdegeneration
FUS	Fused in Sarcoma
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GRR	Glycin reiche Region
HeLa-Zellen	Zervixkarzinom Zelllinie
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase
HS	Hitzeschock
HSP	Hitzeschockproteine
IF	Immunfluoreszenz
LCLs	Lymphoblastoid cell lines
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
Nuk.	Nukleus
p84	Nuklear-Matrix-Protein 84
PAPB-1	Poly-(A)-binding Protein 1
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
Pen.	Penicillin

POD	Peroxidase
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RRM	RNA recognition motif
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD-1	Superoxiddismutase-1
Strept.	Streptomycin
TARDBP	TAR DNA binding Protein
TDP-43	TAR DNA binding Protein 43
TIA-1	T-cell intracellular antigen 1
TIAR	TIA-1 related protein
Zyt.	Zytoplasma

1 Einleitung

1.1 Amyotrophe Lateralsklerose

1.1.1 Krankheitsverlauf und Epidemiologie

Die Amyotrophe Lateralsklerose ist eine tödlich verlaufende Erkrankung des motorischen Nervensystems, die durch degenerative Veränderungen des ersten und zweiten Motoneurons charakterisiert ist (Chiò et al. 2013). Die Erkrankung beginnt mit einer fokalen Lähmung und breitet sich im Verlauf auf weitere Regionen des Körpers aus, wobei die muskulären Symptome der Erkrankung eine hohe Heterogenität zeigen (Ravits and La Spada 2009). Aufgrund des Befalls des ersten und zweiten Motoneurons kommt es im Krankheitsverlauf sowohl zu Muskelparesen als auch zu einer Spastizität, Reflexsteigerung und Pyramidenbahnzeichen. Die Patienten bemerken initial häufig eine Muskelschwäche, sowie Muskelkrämpfe und Faszikulationen (Mattle and Mumenthaler 2013). Letztendlich kommt es durch eine Lähmung der Atemmuskulatur zum Tod durch Ateminsuffizienz. Die mittlere Überlebenszeit beträgt ungefähr 2 - 4 Jahre nach Symptombeginn (Chiò et al. 2013). In Europa liegt die Inzidenz bei 2,08 pro 100.000 Einwohner, während die Prävalenz bei 5,4 pro 100.000 Einwohner liegt (Chiò et al. 2013). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen, die Erkrankung beginnt in den meisten Fällen zwischen dem 40. und 65. Lebensjahr (Mattle and Mumenthaler 2013). Alle Patienten mit ALS werden im Verlauf ihrer Erkrankung pflegebedürftig, was mit einer psychischen und finanziellen Belastung sowohl der Patienten als auch ihrer Angehörigen einhergeht.

1.1.2 Diagnosestellung

Die Diagnose der ALS erfolgt im Wesentlichen durch die klinische neurologische Untersuchung. Hierbei wird besonders auf Zeichen der Schädigung des ersten und zweiten Motoneurons, sowie die betroffenen Regionen geachtet. Die klinische Untersuchung sollte standardgemäß um eine apparative Basisdiagnostik ergänzt werden. Diese beinhaltet eine Elektromyographie und –neurographie, sowie eine Basislabordiagnostik. Diese Basisdiagnostik kann je nach in Frage kommenden Differentialdiagnosen noch um fakultative Untersuchungen erweitert werden. Eine genetische Diagnostik wird häufig nur bei Patienten mit einer positiven Familienanamnese, die Demenzen und psychiatrische Erkrankungen mit einschließt, durchgeführt. Zum Diagnosezeitpunkt werden Körpergewicht und Vitalkapazität als Verlaufsparemeter bestimmt. Um die Progression der Erkrankung zu dokumentieren, wird die ALS/Functional Rating Scale als einfach

anzuwendender klinischer Score verwendet (Cedarbaum et al. 1999) (Dengler et al. 2014). Aktuell liegt die Verzögerung zwischen Symptombeginn und Diagnosestellung bei circa 12 Monaten (Turner and Benatar 2015). Jüngste Ergebnisse zeigen, dass möglicherweise der Anstieg von Neurofilamenten im Liquor und Serum der Patienten, zu einer früheren Diagnose von ALS führen könnte (Steinacker et al. 2015) (Weydt et al. 2015).

1.1.3 Genetik der Amyotrophen Lateralsklerose

Bei der Amyotrophen Lateralsklerose unterscheidet man eine sporadische und eine familiäre Form. Die sporadische Form macht über 90% der ALS-Fälle aus. Bei den restlichen 10% kann eine familiäre Vererbung nachgewiesen werden. Es kommen sowohl rezessive als auch dominante Erbgänge vor (Ludolph and Brettschneider 2015). Klinisch können familiäre und sporadische ALS nicht unterschieden werden, sodass die familiäre ALS aufgrund von Erbgängen mit reduzierter Penetranz möglicherweise unterdiagnostiziert ist (Andersen and Al-Chalabi 2011). 1993 wurde mit SOD1 das erste Gen entdeckt, das für circa 20% der familiären ALS-Fälle verantwortlich ist (Rosen et al. 1993) (Laferriere and Polymenidou 2015). Seither hat man viele weitere Gendefekte entdeckt. Die häufigsten Gendefekte betreffen *hexanucleotid repeat expansions* in C9ORF72, sowie Mutationen in SOD1, TDP-43 und FUS. Insgesamt können heute ca. 60% der familiären ALS-Fälle durch bekannte Genmutationen erklärt werden. Während in der Mehrheit der sporadischen ALS-Fälle die Ätiologie der Erkrankung unbekannt ist, zeigen sich in einem kleinen Prozentsatz der Fälle *de novo* Mutationen der oben genannten Gene (Laferriere and Polymenidou 2015).

1.1.4 Neuropathologie der Amyotrophen Lateralsklerose

Histopathologische Zeichen der ALS sind eine Degeneration der Betz'schen Riesenzellen, der Hirnnervenkerne, sowie der Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks. Weiterhin zeigt sich eine Degeneration des anterioren und des lateralen kortikospinalen Traktes. (Brownell et al. 1970) (Agosta et al. 2012). Lediglich die Motoneurone des Nukleus oculomotorius, abducens, trochlearis und onufrowicz sind nicht betroffen, weshalb die Okulomotorik, sowie die Harn- und Stuhlkontinenz erhalten bleiben (Kato 2008). Die Zytopathologie der Motoneurone ist gekennzeichnet durch zytoplasmatische Einschlüsse. Die beiden häufigsten zytoplasmatischen Einschlüsse sind die sogenannten Bunina Körperchen, sowie Ubiquitin-positive Einschlüsse (Leigh et al. 1991). Bei den Bunina Körperchen handelt es sich um 1-10 µm große eosinophile, granuläre Einschlüsse, die in Zytoplasma und Dendriten der Vorderhornzellen auftreten (Bunina 1962) (Leigh et al. 1991)

(Kato 2008). Sie enthalten Zellbestandteile wie Neurofilamente und Vesikel. Weiterhin sind sie immunreaktiv auf Cystatin C (Kimura et al. 2014).

Sie wurden erstmalig 1962 von dem russischen Pathologen Bunina beschrieben und werden bei ca. 70% aller Patienten mit sporadischer ALS gefunden (Leigh et al. 1991). Die Ubiquitin-positiven Einschlüsse wurden erstmalig 1988 (Lowe et al. 1988) beschrieben und zeigen eine hohe Korrelation zur klinisch gestellten Diagnose ALS (Lowe et al. 1989) (Ince et al. 1998). Es sind zwei Formen der Ubiquitin-positiven Einschlüsse beschrieben. Häufiger sind die unregelmäßigen, strangartigen, zytoplasmatischen Einschlüsse, deren Ausläufer teilweise in die Dendriten hinein ragen. Seltener sind die dichten, kompakten, runden Einschlüsse, die ebenfalls im Zytoplasma der Motoneurone zu finden sind (Lowe et al. 1989). 2006 konnte gezeigt werden, dass die Hauptkomponente dieser Einschlüsse TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) ist (Neumann et al. 2006) (Arai et al. 2006). Dies liegt in den Einschlüssen ubiquitiniert, hyperphosphoryliert, sowie fragmentiert vor (Neumann et al. 2006). Neben Motoneuronen konnten diese Einschlüsse auch in Gliazellen der betroffenen Gehirnareale nachgewiesen werden (Cairns et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass TDP-43-positive Einschlüsse in circa 97% der familiären und sporadischen ALS-Fälle nachzuweisen sind. In den Fällen, in denen die ubiquitinierten Einschlüsse TDP-43-negativ waren, handelte es sich um Patienten mit einer Mutation im SOD1 oder FUS-Gen (Scotter et al. 2015). So unterscheidet man anhand der Proteine, die in den ubiquitinierten Einschlüssen nachweisbar sind, die Untergruppen ALS-TDP, ALS-SOD und ALS-FUS (Mackenzie et al. 2010). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass sich ALS stufenweise über das Gehirn ausbreitet und damit Ähnlichkeiten zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer aufweist. Die Erkrankung kann in vier Phasen unterteilt werden und breitet sich vom agranulären Motorkortex und den spinalen, sowie bulbären Motoneuronen aus (Brettschneider et al. 2013). Weiterhin gibt es erste Hinweise darauf, dass es zu einer antegraden Ausbreitung der Erkrankung entlang der Axone der Motoneurone kommt (Braak et al. 2014).

1.2 TAR DNA – binding Protein 43 (TDP 43)

1.2.1 Struktur und Funktion von TDP-43

TDP-43 ist ein 414 Aminosäuren langes Protein, das von TARDBP auf Chromosom 1p36.2 codiert wird. Es ist ein hochkonserviertes, häufig exprimiertes Protein, das hauptsächlich im Nukleus lokalisiert ist. Es wurde ursprünglich als Bindungsprotein des Pyrimidin-reichen HIV-1-TAR-DNA Elements beschrieben (Ou et al. 1995) (Mackenzie et al. 2010). TDP-43 besteht aus zwei *RNA recognition motifs* (RRM1 & RRM2) (Ou et al. 1995) (Buratti et al. 2001), einem nukleären Lokalisations- und Export-Signal (Winton et al. 2008), sowie einer Glycin-reichen C-terminale Region, die DNA-, RNA- und Proteinbindungen ermöglicht (Wang et al. 2004). Die Glycin-reiche C-terminale Region wird für die Regulation des Splicing und Exon-skipping benötigt, dafür interagiert sie mit anderen Proteinen der heterogenen nukleären Ribonukleoprotein-Familie (Buratti et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass TDP-43 die Expression von 601 mRNAs, sowie die Splice-Muster von weiteren 965 mRNAs beeinflusst (Polymenidou et al. 2011). TDP-43 autoreguliert seine Expression auf der Transkriptionsebene mittels eines negativen Feedbackmechanismus (Ayala et al. 2011b). Es kann sich, über sein nukleäres Lokalisations- und Export-Signal, kontinuierlich zwischen Nukleus und Zytoplasma hin- und her bewegen (Ayala et al. 2008). Auch scheint TDP-43 eine Rolle in der micro-RNA Regulation zu spielen (Buratti et al. 2010). Aktuell sind 48 Mutationen in TDP-43 bekannt, die ALS verursachen können, wobei nahezu alle diese Mutationen in der Glycin-reichen Region von TDP-43 lokalisiert sind (Lattante et al. 2013).

1.2.2 TDP-43 Proteinopathien und die möglichen Pathomechanismen von TDP-43

Unter dem Begriff TDP-43-Proteinopathien werden die neurodegenerativen Erkrankungen tau-negative Frontotemporale Lobärdegeneration (FTLD) und TDP-43-positive Amyotrophe Lateralsklerose zusammengefasst, die beide TDP-43-positive Ablagerungen aufweisen. Weiterhin liegt bei beiden Erkrankungen TDP-43 ubiquitiniert, hyperphosphoryliert, sowie fragmentiert vor (Neumann et al. 2006) (siehe Abbildung 1). Im Gegensatz zur ALS, bei der wie bereits erwähnt 97% aller Patienten TDP-43-positive Ablagerungen aufweisen, zeigen bei der FTLD nur 45% der Patienten TDP-43-positive Einschlüsse. Aufgrund der Gemeinsamkeiten der Neuropathologie von ALS und FTLD, sowie der Tatsache, dass einige Patienten Symptome beider Erkrankungen zeigen, wird angenommen, dass beiden Erkrankungen ein gemeinsamer Pathomechanismus zugrunde liegt.

Bei der Amyotrophen Lateralsklerose und der Frontotemporalen Demenz handelt es sich also möglicherweise um die beiden Extreme eines Kontinuums von neurodegenerativen Erkrankungen mit überlappenden Symptomen (Kwong et al. 2007) (Ling et al. 2013) (Scotter et al. 2015).

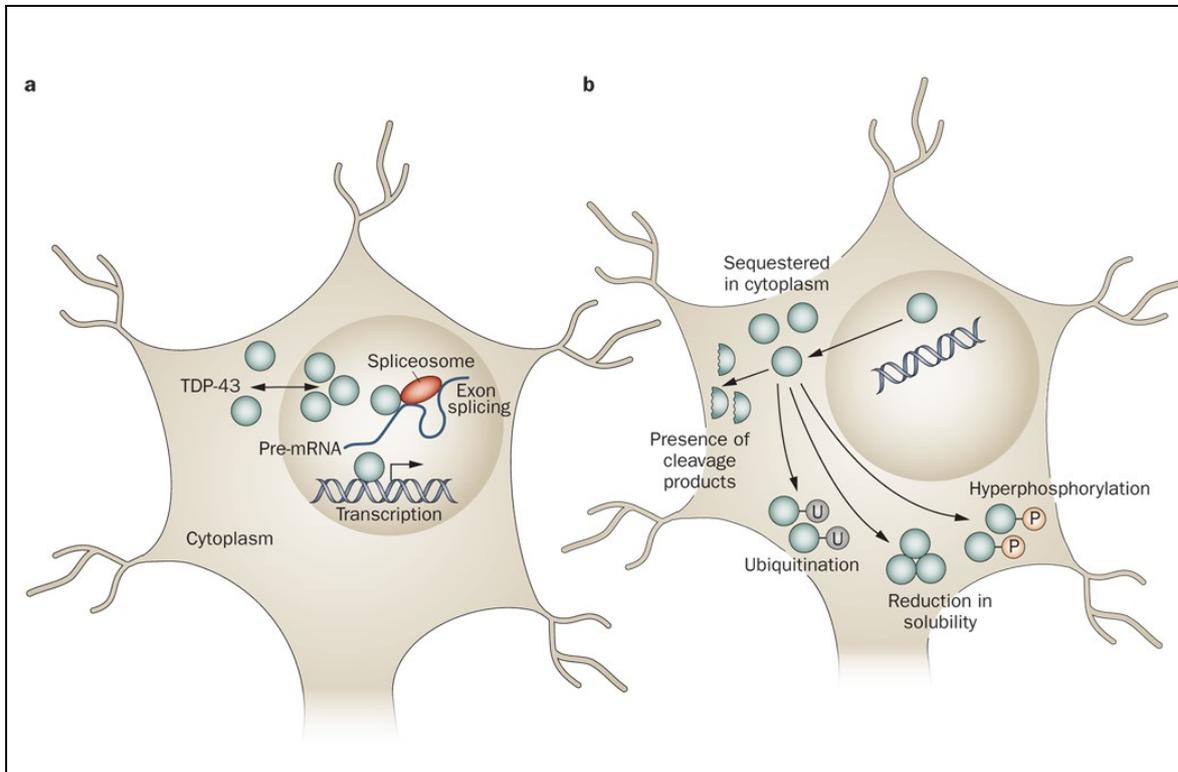


Abbildung 1 (Chen-Plotkin et al. 2010): TDP-43 physiologisch und pathologisch.

a: Physiologisches TDP-43 (TAR DNA binding Protein 43) ist hauptsächlich im Nucleus lokalisiert, kann sich allerdings zwischen Nucleus und Zytoplasma hin- und her bewegen. Es wurde beschrieben, dass es eine Rolle bei der Transkription, dem Splicing, sowie der mRNA-Stabilisierung spielt. **b:** Unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer Leerung des Nucleus, während TDP-43 im Zytoplasma akkumuliert. Das pathologische TDP-43 ist ubiquitiniert, hyperphosphoryliert und weist eine verminderte Löslichkeit auf. Weiterhin zeigen sich C-terminale Spaltprodukte von TDP-43 (Neumann et al. 2006).
Abbildung nach (Chen-Plotkin et al. 2010)

Wie bereits unter Punkt 1.2.1 beschrieben, handelt es sich bei TDP-43 um ein DNA-RNA bindendes Protein, das bei der Expression und dem Splicing von mRNA eine Rolle spielt (Polymenidou et al. 2011). Es ist hauptsächlich im Nucleus lokalisiert, kann sich jedoch als Shuttleprotein zwischen Nucleus und Zytoplasma hin- und her bewegen (Ayala et al. 2008). In TDP-43-Proteinopathien kommt es zu einer Umverteilung des TDP-43 mit Leerung des

Nukleus und zur Bildung von TDP-43-positiven Einschlüssen im Zytoplasma (Neumann et al. 2006) (Arai et al. 2006).

Die Pathomechanismen, die zur Entstehung der TDP-43-positiven Einschlüsse führen, sind bis heute weitestgehend ungeklärt. Im Zellmodell konnte gezeigt werden, dass ALS-Mutationen in TDP-43 zu einer Anreicherung von TDP-43 im Zytoplasma führen (Barmada et al. 2010) (Kabashi et al. 2009) (De Marco et al. 2011). Durch die Hemmung der Proteindegradation mittels eines Proteasom-Inhibitors konnte im Zellmodell ebenfalls ein Anstieg des zytoplasmatischen TDP-43 ausgelöst werden (van Eersel et al. 2011). Auch reicherte sich transfiziertes TDP-43 mit einer Änderung im nukleären Lokalisations-Signal im Zytoplasma der Zellen an. Es bildete Aggregate, die ubiquitiniert waren und C-terminale Fragmente des TDP-43 aufwiesen. Durch eine Änderung im nukleären Export-Signal konnte wiederum eine Anreicherung des TDP-43 im Nukleus mit Bildung von nukleären Aggregaten beobachtet werden. Hier zeigte sich, dass das transfizierte TDP-43 auch endogenes TDP-43 in die Aggregate rekrutierte (Winton et al. 2008). Interessanterweise wurde beschrieben, dass die Anreicherung von TDP-43 im Zytoplasma zytotoxisch wirkt, aber die Toxizität unabhängig von der Formierung lichtmikroskopisch sichtbarer Aggregate ist (Barmada et al. 2010). Auch scheint die Toxizität von TDP-43 im Zellmodell dosisabhängig zu sein und kann durch Beseitigung von TDP-43 mittels Autophagie reduziert werden (Barmada et al. 2014).

Neben der zytoplasmatischen Akkumulation von TDP-43 scheinen die C-terminale Fragmentierung, sowie die Phosphorylierung und Ubiquitinierung eine wichtige Rolle in der Pathogenese der TDP-43-Proteinopathien zu spielen (siehe Abbildung 1). So konnte gezeigt werden, dass die Hauptkomponente der Ablagerungen in Gehirnen von Patienten mit ALS und Frontotemporaler Demenz das C-terminale Fragment von TDP-43 ist. Im Gegensatz zum Großhirn, wiesen die spinalen Ablagerungen ungespaltenes TDP-43 auf (Neumann et al. 2006) (Igaz et al. 2008). Im Zellmodell konnte gezeigt werden, dass durch Mutationen im C-terminalen Teil von TDP-43 (Rutherford et al. 2008) (Sreedharan et al. 2008), sowie Proteasom-Hemmung (Huang et al. 2014) eine vermehrte TDP-43-Fragmentierung erreicht werden kann. Die C-terminalen Fragmente von TDP-43 scheinen anfälliger für Aggregation zu sein als vollständiges TDP-43 und können dieses in die Aggregate rekrutieren (Yang et al. 2010) (Che et al. 2011). Es gibt jedoch erste Hinweise darauf, dass die Fragmentierung von TDP-43 in kleinere Proteinteile mit 25 bzw. 35 kDa ein physiologischer Schritt beim Abbau von TDP-43 ist (Huang et al. 2014).

Die Hyperphosphorylierung und Ubiquitinierung des pathologischen TDP-43 ist ein Kennzeichen der TDP-43-Proteinopathien (Neumann et al. 2006) (Arai et al. 2006). So wurden phospho-TDP-43 spezifischer Antikörper entwickelt.

Diese färbten, bei Patienten mit TDP-43-Proteinopathien, lediglich die pathologischen Einschlüsse innerhalb des Zytoplasmas. Das normale TDP-43 im Nukleus wurde hierbei nicht gefärbt (Hasegawa et al. 2008) (Inukai et al. 2008) (Neumann et al. 2009).

Ob die TDP-43-Phosphorylierung zu einer erhöhten oder verminderten Toxizität des zytoplasmatischen TDP-43 führt, wird aktuell kontrovers diskutiert. In einigen Arbeiten wurde durch die Phosphorylierung von TDP-43 die Menge an Aggregaten und die Toxizität von TDP-43 erhöht (Brady et al. 2011) (Choksi et al. 2014) (Carlomagno et al. 2014). Eine andere Arbeit zeigte eine Verminderung von Aggregaten und Toxizität durch die Phosphorylierung von TDP-43 (Li et al. 2011). Über die Ubiquitinierung von TDP-43 ist weniger bekannt. Die TDP-43-positiven Einschlüsse scheinen hauptsächlich K48- und K63-verknüpfte Polyubiquitin-Ketten zu enthalten (Seyfried et al. 2010) (Hebron et al. 2013). Für die Ubiquitinierung von TDP-43 scheinen UBE2E-Ubiquitin-konjugierende Enzyme und Parkin verantwortlich zu sein (Hebron et al. 2013) (Hans et al. 2014), während die Ubiquitin-Isopeptidase-Y für die Dekonjugierung zuständig zu sein scheint (Hans et al. 2014). Aktuell ist jedoch noch unklar, welchen Effekt die TDP-43-Ubiquitinierung hat (Scotter et al. 2015). Ein möglicher weiterer Mechanismus für die Aggregatbildung könnte zellulärer Stress sein. So konnte durch Applikation von zellulärem Stress auf Zellmodelle eine Aufnahme von TDP-43 in Stressgranula beobachtet werden (Liu-Yesucevitz et al. 2010) (Dewey et al. 2011) (Bentmann et al. 2012) (Colombrita et al. 2009) (Scotter et al. 2015).

Es ist auch noch ungeklärt, ob es sich bei dem TDP-43 Pathomechanismus in den TDP-43-Proteinopathien um einen *gain of function* oder *loss of function* handelt. So konnte in Tiermodellen durch eine Überexpression von Wild-Typ TDP-43, ALS-Symptome und die TDP-43 Neuropathologie reproduziert werden (Wils et al. 2010) (Ash et al. 2010). Die ersten Studien die einen *loss of function* überprüfen wollten, zeigten auf, dass ein *knockdown* von TDP-43 in Mäusen zu einem frühen embryonalen Tod führt, was zwar für eine wichtige Rolle von TDP-43 in der embryonalen Entwicklung sprach, jedoch keinen Aufschluss zur Möglichkeit eines *loss of function* Pathomechanismus in den TDP-43-Proteinopathien gab (Wu et al. 2010) (Kraemer et al. 2010) (Sephton et al. 2010). Durch partiellen und konditionierten *knockdown* von TDP-43 konnte jedoch in Tiermodellen ALS-ähnliche Phänotypen und TDP-43 Neuropathologie beobachtet werden (Kabashi et al. 2009) (Wu et

al. 2012) (Iguchi et al. 2013). Es scheint, dass eventuell beide Mechanismen eine Rolle bei der Entwicklung von ALS eine Rolle spielen (Scotter et al. 2015).

1.2.3 TDP-43 in Stressgranula

Stressgranula sind transiente zytoplasmatische Strukturen, die der Zelle als Bestandteil einer durch Stress ausgelösten Reaktion auftauchen. Es wird angenommen, dass sie mRNA sortieren um diese zu translatieren, sequestrieren oder degradieren. Das übergeordnete Ziel scheint zu sein, die Translation und den ATP-Verbrauch zu reduzieren, um möglichst viele Energiereserven für die Stressreaktion zur Verfügung zu haben, sowie nach der Stressreaktion eine normale Proteinbiosynthese, durch die Prozessierung und Translation der gespeicherten mRNA, zu ermöglichen. Zu zellulärem Stress führen plötzliche Umgebungsveränderungen wie beispielsweise Hitzestress, Oxidantien, Ischämie oder virale Infektionen. Dadurch kommt es zur Aktivierung der *eukaryotic initiation factor alpha* (eIF2 α) Kinase, diese phosphoryliert eIF2 α und inhibiert damit die globale Proteintranslation. Gleichzeitig kommt es zur Translation schützender *heat shock* Proteine (HSP) die spezifisch für den jeweiligen Stress sind (Anderson and Kedersha 2008) (Wolozin 2012) (Dewey et al. 2012). Die Zusammensetzung der Stressgranula variiert in Abhängigkeit von der Art des Stressors und der Zelle. Einige Grundkomponenten sind jedoch immer enthalten. So enthalten Stressgranula immer mRNAs, die 40S-Untereinheit der Ribosomen, TIA-1 (*T-cell intracellular antigen-1*), TIAR (*TIA-1-related Protein*), eIF3, eIF4B, eIF4F (*eukaryotic initiation factor*), sowie PAPB-1 (*Poly-(A)-binding Protein-1*). Diese Grundkomponenten stellen universelle Stressgranulamarker dar. Unter physiologischen Bedingungen kommt es durch Verschwinden des Stressors zu einem Auflösen der Stressgranula (Anderson and Kedersha 2008) (Dewey et al. 2012).

Eine Rekrutierung von TDP-43 in Stressgranula konnte für oxidativen Stress, Hitzestress (Colombrita et al. 2009) (Liu-Yesucevitz et al. 2010) (McDonald et al. 2011), Nahrungsentzug (Liu-Yesucevitz et al. 2010), Stress des Endoplasmatischen Retikulums mittels Thapsigargin (McDonald et al. 2011), sowie Proteasomhemmung mittels MG-132 (Freibaum et al. 2010) gezeigt werden. Für die Lokalisation von TDP-43 in die Stressgranula scheinen die RRM1 (*RNA recognition motif 1*) und die GRR (*Glycin rich region*) wichtig zu sein (Colombrita et al. 2009) (Freibaum et al. 2010) (Dewey et al. 2011). TDP-43 scheint ein optionaler Bestandteil von Stressgranula zu sein. So konnte ein *knock-down* von TDP-43 die Stressgranula-Entstehung im Zellmodell zwar verlangsamen, jedoch nicht verhindern

(McDonald et al. 2011). Weiterhin scheint die Rekrutierung von TDP-43 in Stressgranula abhängig vom Stressor und der Zelllinie zu sein, da nicht mit jedem Stressor in jeder Zelllinie TDP-43 in den Stressgranula nachgewiesen werden konnte (Ayala et al. 2011a) (Meyerowitz et al. 2011) (Dewey et al. 2012).

Eine Arbeitsgruppe konnte eine Kollokalisierung von TDP-43 mit TIA-1 und eIF3 in Gehirn- und Rückenmark-Schnitten von Patienten mit ALS zeigen (Liu-Yesucevitz et al. 2010). Beide Proteine sind Grundkomponenten von Stressgranula. Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte, dass Zellen mit einer ALS verursachenden Mutation im TDP-43 im Zellmodell unter oxidativem und osmotischem Stress schneller Stressgranula ausbildeten und diese größer werden als bei Zellen mit TDP-43 ohne Mutation (Dewey et al. 2011). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zwei Modelle für die Rolle der Stressgranula in der Pathogenese der TDP-43-Proteinopathien vorgeschlagen. Das erste Modell sieht die Stressgranulaentstehung und darauffolgende Wiederauflösung als unabhängiges Ereignis in Bezug auf die Entstehung der TDP-43-positiven Aggregate (siehe Abbildung 2 links). Das zweite Modell sieht die Entstehung der TDP-43 enthaltenden Stressgranula als Vorstufe zu den TDP-43-positiven Aggregaten. So wäre es möglich, dass Stressgranula als Keim für die TDP-43-positiven Aggregate in den TDP-43-Proteinopathien dienen. So könnte es durch wiederholten oder andauernden Stress zur Aggregation von TDP-43 kommen. Weiterhin sieht dieses Modell die Möglichkeit, dass Mutationen in TDP-43 diesen Prozess beschleunigen könnten (siehe Abbildung 2 rechts) (Dewey et al. 2012).

Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte Ergebnisse, die mit dem zweiten Modell vereinbar zu sein scheinen. Sie konnten zeigen, dass sich nach längerer Stress-Exposition TDP-43 enthaltende Stressgranula ausbildeten, die sich zwar wie erwartet wieder auflösten, allerdings verblieben einige TDP-43-positive Aggregate, die nun negativ für Stressgranula-Marker waren. In diesen Aggregaten zeigte sich das TDP-43 ubiquitiniert, was in den initial auftretenden Stressgranula noch nicht der Fall gewesen war (Parker et al. 2012). Einen weiteren Hinweis für die Rolle von zellulärem Stress bei der Entstehung von TDP-43-Proteinopathien konnte eine Arbeitsgruppe liefern, die intermediäre poly-Q Expansionen im Ataxin-2 Gen untersuchte, die als Risikofaktor für ALS gelten. Zelllinien mit dieser Expansion zeigten nach Hitzestress eine Anreicherung von phosphorylierten C-terminalen TDP-43 Spaltprodukten, sowie erhöhte Werte des Apoptoseenzym Caspase 3 (Hart and Gitler 2012). Aktuell ist noch ungeklärt, ob und inwiefern zellulärer Stress eine Rolle in der pathologischen Aggregation von TDP-43 bei neurodegenerativen Erkrankungen spielen (Dewey et al. 2012).

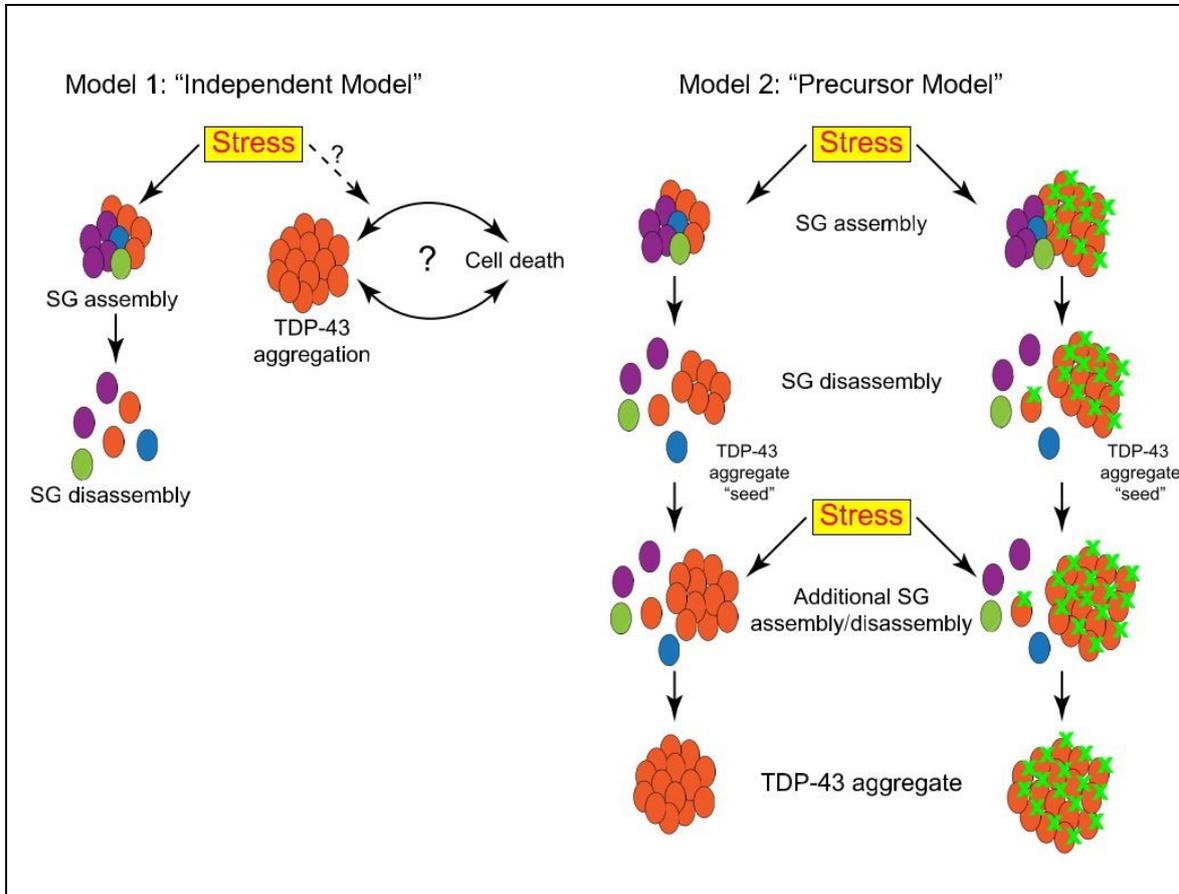


Abbildung 2 (Dewey et al. 2012): Beide Modelle der Rolle von Stressgranula bei der Entstehung von TDP-43 (TAR DNA binding Protein 43) positiven Aggregaten in TDP-43-Proteinopathien. Das erste Modell nimmt an, dass die Entstehung und Auflösung von Stressgranula vollkommen unabhängig von der Entstehung der TDP-43 positiven Aggregate ist. Das zweite Modell nimmt an, dass die Stressgranula (SG) unter chronischem oder wiederholtem Stress als eine Art „Keim“ für die TDP-43 positiven Aggregate dienen. Weiterhin wäre es möglich, dass eine Mutation in TDP-43 diesen Prozess beschleunigt.

TDP-43: orange; TDP-43 mit Mutation: orange mit grünem Kreuz; Stressgranula-Grundkomponenten: lila; FUS (Fused in Sarcoma): grün; weitere Proteine: blau.
 Abbildung nach (Dewey et al. 2012)

1.3 EBV-transformierte B-Lymphozyten (LCLs) als Zellmodell für neurodegenerative Erkrankungen.

EBV-transformierte B-Lymphozyten (LCLs) sind Zelllinien, die man durch das Infizieren Mononukleärer Lymphozyten (PBMC) mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) erhält. Sie gleichen aktivierten B-Lymphozyten in Bezug auf ihre Oberflächenmoleküle und Aktivierungsmarker (Wang et al. 1990). Da es schwierig ist, die pathophysiologischen Vorgänge neurodegenerativer Erkrankungen aus *post mortem* Proben von Patienten zu erforschen, hat man hierfür in der Vergangenheit mehrfach LCLs von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen verwendet. Vor allem zur weiteren Erforschung der Pathophysiologie der Alzheimer-Demenz wurden LCLs von Patienten mit dieser Erkrankung verwendet (Matsumoto A 1991) (Nagy et al. 2002) (De Las Cuevas et al. 2003) (De Las Cuevas et al. 2005) (Bartolomé et al. 2007) (Muñoz et al. 2008).

Weitere Arbeiten gab es zum Morbus Parkinson (Kim et al. 2012), sowie der spinozerebellären Ataxie (Tsai et al. 2005) (Mancini et al. 2013). Es konnte in diesen Arbeiten gezeigt werden, dass sich die LCLs von Patienten mit familiären neurodegenerativen Erkrankungen von denen gesunder Patienten unterscheiden und dazu geeignet sind, die Pathophysiologie dieser Erkrankungen weiter zu untersuchen. Auch zu den TDP-43-Proteinopathien sind bereits mehrere Arbeiten mit LCLs durchgeführt worden. Zwar ist ALS eine neurodegenerative Erkrankung, die Motoneurone im Gehirn betrifft, TDP-43 ist allerdings ein ubiquitär vorkommendes Protein, weshalb man bei einer Mutation im TDP-43 durchaus von Veränderungen in allen Körperzellen ausgehen kann. So konnte gezeigt werden, dass es in LCLs von Patienten mit einer TDP-43-Mutation gegenüber gesunden Kontrollen zu einer vermehrten Anreicherung von unlöslichen C-terminalen TDP-43-Spaltprodukten kommt, was ein Kennzeichen der Neuropathologie der TDP-43-Proteinopathien ist (Rutherford et al. 2008) (Kabashi et al. 2008). Auch konnte durch die Applikation von zellulärem Stress, in LCLs von ALS-Patienten mit einer intermediären poly-Q Expansion im Ataxin 2 Gen, eine vermehrte Anreicherung von phosphorylierten C-terminalen Spaltprodukten ausgelöst werden (Hart and Gitler 2012). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte in LCLs von Patienten mit ALS verursachenden Mutationen unterschiedliche micro-RNA Level, der TDP-43 bindenden micro-RNAs (Freischmidt et al. 2013). Bei Patienten mit TDP-43-positiver Frontotemporaler Demenz und Mutation im Progranulin-Gen konnten deren LCLs verwendet werden, um in diesen eine Dysregulation des Zellzyklus gegenüber den gesunden Kontrollen zu zeigen (Alquezar et al. 2012).

Eine weitere Arbeitsgruppe konnte in Lymphozyten von ALS-Patienten mit und ohne TDP-43-Mutation gegenüber gesunden Kontrollen eine Anreicherung des TDP-43 im Zytoplasma, sowie eine Leerung des Nukleus zeigen. Bei dieser Arbeit wurden zwar keine LCLs verwendet, jedoch die Fraktion der *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC), die Lymphozyten und Monozyten enthalten (De Marco et al. 2011). Für meine Arbeit war außerdem wichtig, dass für LCLs bereits einige Zellstress-Modelle etabliert sind. So gibt es bereits Arbeiten zu oxidativem Stress (Main et al. 2013) (Rose et al. 2014) und Hitzestress (Marini et al. 2004) (Hart and Gitler 2012). Eine dieser Arbeiten nutzt die LCLs um die Verbindung zwischen Ataxin-2 und TDP-43 weiter zu untersuchen (Hart and Gitler 2012), da bekannt ist, dass mittellange poly-Q-Expansionen (27-33Qs) im Ataxin-2 eine Risikofaktor für ALS sind (Elden et al. 2010). So zeigten sie, dass in Zelllinien mit mittellangen poly-Q-Expansionen, nach der Applikation von Hitzestress ein erhöhtes Level an phosphoryliertem TDP-43 nachweisbar ist (Hart and Gitler 2012).

1.4 Ziel meiner Arbeit

Ziel meiner Arbeit ist die Etablierung eines neuen Zellmodells zur weiteren Untersuchung des Einflusses von zellulärem Stress auf TDP-43. Speziell möchte ich untersuchen, ob man die, für TDP-43-Proteinopathien typische, Leerung des Nukleus von TDP-43 und dessen Anreicherung im Zytoplasma durch die Applikation von Hitzestress auslösen kann. Weiterhin möchte ich untersuchen, ob sich durch die Applikation von Hitzestress die Bildung von TDP-43-enthaltenden Ablagerungen in der verwendeten Zelllinie auslösen lässt.

Als Zelllinien wurden EBV-transformierte B-Lymphozyten (LCLs) ausgewählt. Diese bieten den Vorteil, dass man das mutierte TDP-43 nicht erst durch Transfektion in die Zelllinien einbringen muss, da man LCLs von Patienten mit einer Mutation im TDP-43 verwenden kann. Für die Untersuchung wurden drei LCLs aus Patientenblutproben hergestellt: Eine Zelllinie von einer Patientin mit ALS und einer N352S-Mutation im TARDBP-Gen (ALS/TDP+ #1), eine Zelllinie von einem Patienten mit ALS ohne bekannte Mutation (sALS #1), sowie eine Zelllinie einer gesunden Kontrollperson, ohne neurologische Erkrankungen in der Eigen- und Familienanamnese (Gesund #1). Dies bietet die Möglichkeit zu überprüfen, ob es durch die N352S-Mutation im TDP-43 zu einer veränderten Reaktion des TDP-43 auf den Hitzestress kommt.

Zur Untersuchung der Zelllinien nach dem Hitzestress, soll zum einen eine Immunzytochemie auf TDP-43 durchgeführt werden, um die Zellen auf mögliche Ablagerungen zu untersuchen. Weiterhin muss eine Methode zur Isolierung der Nukleus- und Zytoplasmafraktion etabliert werden, um zu untersuchen, ob es durch die Applikation von Hitzestress zu einer Umverteilung des TDP-43 aus dem Nukleus in das Zytoplasma kommt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1 Chemiekalien

Chemikalien	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Acrylamid/Bis 30%	BioRad, Hercules CA, USA
BCA Reagent A	Pierce, Rockford IL, USA
Borsäure	Sigma, Steinheim
BSA V RIA Grade	Paesel+Lorei, Hanau
CD19 Micro Beads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Complete Mini EDTA free	Roche Diagnostics, Mannheim
Cyclosporin A	Sigma, Steinheim
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	AppliChem, Darmstadt
Fetal Bovine Serum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formalin Solution, neutral bufferd, 10%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hepes	AppliChem, Darmstadt
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immersol 518 F	Zeiss, Oberkochen
Isopropanol	Sigma, Steinheim
Interleukin 10	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kupfersulfat	Pierce, Rockford IL, USA
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Luminata™ Forte Western HRP Substrate	Millipore Corporation, Billerica USA
Milchpulver	Roth, Karlsruhe

Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe
Magic Mark XP Western Standard	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natrium-Deoxycholate (Na-Doc)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Peq-GOLD Protein-Marker IV	PeqLab, Erlangen
PenStrep Gibco 15140	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Phosphat-bufferd-saline PBS	Biochrome AG, Berlin
Roti-Load 4-fach konzentriert	Roth, Karlsruhe
RPMI-Medium Gibco 1640	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Roti-Immunoblock 10x Konz.	Roth, Karlsruhe
Salzsäure HCl	VWR, Fontenay, sous Bois, FR
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinheim
Temed	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trizma base (Tris)	Sigma, Steinheim
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
Visipaque 320	GE Healthcare, Braunschweig

2.1.2 Primärantikörper

Tabelle 2 Primärantikörper

Mouse Anti-GAPDH (Clone: ZG003) Catalog No. : 39-8600, Lot: 384875A	Invitrogen, Carlsbad
Rabbit Anti-TARDBP, PolyAb Catalog No. : 10782-2-AP, Lot: 4	Proteintech, Chicago USA
Mouse Anti-Nuclear Matrix Protein p84 [5E10], monoAb Catalog No.: ab487 Lot: GR6536-8	Abcam, Cambridge UK
Goat Anti-TIA-1 (C-20), poly AB Catalog No.: sc-1751 Lot: #/1411	SantaCruz, Dallas USA
Mouse Anti- β -Tubulin I, monoAB Catalog No.: T8328 (Clone: SAP.4G5)	Sigma, Steinheim

2.1.3 Sekundärantikörper

Tabelle 3 Sekundärantikörper

Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP Catalog No.: P044701-2	Dako, Hamburg
Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) HRP Conjugate Catalog No.: 172-1034-MSDS	BioRad, München
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP Catalog No.: P044801-2	Dako, Hamburg
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Catalog No.: A-11034	Invitrogen, Carlsbad USA
Cy 5 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) Catalog No.: 715-175-150	JacksonImmuno, West Grove USA
Alexa 488 Donkey anti Goat Catalog No.: A11055	Invitrogen, Carlsbad USA
Alexa 546 Goat Anti-Rabbit Catalog No.: A-11035	Invitrogen, Carlsbad USA

2.1.4 Geräte und Laborbedarf

Tabelle 4 Geräte und Laborbedarf

48-Well-Platte Nunclon Surface	Nunc, New York USA
96-Well-Cell-Culture Plate	Cellstar, Carrollton USA
Tissue Culture Flask 75cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Cell Culture Flask 25cm ²	Cellstar, Carrollton USA
Pipettenspitze 1000µl, blau	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitze 200µl, gelb	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitze 0,5-20µl, weiß	Sarstedt, Nümbrecht
Tube 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Tube 15ml	Sarstedt, Nümbrecht
Safe Seal Tube 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Safe Seal Tube 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette 5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette 10ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Monovette 7,5 ml, K2 EDTA-Gel	Sarstedt, Nümbrecht
5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Parafilm Verschlussfolie	Brand/Merz & Co, Frankfurt
BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	Thermo Scientific, Rockfort USA
Deckgläser 23x60mm	Thermo Scientific, Rockfort USA
Immobilon Transfer Membran	Millipore Corporation, Billerica USA
Extra thick Blot Paper	Bio-Rad, Hercules CA, USA
MACS Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Biofuge fresco Heraeus	Thermo Scientific, Rockfort USA
Explorer (Waage)	Ohaus, Parsippany USA
Glass Plates Mini Protean 3 System	BioRad, Hercules CA, USA
Mini-Protean Tetra Cell	BioRad, Hercules CA, USA
Casting Frame	BioRad, Hercules CA, USA
Casting Stand	BioRad, Hercules CA, USA
Buffer Dam	BioRad, Hercules CA, USA
Kamm 10 well, 1,0 mm	BioRad, Hercules CA, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

Reference Pipettensatz	Eppendorf, Hamburg
Finnpipette F2	Thermo Scientific, Rockfort USA
Electrophoresis Power Supply, Consort, EV 231	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schüttler Typ 3006	Behr Labortechnik, Düsseldorf
TE 77 ECL Semi-Dry Transfer Unit	Amersham Biosciences, Piscataway USA
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Funtion Line (Brutschrank)	Thermo Scientific, Rockfort USA
1083 (Wasserbad)	Behr Labortechnik, Düsseldorf
Heraeus Lamin Air HA 2448 GS	Thermo Scientific, Rockfort USA
Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Axiovert 200	Zeiss, Oberkochen
AxioCam MRM	Zeiss, Oberkochen
Axio Vision Release 4.8.1	Zeiss, Oberkochen
Neubauer Bright-Line	Labor Optik, Lancing UK
Vakuum Pumpsystem BVC 21 NT	Vacuubrand, Wertheim
Heraeus CO ₂ –Auto-Zero	Thermo Scientific, Rockfort USA
Forma 900 Series (-80°C)	Thermo Scientific, Rockfort USA
Image Quant LAS 4000	GE Healthcare, Braunschweig
Ebq (Fluoreszenzlampe)	Leistungselektronik, Jena
ELx800 UV Universal Microplate Reader	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
VF 2 (Vortexer)	IKA Labortechnik, Staufen
MR 3001 (Rührer)	Heidolph, Schwabach
MilliQ biocel A10	Millipore Corporation, Billerica USA
Nalgene Cyro 1°C Freezing Container	Thermo Scientific, Rockfort USA
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda USA
KCjunior Win	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall

2.1.5 Puffer

RIPA Puffer:	50 mM Hepes/NaOH pH 7,4 150 mM NaCl 1% v/v Triton 10% 0,5% w/v Na-Doc 0,1% w/v SDS 1 Tablette Protease Inhibitor auf 10 ml
Mowiol 4-88 mit Hoechst 33342	6,0 g Glycerin 2,4 g Mowiol 4-88 6 ml Wasser bidest, steril 12,0 ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,5) 10 µg/ml Hoechst 33342
Stripping Puffer	500 mM Glycin 1% w/v SDS 1% w/v Tween-20 4 mM DTT Mit HCl auf pH 3,5 titrieren
Laemmli Puffer (Laemmli 1970)	25 mM Tris-HCl (pH 8,7) 192 mM Glycin 0,1% w/v SDS
Blotpuffer A	210 mM Tris-HCl (pH 10,4) 30% v/v Methanol
Blotpuffer B	25 mM Tris (pH 10,4) 30% v/v Methanol
Blotpuffer C	25mM Tris-HCl (pH 10,4) + Borsäure (0,5 M) auf pH 9,0 0,03% w/v SDS

2.1.6 Verwendete Zelllinien

Als Zelllinien für die Versuche wurden EBV-transformierte B-Lymphozyten von Patienten verwendet (siehe Abschnitt 2.2.1). Die Zelllinien kamen von einem Patienten der an ALS erkrankt war und eine TDP-43-Mutation (N352S) aufwies, einem Patienten der an sporadischer ALS (sALS) ohne TDP-43-Genmutation erkrankt war und einem gesunden Probanden der als Kontrolle dienen sollte. Die Bezeichnungen der Zelllinien sind aus Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5 Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	TDP-43 Mutation	Diagnose	Geschlecht	Geburtsjahr	Entnahmejahr
ALS/TDP + #1	N352S	ALS	W	1958	2008
sALS #1	Keine	ALS	M	1960	2008
Gesund #1	Nicht bestimmt	Gesund	M	1963	2011

Diese Tabelle bezeichnet die verwendeten Zelllinien: Die Zelllinie ALS/TDP + #1 Entstammt einer weiblichen ALS Patientin, Jahrgang 1958 und wurden ihr 2008 entnommen. Die Patientin weist eine N352S Mutation im TDP-43 (TAR DNA binding Protein 43). Die Zelllinie sALS #1 entstammt einem männlichen ALS Patienten, Jahrgang 1960 und wurde ihm 2008 entnommen. Er hat keine bekannte TDP-43-Mutation. Die Zelllinie Gesund #1 entstammt einer gesunden männlichen Kontrolle, Jahrgang 1963 und wurde ihm 2011 entnommen.

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellen der Zelllinien

2.2.1.1 Isolation von B-Lymphozyten

Zur Isolation der Lymphozyten wurde ein Ficoll-Gradient verwendet. Ficoll ist ein hochverzweigtes hydrophiles Polysaccharid. Es kann verwendet werden, um die Fraktion der Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), die Lymphozyten und Monozyten enthält, von den restlichen Blutzellen zu trennen. Dies beruht auf der unterschiedlichen Dichte der Blutzellen. Hierfür wurde 10 ml EDTA-Blut mit 10 ml RPMI-Medium ohne Zusätze verdünnt. 5 ml Ficoll wurde in ein 15 ml Röhrchen gegeben und vorsichtig mit 10 ml verdünntem EDTA-Blut überschichtet (2 Ansätze). Daraufhin wurden die Proben in der Centrifuge 5810 R (Eppendorf) 40 Min. bei 400 g (1900 RPM) bei minimaler Beschleunigung und ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Lymphozyten gegenüber den anderen Blutzellen kann man diese nun aus der Interphase beider Röhrchen gewinnen, indem man sie mit einer Pipette abnimmt. Danach wurden sie in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und auf 50 ml mit RPMI-Medium ohne Zusätze aufgefüllt und 15 Min. bei 1400 g (3000 RPM) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 30 ml RPMI-Medium ohne Zusätze suspendiert und auf 2 Röhrchen (15 ml) verteilt. Dann wurden die beiden Röhrchen erneut 15 Min. bei 1400 g (3000 RPM) zentrifugiert. Um die Chance auf eine erfolgreiche Transformation zu erhöhen und somit ein Anwachsen der EBV-transformierten B-Lymphozyten zu erreichen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze durchgeführt. Ein Röhrchen wurde für B-Zell Trennung verwendet (siehe Abschnitt 2.2.1.3), das zweite Röhrchen wird mithilfe von Cyclosporin A behandelt, um die nicht mit EBV infizierten Lymphozyten zu unterdrücken (siehe Abschnitt 2.2.1.2).

2.2.1.2 Weiterbehandlung mit Cyclosporin A

Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 400 µl EBV-haltigem Medium aufgenommen. Das EBV-haltige Medium stammte aus dem Überstand einer Affen-Lymphozyten Zelllinie (B95-8) die EBV in hohem Maße an das Medium abgibt. In vier Vertiefungen einer 48-Well-Platte wurden nun je 200 µl RPMI-Medium (20 % FCS, 1 % Pen/Strept., Glutamin) und anschließend je 100 µl der Zellsuspension gegeben. Die Wells um diese Wells herum wurden zu drei Vierteln mit Medium gefüllt. Dies beugt der Austrocknung der vier Wells vor. Nach vier Tagen wurde das Medium ausgetauscht. Hierbei wurden 200 µl pro Well abgenommen und frisches Medium (20 % FCS) aufgefüllt.

Anschließend wurden 20 µl Cyclosporin A in jede Vertiefung pipettiert (CSA: 15µg/ml), dies dient dazu, die nicht mit EBV infizierten B-Lymphozyten sowie restlichen Zellen der PBMC Fraktion zu unterdrücken. Nach ca. drei Wochen wurden die Zellen aus allen Vertiefungen in eine 25 cm² Zellkulturfalsche überführt und mit zusätzliche 3 ml frischem RPMI-Medium (20%FCS) versehen. Bei beginnendem Zellwachstum wurde die Mediummenge langsam erhöht und das FCS auf 10% reduzieren.

2.2.1.3 Isolation der B-Lymphozyten mithilfe von CD19 Microbeads (MACS Miltenyi)

Bei dieser Methode macht man es sich zunutze, dass von allen Fraktionen der PBMC nur die B-Lymphozyten CD19 exprimieren. Die metallischen CD19 Microbeads binden an das CD19 der B-Lymphozyten und werden dann mithilfe eines Magneten in der Säule gehalten, während die restlichen Fraktionen der PBMC abgewaschen werden. Hierfür wurde der Überstand aus dem Röhrchen (siehe Abschnitt 2.2.1.1) abgesaugt und das Zellpellet in 80 µl PBS (100 ml PBS + 200 µl 1M EDTA + 500 µl FCS) suspendiert und 20 µl CD19 Microbeads zugegeben und 15 Min. bei +4 °C inkubiert. Währenddessen wurde eine MACS Column (Miltenyi Biotec) vorbereitet und mit 500 µl PBS gespült. Die gesamte Zellsuspension wurde auf die Säule geladen und ihr wurde Zeit zum Einwirken gegeben. Anschließend wurde 3x mit je 500 µl PBS gewaschen. Dann wurde die Säule aus der Magnethalterung genommen, 1 ml PBS einfüllt und der Stempel eindrückt. Danach wurde 10 Min. bei 2000 RPM zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl EBV-haltigem Medium aufgenommen. Zwei Vertiefungen einer 96-well-Platte wurden mit je 100 µl RPMI-Medium (20 % FCS) gefüllt und je 50 µl Zellsuspension hinzugegeben. Anschließend wurden 10 µl Interleukin 10 (2000 IE/ml) in jedes Well hinzugegeben. Nach vier Tagen wurden 150 µl aus jedem Well abgesaugt und durch die gleiche Menge an frischen RPMI-Medium (20 % FCS) ersetzt. Anschließend wurden erneut 10 µl pro Well Interleukin 10 hinzugegeben. Nach ca. 2 Wochen wurden die Zellen aus beiden Vertiefungen in ein Well einer 24-well-Platte überführt und 600 µl frisches RPMI-Medium (20 % FCS) hinzugefügt. Bei Wachstum wurden die Zellen in ein 25 cm² Zellkulturfalsche überführt und langsam die Mediummenge erhöht sowie die Konzentration des FCS auf 10 % gesenkt.

2.2.2 Zellkultur der EBV-transformierten B-Lymphozyten

Die Zellen wurden in einer Tissue Culture Flask 75 cm² bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Als Medium verwendete man RPMI-Medium Gibco 1640 mit 1 % PenStrep Gibco 15140 und 10 % Fetal Bovine Serum (Sigma). Der Mediumwechsel erfolgte, wenn der Indikator eine Ansäuerung des Mediums anzeigte. Hierzu wurden die Flaschen im Brutschrank aufgestellt um den Suspensionszellen Zeit zum Absinken zu geben. Nach ca. 15 Min. wurde dann das Medium oberhalb der zum Boden gesunkenen Zellen abgenommen und durch neues Medium ersetzt. Die Zellen wurden gesplittet, wenn sie eine Konzentration von 10⁶/ml bis 1,5x10⁶/ml erreicht hatten. Gesplittet wurde im Verhältnis eins zu zwei.

2.2.3 Einfrieren der EBV-transformierten B-Lymphozyten

Um die LCLs einzufrieren, wurde ihre Konzentration mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Danach wurden sie bei RT für 5 Min. bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurden ihnen Medium mit 10 % FCS und 10 % DMSO zugegeben bis zu einer Konzentration von 1,5x10⁷ Zellen/ml. Nun wurde je ein Milliliter in ein Kryoröhrchen überführt. Diese wurden nun in den Freezing Container gegeben und dieser über Nacht in einen -80°C Gefrierschrank gestellt. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen dann in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.4 Auftauen der EBV-transformierten B-Lymphozyten

Beim Auftauen der LCLs wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff geholt und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Sobald die Zellsuspension flüssig wurde, wurden die Zellen in einen 15 ml Falcon überführt und 10 ml RPMI Gibco 1640 Medium hinzugegeben, um das toxische DMSO zu verdünnen. Dann wurden die Proben mit 300 g bei RT für fünf Min. zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml RPMI Gibco 1640 Medium mit 20 % FCS und 1 % PenStrep gelöst und in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführen. Diese wurde danach in den Brutschrank überführt. Bei beginnendem Zellwachstum wurde langsam mehr Medium hinzugegeben und die FCS Konzentration auf 10 % reduziert.

2.2.5 Hitzestress der EBV-transformierten B-Lymphozyten

Diese Methode diente dazu, bei den LCLs eine Stressreaktion hervorzurufen. Hierfür wurden die Zellen in einer Konzentration von 10^6 /ml in 25 cm² Zellkulturflaschen umgefüllt und mit frischem Medium (10% FCS, 1% PenStrept) versehen. Danach wurde die Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert, um ihnen Zeit zu geben, sich von dem Umsetzen in eine andere Zellkulturflasche zu erholen. Nach 24 h wurden die Zellkulturflaschen mit Parafilm abgedichtet und für 1 h in ein auf 42 °C vorgeheiztes Wasserbad gestellt. Danach wurden die Flaschen von außen mit Ethanol gereinigt, der Parafilm entfernt und für bis zu fünf Stunden zurück in den Brutschrank gestellt. Für die Versuchsreihe wurden mehrere 25 cm² Zellkulturflaschen mit LCLs angesetzt. Eine Flasche wurde zur Kontrolle angesetzt, diese wurde keinem Hitzestress ausgesetzt. Es wurden mehrere Flaschen angesetzt, die dem Hitzestress ausgesetzt wurden. Diesen Zellen wurde danach wiederum unterschiedlich lange Zeit zum Erholen gegeben. Ihnen wurde nach dem Hitzestress entweder keine Zeit, eine, zwei, drei oder fünf Stunden zum Erholen gegeben. Nach den angegebenen Zeiträumen wurden die Zellen für fünf Min. bei 300 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 4 °C kaltem Medium (ohne Zusätze) gelöst. Danach wurden die Zellen sowohl in Zytoplasma und Nukleus aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.7), als auch zur Immunfluoreszenz verwendet (siehe Abschnitt 2.2.10). Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt um den Proteinstoffwechsel der Zellen auf ein Minimum zu reduzieren.

2.2.6 Herstellung von Lysaten mithilfe von RIPA-Puffer

RIPA-Puffer wurde verwendet, um Lysate von Lymphozyten zu erstellen. Zusätzlich wurde er auch verwendet, um die Nuclei zu lysieren, die man aus der Auftrennung der Lymphozyten (siehe Abschnitt 2.2.7) erhalten hatte. Hierzu wurden die Zellen bzw. Nuclei bei 300 g (Zellen) bzw. 1000 g (Nuclei) bei 4 °C für fünf Min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet in eiskaltem PBS resuspendiert und erneut mit denselben Einstellungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dann wurden den Pellets RIPA-Puffer hinzugegeben und 20 Min. auf Eis inkubiert. In dieser Zeit wurden die Tubes 3x für 10 Sekunden gevortext. Danach wurden die Proben in einer Tischzentrifuge mit 13000 rpm bei 4 °C für fünf Min. zentrifugiert. Die entstanden Pellets wurden verworfen und die Proteinkonzentration mithilfe eines BCA-Assays (siehe Abschnitt 2.2.8) bestimmt.

2.2.7 Auftrennung der Lymphozyten in Zytoplasma und Nukleusfraktion

Die Auftrennung der Lymphozyten in ihre Zytoplasma- und Nukleusfraktion wurde mithilfe eines, bei geringer G-Kraft durchgeführten, Iodixanol-basierten Dichtegradienten durchgeführt (Poglitsch et al. 2011). Die für den Dichtegradienten verwendeten Schichten bestanden aus dem isoosmolaren Visipaque 320 (65,2% Iodixanol), das in unterschiedlicher Konzentration mit PBS verdünnt wurde. Um die Zytoplasmamembran zu zerstören wurde der Lyse-Schicht das Detergenz IGEPAL CA-630 hinzugefügt. Da dieses sehr viskös ist, wurde es in PBS zu einer 10%igen Lösung verdünnt. Die endgültige Konzentration des IGEPAL CA-630 in der Lyse Schicht betrug 0,5%. Außerdem wurden, um die Proteolyse in der Lyse- und der nukleären Wasch-Schicht zu verhindern, diese beiden Schichten mit dem Proteaseinhibitor Complete Mini EDTA free (Roche) versehen. Die Zusammensetzung der einzelnen Schichten ist der nachfolgenden Tabelle 6 zu entnehmen. IGEPALCA-630 und Complete Mini EDTA free wurden immer erst unmittelbar vor der Verwendung hinzugegeben.

Tabelle 6 Schichten für die Gradientenzentrifugation

	Visipaque 320	PBS	IGEPAL CA-630 (10% in PBS)	Protease-Inhibitor
Zell-Wasch-Schicht (10ml)	0,8 ml	9,2 ml		
Lyse-Schicht (10ml)	1,5ml	8ml	0,5ml	1 Tablette
Nukleäre-Wasch-Schicht (10ml)	3,8ml	6,2ml		1 Tablette
Schwebe-Schicht (10ml)	5,4ml	4,6ml		

Zur Auftrennung wurden die LCLs gezählt danach für fünf Min. bei 300 g abzentrifugiert (Centrifuge 581R Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ /ml in eiskaltem Medium ohne Zusätze neu gelöst. Alle weiteren Schritte ab diesem Zeitpunkt wurden auf Eis durchgeführt. Danach wurden die bereits vorbereiteten und auf Eis gekühlten Schichten (siehe Tabelle 6), vorsichtig in ein 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube pipettiert. Dabei ist zu beachten, dass sich die einzelnen

Schichten nicht vermischen. Die Schichten wurden von oben nach unten wie folgt geschichtet (siehe Abbildung 3):

Oben

Medium mit Lymphozyten: 5×10^6 Zellen/ml: 1ml

Zell-Wasch-Schicht: 0,5ml

Lyse-Schicht: 1ml

Nukleäre Wasch-Schicht: 0,5ml

Schwebe-Schicht: 1ml

Unten

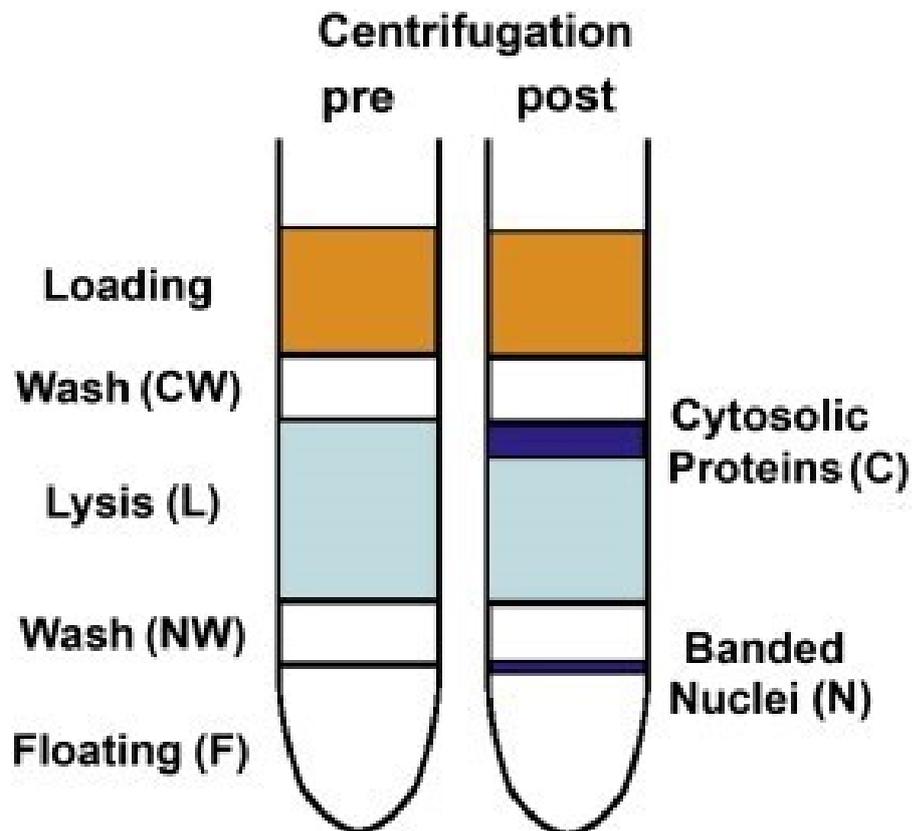


Abbildung 3 (Poglitsch et al. 2011)

Schichten des Gradienten vor und nach der Zentrifugation.

Danach wurden die Tubes für 10 Min. bei 4°C und 1000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Tubes wieder auf Eis gestellt und die einzelnen Schichten vorsichtig abpipettiert, um keine Vermischung der nun aufgetrennten Fraktionen zu erzeugen. Das Medium sowie

die Zellwaschschicht wurden verworfen. Die oberen 500 μl der Lyse-Schicht werden entnommen und in ein 1,5 ml Eppi überführt, sie enthalten die zytoplasmatischen Proteine. Die noch intakten Kerne befinden sich zwischen der nukleären Wasch-Schicht und der Schwebeschicht. Sie dürfen erst entnommen werden, nachdem die Schichten oberhalb von ihnen verworfen wurden, um eventuelle Kontamination mit Zytoplasmaproteinen zu vermeiden. Die intakten Kerne sind zwischen den beiden klaren Schichten als dünne trübe Schicht zu erkennen. Diese Fraktion entspricht ca. 150 μl und sollte mit einer 200 μl Pipette entnommen werden. Zur Anordnung der Schichten vor und nach der Zentrifugation siehe auch Abbildung 3. Um die noch intakten Nuclei zu lysieren, wurden die entnommenen 150 μl in einem 1,5 ml Eppi mit 1 ml PBS eisgekühltem PBS verdünnt und erneut für fünf Min. bei 1000 g und $+4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entnommen und verworfen. Das Pellet aus den intakten Nuclei wurde nun auf Eis mit RIPA-Puffer lysiert (siehe Abschnitt 2.2.6). Die erhaltenen Zytoplasma- und Nucleusfraktionen wurden mithilfe des Concentrator 5301 (Eppendorf) konzentriert um eine höhere Proteinkonzentration zu erhalten. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mithilfe eines BCA-Assays bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.8)

2.2.8 BCA-Assay

Das BCA-Assay wurde verwendet, um die Proteinkonzentration der Lysate zu bestimmen. Hierbei werden durch die Peptidbindungen der Proteine zweiwertige Kupferionen zu einwertigen Kupferionen reduziert. Diese Reaktion ist direkt proportional zur Anzahl der Peptidbindungen und damit zur Proteinmenge. Das einwertige Kupfer bildet mit 2 Molekülen Bicinchinonsäure (BCA) einen violetten Komplex. Die Farbintensität der Probe kann mithilfe des ELx800 UV Universal Microplate Readers bestimmt werden. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) mit Aqua bidest, auf folgende Konzentrationen verdünnt: 0, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Jeweils 100 μl von jeder Konzentration der Standardreihe, sowie 100 μl der je nach Bedarf verdünnten Probe wurden in eine 96-well Platte pipettiert. Zum Start der Reaktion wurde nun allen gefüllten Wells jeweils 100 μl einer Mischung aus BCA Reagent A und 4 % Kupfersulfat (Verhältnis 49+1) zugegeben. Dann wurde die 96-well Platte für 30 Min. bei 80°C inkubiert. Die Bestimmung der Farbintensität fand bei 550nm statt. Durch die Messwerte der Standardreihe kann das Programm KCjunior Win (BioTek Instruments) mithilfe linearer Regression eine Eichkurve erstellen, anhand derer man die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmen konnte. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.2.9 Gelelektrophorese / Westernblot

2.2.9.1 SDS-Polyacrylamidgele gießen

Die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele ist aus Tabelle 7 zu entnehmen. Bei dem Vorbereiten von Trenn- und Sammelgel ist zu beachten, dass die Polymerisation mit der Zugabe von APS und Temed beginnt, weshalb diese beiden Substanzen erst direkt vor dem Eingießen des Gels in die Glasplatten hinzugegeben werden dürfen. Die 1mm Glasplatten (BioRad) werden mit 70 % Ethanol gereinigt und danach in den Casting Frame eingespannt und in den Casting Stand geklemmt. Das Trenngel wird in die Gelplatte hineingegossen und mit Isopropanol überschichtet, um die Trenngelschicht zu begradigen. Nach Aushärten des Trenngels wird das Isopropanol verworfen und der Raum oberhalb des Trenngels mit Aqua bidest gespült. Das Sammelgel wird nun bis zur Glaskante eingegossen und danach ein Kamm (10 well, 1,0 mm) in das noch flüssige Sammelgel eingesteckt. Danach lässt man das Sammelgel aushärten.

Tabelle 7 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Trenngel (12%):	33% (v/v) Aqua bidest.
	25% (v/v) Trenngelpuffer (1,5M Tris-HCl pH 8,3 + 0,4% SDS)
	41,7% (v/v) Acrylamid-30%
	0,33% (v/v) APS-10%
	0,077% (v/v) Temed
Sammelgel (4%):	60% (v/v) Aqua bidest
	25% (v/v) Sammelgelpuffer (0,5M Tris-HCl pH 6,8 + 0,4% SDS)
	15% (v/v) Acrylamid-30%
	0,5% (v/v) APS-10%
	0,2% (v/v) Temed.

2.2.9.2 Probenvorbereitung

Die Proben wurden mit Roti-Load 4-fach in einem Verhältnis 1:3 verdünnt. Die so erhaltenen Mischungen aus Probe und Roti-Load 1-fach wurden bei 99 °C und 1400 rpm für fünf Min. in einem Thermomixer denaturiert. Durch das im Roti-Load enthaltene SDS wurden die Proteine maximal negativ geladen. Das im Roti-Load enthaltene β -Mercaptoethanol sorgte für eine Trennung der Disulfidbrücken. Dies führte zusammen mit

der Denaturierung zu einer Linearisierung der Proteine. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert, damit sie vollständig abpipettiert werden konnten.

2.2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Beim SDS-PAGE wird ein hochvernetztes Polyacrylamidgel verwendet. Durch eine angelegte Spannung wandern die, durch das SDS negativ geladenen Proteine, durch das Gel. Hierbei werden sie durch das Polyacrylamidgel ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Das Gel entsteht durch eine Polymerisation von Monomeren. Die Porengröße wird durch den Gehalt an Polyacrylamid im Gel bestimmt. Das im Gel enthaltene SDS sorgt als starkes negativ geladenes Detergens dafür, dass die Proteine komplett entfaltet bleiben und ihre eigentliche Ladung maskiert wird, da sie durch das SDS maximal negativ geladen werden. Proteine mit gleichem Molekulargewicht laufen mit gleicher Geschwindigkeit durch das Gel, da sie ungefaltet dieselbe Größe haben und gleich viel SDS binden. Im SDS-PAGE werden größere Proteine aufgrund der Porengröße stärker abgebremst, daher laufen sie langsamer durch das Gel als kleine Proteine.

Die SDS-PAGE wurde mit dem oben beschriebenen Trenngel mit 12 % Acrylamid, sowie dem Sammelgel mit 4 % Acrylamid durchgeführt. Die Gele wurden in die Mini-Protean Tetra Cell eingespannt und die Kammer mit Lämmli-Puffer gefüllt, wobei der Assembly Teil zwischen den beiden Gelen oder dem Gel und dem Buffer Dam vollständig gefüllt wurde. Danach wurde der Mini Tank soweit mit Lämmli-Puffer gefüllt, dass die untere Elektrode (Anode) vollständig im Puffer versenkt war. Dann wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Durch den Glycerin-Anteil im Roti Load, hatten die Proben eine höhere Dichte als der Puffer und sanken gut in die Taschen ein. Als Marker zur Größenbestimmung wurden jeweils 3,5 µl Magic Mark XP Western Standard (verdünnt 1:5 in Roti-Load 1-fach) beziehungsweise 3,5µl Peq-GOLD Protein-Marker IV verwendet. Nach Verschließen der Kammer wurde eine Stromstärke von 24 mA pro Gel angelegt. Die Laufzeit lag bei ca. 1 h und 40 Min.. Beendet wurde die SDS-PAGE, wenn die blaue Lauffront des Roti-Load unten aus dem Gel austrat. Die im Trenngel enthaltenen Proteine wurden mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert.

2.2.9.4 Western Blot

Beim Western Blot werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und dann spezifische Proteine immunodetektiert. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgte bei 47mA/Membran. Hierfür wurde die TE 77 ECL Semi-Dry Transfer Unit verwendet. Die Anordnung in der Semi-Dry Transfer Unit erfolgte von unten nach oben wie folgt: Einmal Filterpapier mit Blotpuffer A, einmal Filterpapier mit Blotpuffer B, dann die Immobilon Transfer Membran gefolgt von dem Gel aus der SDS-Page, abschließend noch zwei Filterpapiere mit Blotpuffer C. Die Transfer Membran wurde vorher in Methanol aktiviert. Für 45 Min. wurde dann eine Stromstärke von 47 mA pro Gel angelegt. Nach dem Transfer wurde die Membran für mindestens 1 h in PBS-Tween (0,075 %) + 5 % Milchpulver geblockt. Dadurch wurde die Membran vollständig mit Protein gesättigt um unspezifische Antikörperbindungen verhindert. Danach wurde über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden Primärantikörper in PBS-Tween (0,075 %) + 5 % Milchpulver inkubiert. Um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran danach 3x für 10 Min. mit PBS-Tween (0,075 %) gewaschen. Der Gebundene Primärantikörper wurde mit einem gegen den Fc-Teil gerichteten POD-gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000 in PBS-Tween (0,075 %) + 5 % Milchpulver, 1h bei RT) detektiert. Danach wurde erneut 3x 10 Min. mit PBS-Tween (0,075 %) gewaschen. Die Visualisierung erfolgte mit 2ml/Membran des Substrats Luminata™ Forte, die Chemilumineszenz wurde mit der Image Quant LAS 4000 CCD-Kamera detektiert.

2.2.9.5 Membran von Western-Blots stripfen

Um auf einer Membran weitere Proteine zu detektieren, müssen bereits gebundene Antikörper entfernt werden. Hierzu wurden Membranen für 30 Min. bei 37°C in Stripping Puffer (s.S.18) inkubiert, 3x in PBS-Tween (0,075%) für 10 Min. gewaschen, erneut für 1h in PBS-Tween (0,075 %) + 5 % Milchpulver geblockt und weiter bearbeitet wie in Kapitel 2.2.9.4.

2.2.9.6 Quantifizierung von Western-Blots mittels ImageJ

Zur densitometrischen Auswertung der Bandenintensität werde das Programm ImageJ verwendet.

2.2.10 Immunfluoreszenz (IF)

Die IF dient dazu, Proteine innerhalb der Zelle mithilfe von fluoreszierenden Antikörpern sichtbar zu machen. Hierfür wurden LCLs gezählt, bei 300 g und RT für 10 Min. zentrifugiert und das Zellpellet in frischem RPMI Medium resuspendiert, so dass sich eine Konzentration von 10^6 /ml ergab. 300 μ l dieser Zellsuspension wurden nun auf ein poly-L-Lysin Slide 25 x 75 x 1,0 mm pipettiert und dann für 15 Min. bei 37 °C inkubiert, damit sich die Zellen an dem Objektträger anheften. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium, sowie die nicht angehefteten Zellen abgewaschen, indem den Objektträger einmal in ein Bad mit PBS getaucht wurde. Danach wurde der Objektträger zur Fixierung für 15 Min. in 4 % Paraformaldehyd (in PBS) gebadet. Als nächstes wurde der Objektträger 3x mit PBS gewaschen. Zur Zellpermeabilisierung wurde der Objektträger nun für 10 Min. in 0,5 % Triton (in PBS) gebadet. Danach wurde der Objektträger erneut 3x in PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde der Objektträger nun 1 h in Roti-Immunoblock bei RT geblockt. Anschließend wurde der Objektträger bei 4 °C über Nacht mit den Primärantikörpern (in Roti-Immunoblock) inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Objektträger 3x 10 Min. unter Schwenken mit PBS gewaschen. Danach wurde er bei RT für 1 h mit dem Sekundärantikörper (in Roti-Immunoblock) inkubiert. Hierbei ist es wichtig zu beachten, dass alle bei der IF verwendeten Sekundärantikörper lichtempfindlich sind. Ab diesem Schritt ist deshalb eine direkte Lichteinstrahlung zu vermeiden. Nach der Inkubationszeit mit dem Sekundärantikörper wird der Objektträger erneut 3x 10 Min. mit PBS unter Schwenken gewaschen. Dann wurde T-förmig Mowiol 4-88 mit 10 μ g / ml Hoechst 33342 auf ein Deckglas aufgetragen. Dies wurde nun auf den Objektträger gegeben, um die Zellen endgültig zu fixieren. Der Objektträger wurde danach zum Trocknen für 72 h ins Dunkle gestellt. Danach wurde mit Ethanol das überschüssige Mowiol entfernt.

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am Axiovert 200-Mikroskop, die Fotos wurden mithilfe der Software Axio Vision 40 (Version 4.8) aufgenommen. Für die 100x Vergrößerungen wurde als Immersionsöl Immersol 518F verwendet.

Bei der Ko-Färbung von TDP-43 und TIA-1 wiesen die Sekundärantikörper (Alexa 488 Donkey Anti-Goat und Alexa 546 Goat Anti-Rabbit (Invitrogen)) eine mögliche Kreuzreaktivität auf. Um diese zu vermeiden, wurden nach der Inkubation mit den Primärantikörpern die Zellen wie oben beschrieben erst mit 3x 10 Min. mit PBS gewaschen danach für 1 h mit Alexa 488 Donkey anti Goat (Invitrogen) in Roti-Immunoblock inkubiert. Danach wurden die Objektträger 3x mit PBS gewaschen und danach für zwei h mit Roti-Immunoblock erneut geblockt. Erst danach wurden sie für 1 h mit Alexa 546 Goat Anti-

Rabbit (Invitrogen) in Roti-Immunoblock inkubiert. Danach wurden die Objektträger erneut 3x mit PBS gewaschen und danach wie oben beschrieben mit Mowiol mit 10 µg / ml Hoechst 33342 endgültig fixiert.

3 Ergebnisse

3.1 Western Blot

3.1.1 Auftrennung der EBV-transformierten humanen B-Lymphozyten in Zytoplasma und Nukleus.

Um eine Translokation des TDP-43 von dem Nukleus in das Zytoplasma nach Hitzestress nachzuweisen, musste erst eine Methode zur Isolierung der Zell-Fraktionen etabliert werden. Hierfür wurde eine Gradientenzentrifugation mit dem Röntgenkontrastmittel Iodixanol in unterschiedlicher Verdünnung mit PBS verwendet. Es galt abzuklären, ob die Fraktionen, die man durch die Auftrennung erhielt, möglichst nicht durch Proteine der anderen Fraktion verunreinigt wurden. Fraglich war auch, ob der Hitzestress die nukleäre Membran destabilisiert und danach noch eine saubere Auftrennung der Fraktionen möglich war. Um dies zu überprüfen, wurden aus zwei Zelllinien (ALS/TDP+ #1 und Gesund #1) vor und nach Hitzestress, mit der Gradientenzentrifugation die zytoplasmatischen und nukleären Proteine isoliert. Die Proben wurden danach mittels Gelelektrophorese und Western-Blot aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Zur Bestimmung der Zytoplasmafraktion diente GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), während die Nukleusfraktion mittels p84 (Nuklear-Matrix-Protein 84) nachgewiesen wurde. Wie in Abbildung 4 zu sehen, zeigen die jeweiligen Fraktionen keine Verunreinigung. Die Zytoplasmafraktionen weisen eine Bande bei 40 kDa auf, die GAPDH entspricht. Lediglich die Zytoplasmafraktion von Gesund #1 ohne Hitzestress zeigt eine leichte nukleäre Verunreinigung, die als schwache Bande auf Höhe des Kernmarkers p84 zu sehen ist. Diese Bande entspricht einer Intensität von 2 % (quantifiziert mit ImageJ) der dazugehörigen Zytoplasmafraktion. Während die Nukleusfraktionen ausschließlich eine Bande bei 84 kDa aufweisen, die p84 entspricht. Als Positivkontrolle (Postivko.) wurde ein Komplettlysate mit RIPA-Puffer der Zelllinie ALS/TDP+ #1 aufgetragen, die sowohl eine positive Bande GAPDH als auch für p84 zeigt. Auch ist die Auftrennung mittels Gradientenzentrifugation nicht durch den Hitzestress beeinflusst. Wie in Abbildung 4 zu erkennen, ist auch bei den Proben mit Hitzestress (+ HS) keine Verunreinigung zu sehen.

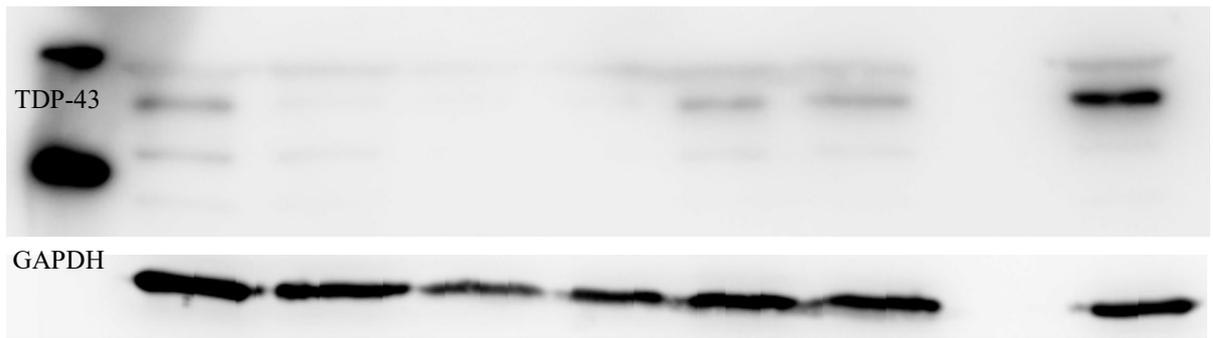
3.1.2 Untersuchung von TDP-43 im Zytoplasma und Nukleus vor und nach Hitzestress

Um zu erfahren, ob durch den Hitzestress eine Translokation des TDP-43 aus dem Nukleus in das Zytoplasma stattfand, wurden die Zellen vor, direkt nach und 1, 2, 3 und 5 h nach dem Hitzestress mittels Gradientenzentrifugation aufgetrennt. Der Hitzestress dauerte 1 h bei 42 °C. Da man nicht nur untersuchen wollte, ob es in den Zellen zu einer Translokation kam, sondern auch wissen wollte, ob es dabei Unterschiede zwischen den Zellen von Patienten mit ALS und einer gesunden Kontrolle gab, wurden alle drei Zelllinien (ALS/TDP #1, sALS #1, Gesund #1) untersucht. Es wurden von allen Proben gleiche Proteinmengen mittels Gelelektrophorese und Westernblot untersucht. Die Westernblots wurden auf TDP-43, p-84 und GAPDH untersucht, wobei p84 und GAPDH als Ladekontrolle für die Nukleus- und Zytoplasmafraktionen diente. Als Positivkontrolle (Positivko.) diente in allen Blots ein Komplettlysate der Zelllinie ALS/TDP+ #1 mittels RIPA-Puffer.

3.1.2.1 Zytoplasmafraktionen im Western-Blot vor und nach Hitzestress

In Abbildung 5 sind die Western-Blots der Zytoplasmafraktionen der drei untersuchten Zelllinien (ALS/TDP+ #1, sALS #1 und Gesund #1) zu sehen. Es ist zu erkennen, dass in keiner der drei Zelllinien TDP-43 direkt nach dem Hitzestress im Western-Blot nachweisbar war. Jedoch zeigte sich für jede Zelllinie in ihrer Zytoplasmafraktion vor dem Hitzestress (ohne HS) eine deutliche Bande für TDP-43. In der Zelllinie Gesund #1 war bereits 1 h nach dem Hitzestress, sowie zu allen darauf folgenden Messzeitpunkten wieder TDP-43 im Western-Blot nachweisbar. In der Zelllinie ALS/TDP+ #1 war das TDP-43 allerdings erst nach 3 h wieder im Zytoplasma nachweisbar. Zu den Messzeitpunkten direkt nach, sowie nach 1 und 2 h Erholung nach Hitzestress war hier im Western-Blot kein TDP-43 nachweisbar. Die Zelllinie sALS #1 zeigte erst zum Zeitpunkt 5 h nach Hitzestress wieder eine Bande für TDP-43. Zu den Messzeitpunkten direkt nach, 1, 2 und 3 h nach Hitzestress waren keine Banden im Western Blot nachweisbar.

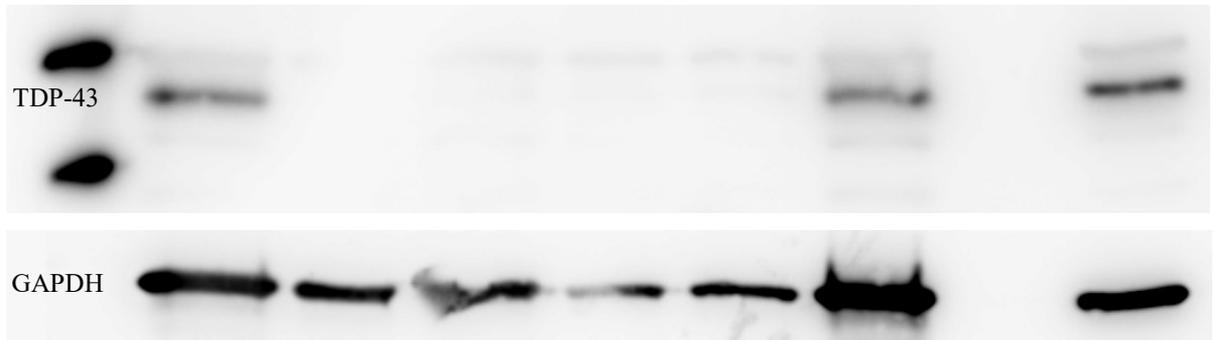
Zytoplasmafraktionen der Zelllinien vor, direkt nach, 1h, 2h, 3h, und 5h nach Hitzestress (HS)



ALS/TDP+ #1

Positivko.

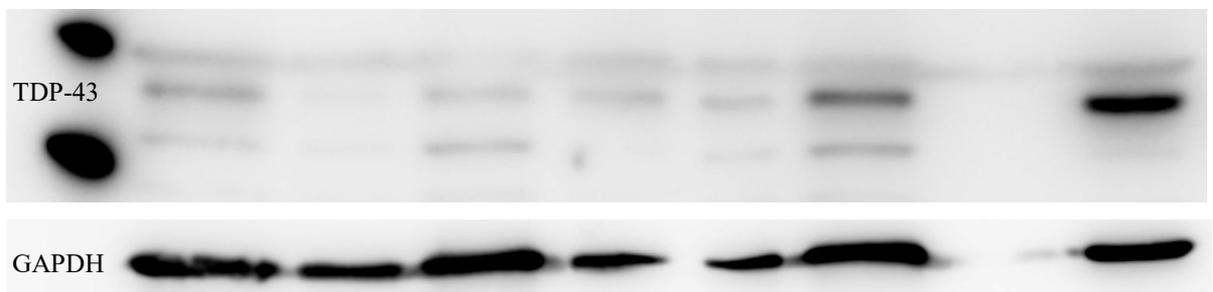
Ohne HS HS + 0h HS + 1h HS + 2h HS + 3h HS + 5h Leer



sALS #1

Positivko.

ohne HS HS + 0h HS + 1h HS + 2h HS + 3h HS + 5h Leer



Gesund #1

Positivko.

ohne HS HS + 0h HS + 1h HS + 2h HS + 3h HS + 5h Leer

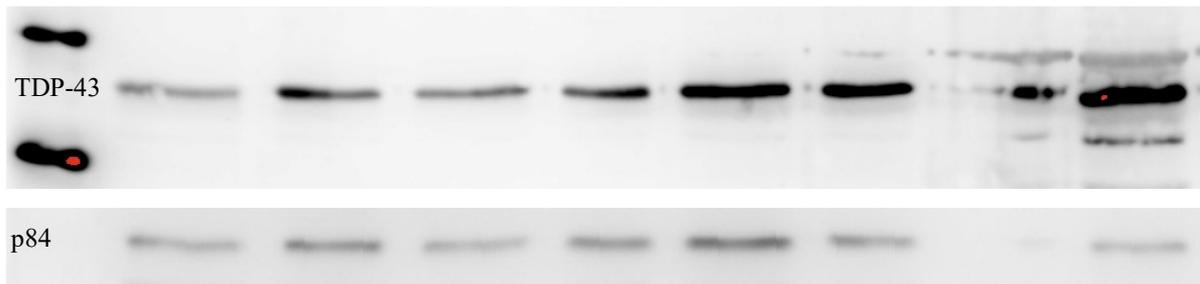
Abbildung 5

Abbildung 5: TDP-43 (TAR DNA binding Protein 43) in den Zytoplasmafraktionen EBV-transformierter humaner B-Lymphozyten nach Hitzestress. Die verwendeten Zelllinien wurden für 1 h einem Hitzestress von 42 °C ausgesetzt. Es wurden vor, direkt nach, 1, 2, 3 und 5 h nach dem Hitzestress (ohne HS, HS+0h, HS+1h, HS+2h, HS+3h, HS+5h) Zellen entnommen und die zytoplasmatischen und nukleären Proteine isoliert. Als Positivkontrolle (Positivko.) wurde ein Komplettlysate verwendet. In der Abbildung sieht man, dass das zytoplasmatische TDP-43 bei allen drei Zelllinien direkt nach dem Hitzestress (HS+0h) nicht mehr nachweisbar ist. Bei der Zelllinie der gesunden Kontrolle (Gesund #1) war TDP-43 bereits 1 h nach Hitzestress (HS+1h) wieder nachweisbar. Bei den Zelllinien der Patienten mit ALS (ALS/TDP+ #1 und sALS #1) war TDP-43 erst nach 3 bzw. 5 h wieder im nachweisbar. Die Beladung der Blots wurde mit GAPDH kontrolliert. *Verwendete Antikörper:* Primärantikörper: Rabbit Anti-TARDBP (1:1000), Mouse Anti-GAPDH (1:1000) und Mouse Anti-Nuclear Matrix Protein p84 (1:1000). Sekundärantikörper: Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins/HRP (1:2000), Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunglobulins/HRP (1:2000).

3.1.2.2 Nukleusfraktionen im Western-Blot vor und nach Hitzestress

In Abbildung 6 sind die Western-Blots der Nukleusfraktionen der drei untersuchten Zelllinien (ALS/TDP+ #1, sALS #1 und Gesund #1) zu sehen. Es ist zu erkennen, dass im Gegensatz zu den Zytoplasmafraktionen in Abbildung 5, hier zu jedem Messzeitpunkt in allen drei Zelllinien eine Bande nachweisbar ist. Bei der Nukleusfraktion der Zelllinie sALS #1 zeigt sich eine Reduktion der Intensität der Banden nach dem Hitzestress, gegenüber der Bande vor dem Hitzestress. Erst die Bande zum Messzeitpunkt 5 h nach Hitzestress zeigt wieder eine höhere Intensität. Bei den Nukleusfraktionen der Zelllinien ALS/TDP+ #1 und Gesund #1 kommt es zu keinem Abfall der Intensität der Banden nach dem Hitzestress. Bei diesen beiden Zelllinien ist jedoch in den Nukleusfraktionen ein leichter Anstieg der Bandenintensität zu den Zeitpunkten 3 und 5 h nach Hitzestress zu sehen.

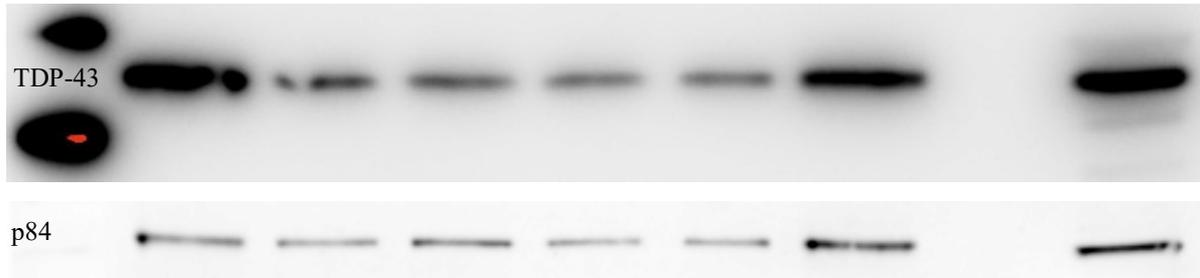
Nukleusfraktionen der Zelllinien vor, direkt nach, 1h, 2h, 3, und 5h nach Hitzestress (HS)



ALS/TDP+ #1

Positivko.

Ohne HS HS + 0h HS + 1h HS + 2h HS + 3h HS + 5h Leer



sALS #1

Positivko.

ohne HS HS + 0h HS + 1h HS + 2h HS + 3h HS + 5h Leer



Gesund #1

Positivko.

ohne HS HS + 0h HS + 1h HS + 2h HS + 3h HS + 5h Leer

Abbildung

Abbildung 6: TDP-43 (TAR DNA binding Protein 43) in den Nukleusfraktionen EBV-transformierter humaner B-Lymphozyten nach Hitzestress. Die verwendeten Zelllinien wurden für 1 h einem Hitzestress von 42 °C ausgesetzt. Es wurden vor, direkt nach, 1, 2, 3 und 5 h nach dem Hitzestress (ohne HS, HS+0h, HS+1h, HS+2h, HS+3h, HS+5h) Zellen entnommen und mithilfe eines Gradienten die zytoplasmatischen und nukleären Proteine isoliert. Als Positivkontrolle (Positivko.) wurde ein Komplettlysat verwendet. In der Abbildung ist zu erkennen, dass TDP-43 zu jedem Zeitpunkt im Nukleus aller drei Zelllinien nachweisbar ist. Lediglich in der Zelllinie des Patienten mit sporadischer ALS ohne bekannte TDP-43-Mutation (sALS#1) zeigte sich ein leichter Abfall der TDP-43-Konzentration im Western-Blot nach der Hitzestressexposition. Erst zum Zeitpunkt 5 h nach Hitzestress kommt es wieder zu einem Anstieg des TDP-43. In den Zelllinien des Patienten mit ALS und einer TDP-43-Mutation (ALS/TDP+ #1) und der gesunden Kontrolle (Gesund #1) zeigte sich kein Abfall des TDP-43, allerdings kommt es zu den Zeitpunkten 3 und 5 h nach Hitzestress zu einem Anstieg des TDP-43. Die Beladung der Blots wurde mit p84 kontrolliert. *Verwendete Antikörper:* Primärantikörper: Rabbit Anti-TARDBP (1:1000), Mouse Anti-GAPDH (1:1000) und Mouse Anti-Nuclear Matrix Protein p84 (1:1000). Sekundärantikörper: Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (1:2000), Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (1:2000).

3.2 Immunfluoreszenz-Färbungen

3.2.1 Bildung von Ablagerungen in LCLs nach Applikation von Hitzestress

Um zu überprüfen, ob TDP-43 durch die Applikation von Hitzestress in Ablagerungen rekrutiert wird, wurden die drei verwendeten Zelllinien (ALS/TDP+ #1, sALS #1, Gesund #1) für 1 h einem Hitzestress von 42 °C ausgesetzt. Es wurden im Anschluss Immunfluoreszenz-Färbungen auf TDP-43 (grün), sowie β -Tubulin (rot) zur Zytoplasmafärbung und Hoechst (blau) zur Nukleusfärbung durchgeführt. Es wurde für jede Zelllinie eine Zellfärbung als Kontrolle vor dem Hitzestress angefertigt, sowie Zellfärbungen direkt nach dem Hitzestress und nach einer Erholungszeit von 1, 2, 3 und 5 h. Diese sieht man in den Abbildungen 7.a-c. Hier ist zu erkennen, dass das TDP-43 ohne die Applikation von Hitzestress hauptsächlich nukleär und zu einem geringeren Teil auch zytoplasmatisch in allen drei Zelllinien vorliegt. Direkt nach dem Hitzestress bilden sich in allen drei Zelllinien TDP-43 enthaltende schollen- und punktförmige Ablagerungen (weiße Pfeile Abbildungen 7.a-c) aus. In der Zelllinie ALS/TDP+ #1 mit der N352S Mutation im TDP-43, zeigen sich besonders viele TDP-43 enthaltende Ablagerungen gegenüber den anderen beiden Zelllinien. In allen drei Zelllinien lösen sich diese Ablagerungen nach einer Erholungszeit wieder auf, wobei bei den Zelllinien sALS #1 und Gesund #1 bereits nach 1 h Erholungszeit keine Ablagerungen mehr zu sehen sind, während in der Zelllinie ALS/TDP+ #1 (N352S Mutation) zu diesem Zeitpunkt noch vereinzelt Ablagerungen zu sehen sind. Die meisten Ablagerungen haben sich bei allen Zelllinien am Zytoplasmasaum außerhalb des blau gefärbten Nukleus ausgebildet. Besonders bei der Zelllinie ALS/TDP+ #1 zeigen auch einige Ablagerungen Überlappungen mit der blauen Nukleusfärbung. In der Zelllinie ALS/TDP+ #1 scheint es mit dem Entstehen der Ablagerungen auch zu einer Umverteilung des TDP-43 in das Zytoplasma zu kommen. Nach der Auflösung der Ablagerungen, sieht man auch wieder eine Rückverteilung des TDP-43 in den Nukleus.

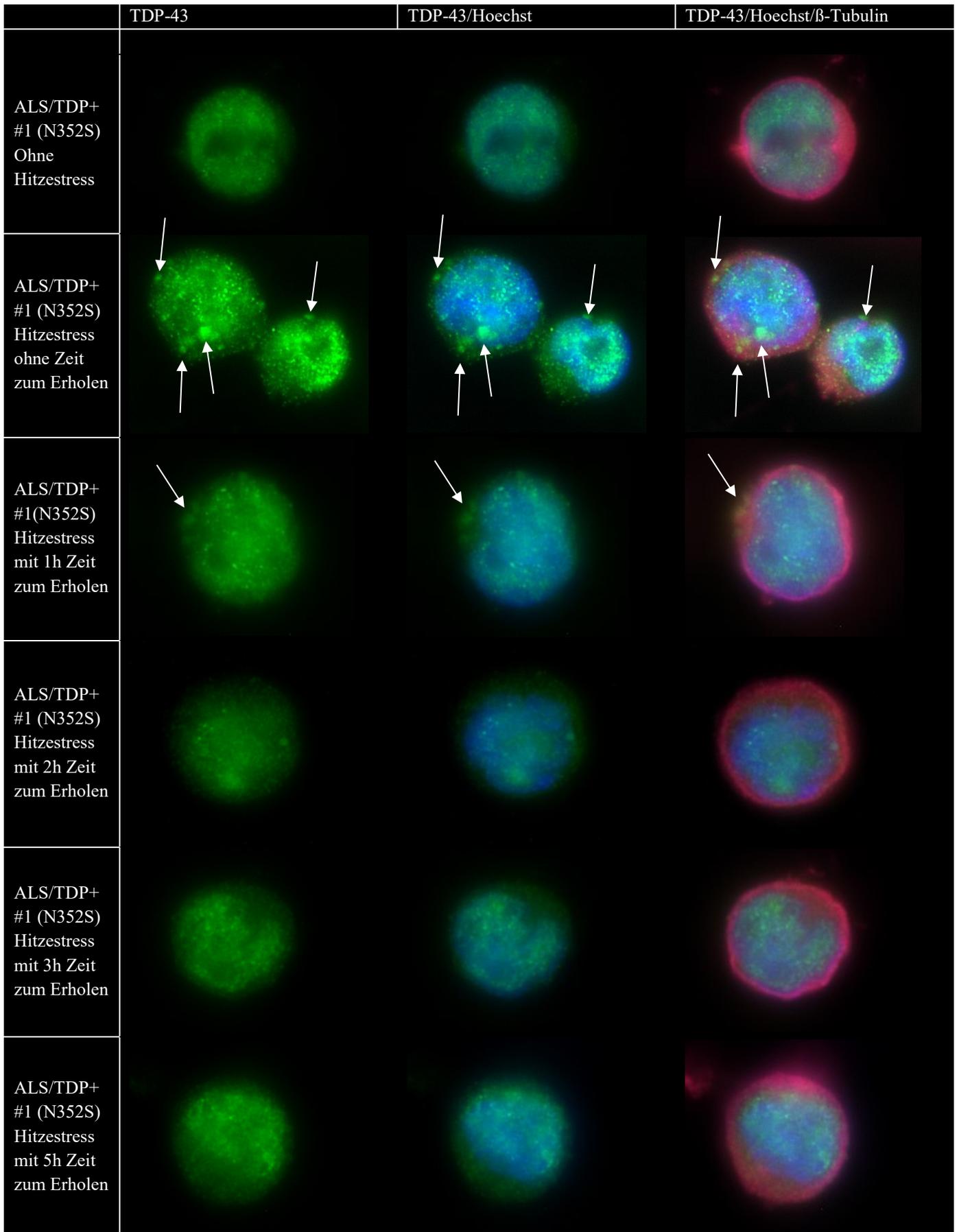


Abbildung 7.a

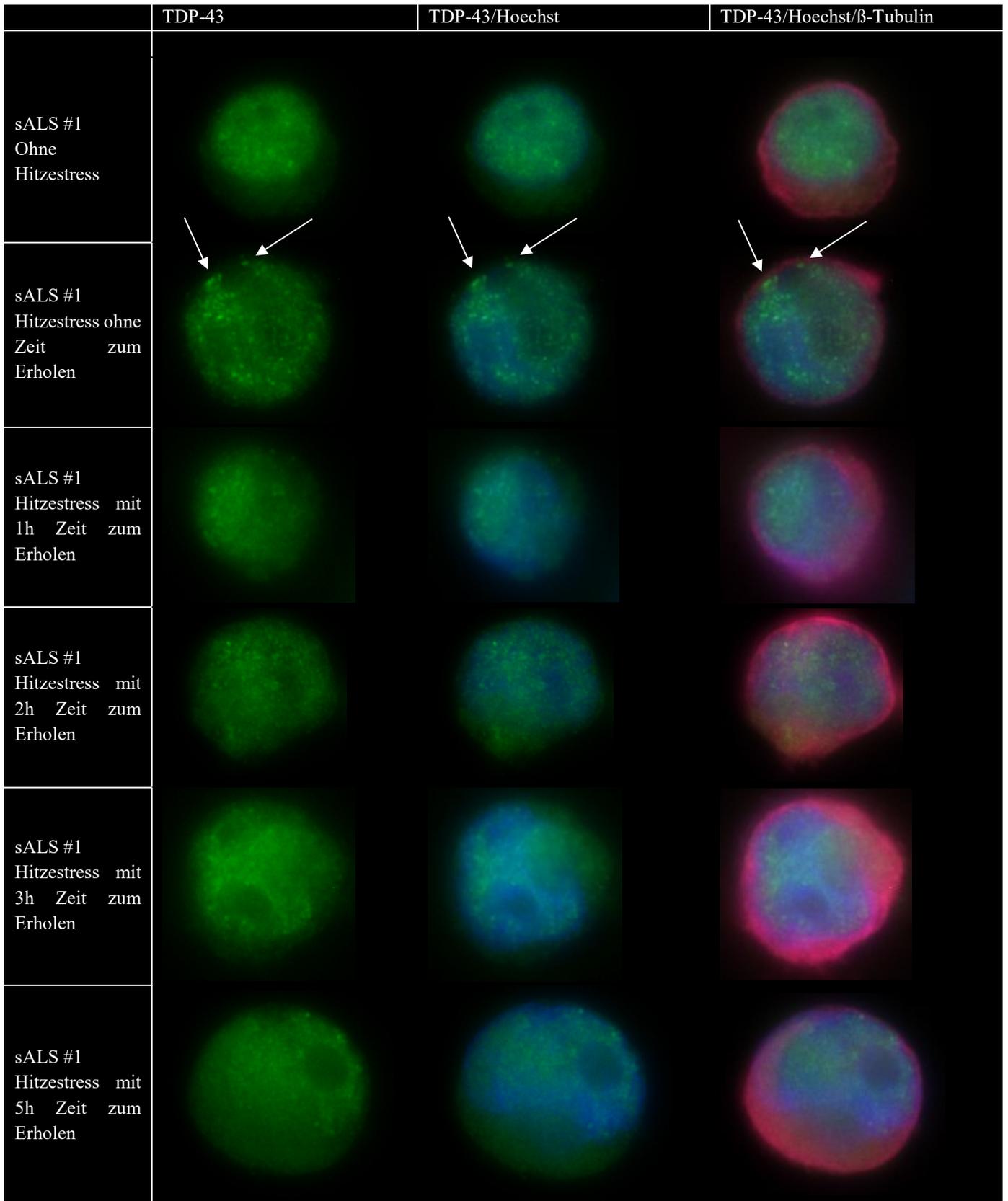


Abbildung 7.b

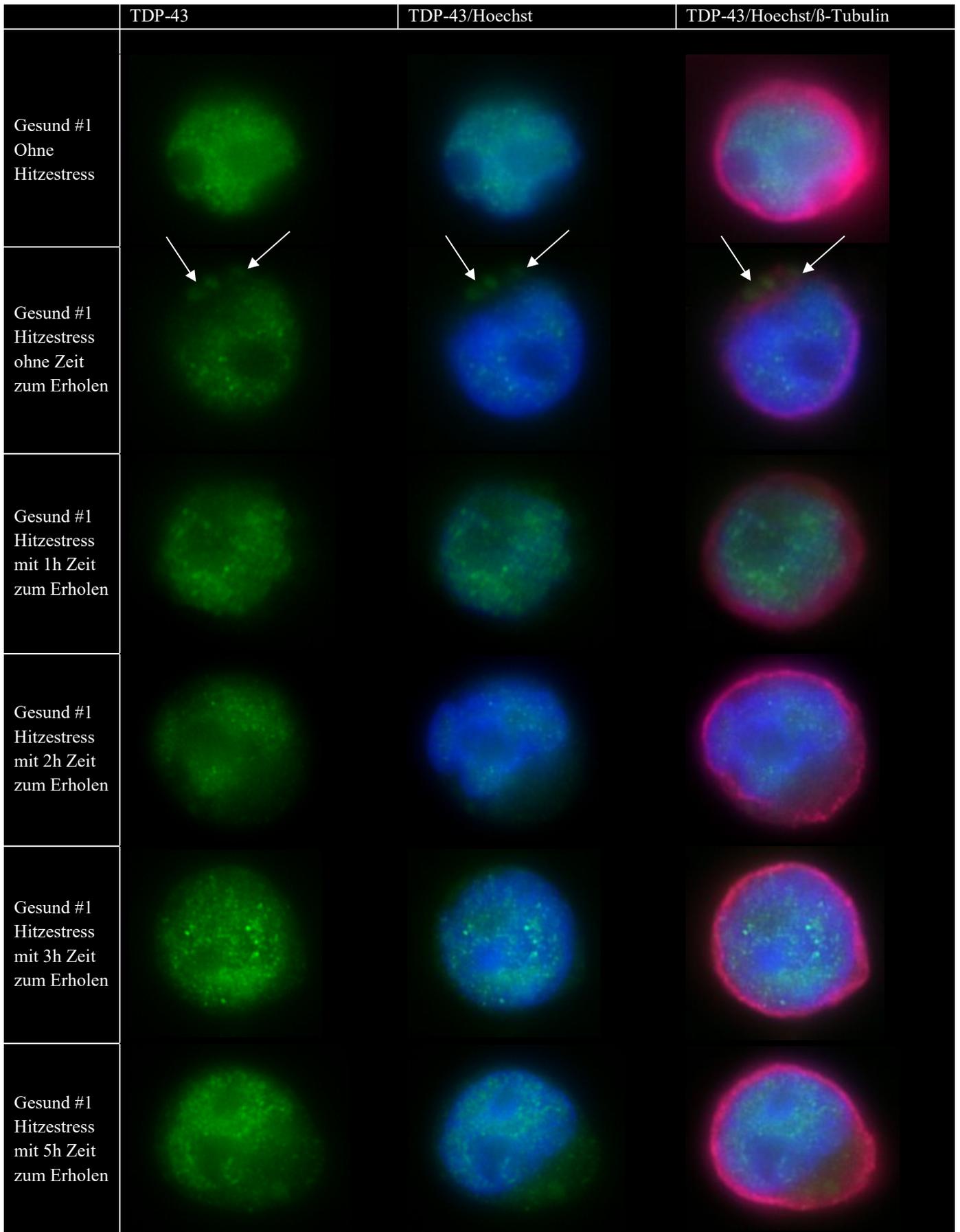


Abbildung 7c

Abbildung 7.a-c: Immunfluoreszenz-Färbung: Bildung von Ablagerungen in humanen EBV-transformierten B-Lymphozyten nach Applikation von Hitzestress.

Die verwendeten Zelllinien wurden für 1 h einem Hitzestress von 42 °C ausgesetzt. Es wurden Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen vor, direkt nach, sowie 1, 2, 3 und 5 h nach Hitzestress angefertigt. Auf den Abbildungen ist zu erkennen, dass sich direkt nach der Applikation von Hitzestress TDP-43 (TAR DNA binding Protein 43) enthaltende Ablagerungen (weiße Pfeile) in allen drei Zelllinien ausbilden. In den Zelllinien des Patienten mit sporadischer ALS ohne TDP-43-Mutation (sALS #1) und der gesunden Kontrolle (Gesund #1) zeigen sich bereits nach 1 h Erholungszeit keine Ablagerungen mehr. Im Gegensatz dazu sind zu diesem Zeitpunkt in der Zelllinie des Patienten mit einer N352S-Mutation im TDP-43 (ALS/TDP #1) noch Ablagerungen nachweisbar. Auch scheint diese Zelllinie direkt nach Applikation von Hitzestress mehr Ablagerungen aufzuweisen, als die anderen beiden Zelllinien. Außerdem scheint es durch die Ablagerungen in der Zelllinie ALS/TDP+ #1 zu einer Verlagerung des TDP-43 aus dem Nukleus in das Zytoplasma zu kommen. Diese scheint mit der Auflösung der TDP-43-positiven Ablagerungen wieder reversibel zu sein. *Farben:* Grün: TDP-43, Magenta: β -Tubulin zur Zytoplasmafärbung, Blau: Nukleus. *Verwendete Antikörper:* Primärantikörper: Rabbit Anti-TARDBP (1:300), Mouse Anti- β -Tubulin I, monoAB (1:300). Sekundärantikörper: Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (1:750), Cy 5 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (1:500). Hoechst 33342 zur Färbung des Nukleus. *Vergrößerung:* 100x auf allen Bildern.

3.2.2 Kolokalisation von TDP-43 und TIA-1

Zur genaueren Klassifizierung der Ablagerungen, die nach Applikation von Hitzestress in den Zelllinien auftraten, wurde eine Doppelfärbung von TDP-43 und TIA-1 durchgeführt. Die Immunfluoreszenz-Färbung wurde bei der Zelllinie ALS/TDP+ #1 (N352S Mutation) durchgeführt, da diese in den vorangegangenen Versuchen die meisten Ablagerungen aufwies. Es wurde sowohl vor, als auch direkt nach Applikation von Hitzestress eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Auf Abbildung 8 ist zu sehen, dass sowohl TDP-43 (gelb), als auch TIA-1 (grün), vor der Applikation von Hitzestress in keinen Ablagerungen rekrutiert vorliegen. Wobei TDP-43 hauptsächlich im Nukleus und TIA-1 gleichmäßig in der Zelle verteilt vorliegt. Nachdem die Zellen 1 h bei 42 °C einem Hitzestress ausgesetzt waren, zeigt sich für TDP-43 und TIA-1 eine Bildung von Ablagerungen (weiße Pfeile). Die beiden Proteine scheinen in dieselben, im zytoplasmatischen Saum der Zellen lokalisierten, Ablagerungen rekrutiert zu werden.

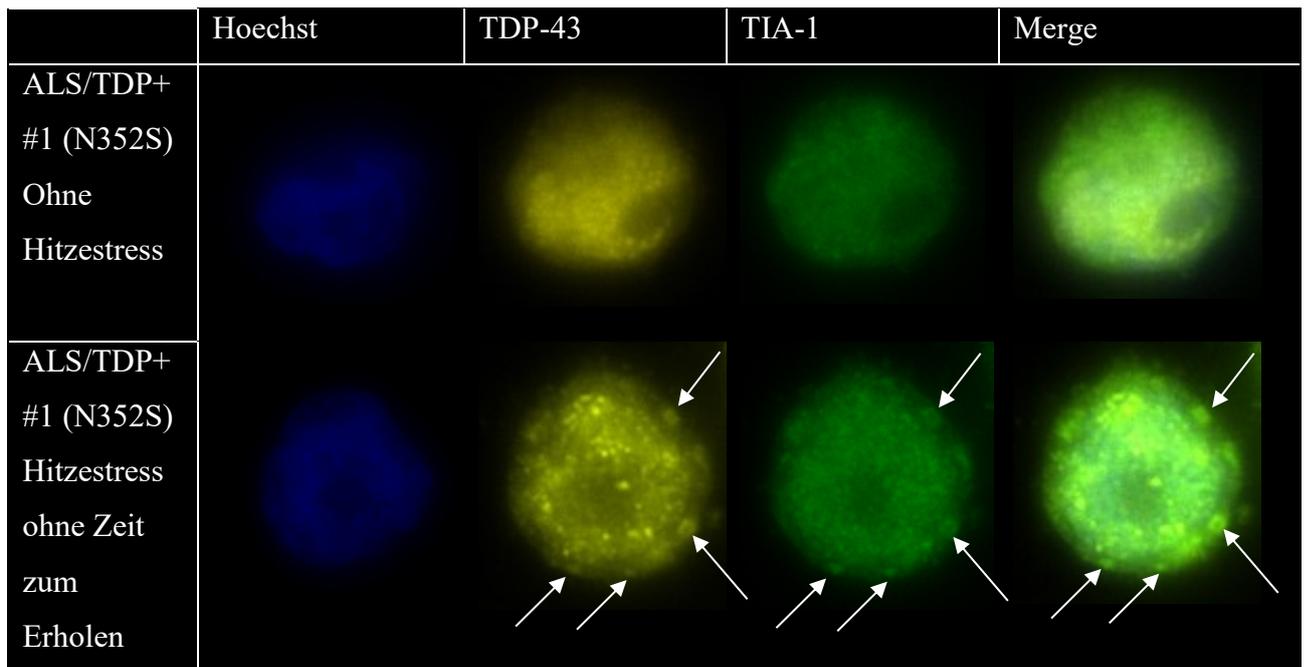


Abbildung 8: Immunfluoreszenz-Färbung: Kolokalisation von TDP-43 (TAR DNA binding Protein 43) und TIA-1 (T-cell intracellular antigen 1): Die Zelllinie ALS/TDP #1, eines Patienten mit einer TDP-43 Mutation (N352S), wurde vor (ohne Hitzestress) und nach einem Hitzestress (Hitzestress ohne Zeit zum Erholen) auf eine Kolokalisation von TDP-43 (Gelb) und TIA-1 (Grün) untersucht. Bei TIA-1 handelt es sich um ein Protein, das Bestandteil von Stressgranula ist. Es ist zu sehen, dass sich die TDP-43 haltigen Ablagerungen, die sich nach der Applikation von Hitzestress ausbilden, scheinbar mit TIA-1 kolokalisieren (weiße Pfeile). *Farben:* Gelb: TDP-43, Grün: TIA-1, Blau: Nukleus. *Verwendete Antikörper:* Primärantikörper: Rabbit Anti-TARDBP (1:300), Goat Anti-TIA-1 (1:100). Sekundärantikörper: Alexa 546 Goat Anti-Rabbit (1:500), Alexa 488 Donkey Anti-Goat (1:750). Blau: Hoechst 33342 zur Färbung des Nukleus. *Vergrößerung:* 100x auf allen Bildern.

4 Diskussion

4.1 Etablierung des Modells

Mittels der Immunfluoreszenz-Färbungen (siehe Abbildung 7) konnte gezeigt werden, dass sich durch Applikation von Hitzestress eine Rekrutierung von TDP-43 in schollen- und punktförmige Ablagerungen auslösen lässt, die sich im weiteren Verlauf wieder auflösen. Dies entspricht weitestgehend dem zu erwartenden Ergebnis, da bereits bekannt war, dass es bei LCLs durch oxidativen Stress zu einer Rekrutierung von TDP-43 in Stressgranula kommt (McDonald et al. 2011). Diese Ablagerungen waren, wie in Abbildung 7 zu sehen, hauptsächlich im zytoplasmatischen Saum, außerhalb des blau gefärbten Nukleus lokalisiert. Allerdings sieht man vor allem in Abbildung 7.a bei der Zelllinie ALS/TDP+ #1 einige nukleäre TDP-43-positive Ablagerungen. Da die mit IF gefärbten Zellen jedoch lediglich mit dem Lichtmikroskop untersucht wurden, war es nicht möglich, die genaue Lokalisation der Ablagerungen innerhalb der Zellen zu bestimmen. Hier wäre es sinnvoll gewesen, eine konfokale Mikroskopie durchzuführen, um die genaue Lokalisation der TDP-43-positiven Ablagerungen zu bestimmen. Dies wäre vor allem wichtig, da hierzu unterschiedliche Angaben in der Literatur existieren. So haben mehrere Arbeitsgruppen durch Applikation von unterschiedlichen Stressoren die Rekrutierung von TDP-43 in zytoplasmatische Stressgranula auslösen können (Colombrita et al. 2009) (Dewey et al. 2011) (McDonald et al. 2011), während eine Arbeitsgruppe in HeLa-Zellen mittels Hitzestress eine Rekrutierung von TDP-43 in nukleär lokalisierte Ablagerungen auslösen konnte (Udan-Johns et al. 2014).

Um die sich nach Hitzestress bildenden Ablagerungen weiter zu untersuchen, wurde eine Doppelfärbung mit TDP-43 und TIA-1 durchgeführt. TIA-1 dient als Marker für Stressgranula (Gilks et al. 2004) (Anderson and Kedersha 2008) (Dewey et al. 2012). In Abbildung 8 ist zu sehen, dass TDP-43 hauptsächlich nukleär und TIA-1 gleichmäßig in der Zelle verteilt vorliegt. Nach Applikation von Hitzestress bilden beide Aggregate aus, die eine Kolokalisation aufweisen, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich bei den entstehenden Ablagerungen um Stressgranula handelt. Auch hier ist anzumerken, dass die mit IF gefärbten Zellen lediglich lichtmikroskopisch untersucht wurden, weshalb eine Kolokalisation beider Proteine nicht sicher gezeigt werden konnte. In weiterführenden Versuchen wäre es daher sinnvoll, auch hier eine konfokale Mikroskopie durchzuführen, um die Kolokalisation sicher zu zeigen.

Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war es auch, semiquantitativ mittels Western Blot, zu überprüfen, ob man in den LCLs durch die Applikation von Hitzestress eine Umverteilung

des TDP-43 aus dem Nukleus in das Zytoplasma auslösen kann. Hierzu wurde zuerst eine Methode zur sauberen Trennung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Mit der verwendeten, auf Iodixanol basierenden Gradientenzentrifugation (Poglitsch et al. 2011), konnte eine saubere Auftrennung der beiden Fraktionen erreicht werden. In Abbildung 4 ist zu sehen, dass es lediglich zu minimalen Verunreinigungen der Fraktionen kommt. Die von mir angestrebte Etablierung dieses Zellmodells und der dazugehörigen Methoden in meiner Arbeitsgruppe kann daher als erfolgreich betrachtet werden. Natürlich muss man die Signifikanz dieses Zellmodells in Bezug auf die Pathophysiologie der ALS relativieren, da es sich bei den untersuchten Zelllinien um LCLs handelt. Diese eignen sich zwar möglicherweise, um Grundzüge der Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen zu untersuchen, entsprechen aber natürlich nicht den komplexen Prozessen im zentralen Nervensystem.

4.2 TDP-43 Translokation

In Abbildung 7.a ist zu erkennen, dass die Zelllinie ALS/TDP+ #1 nach dem Hitzestress initial eine Umverteilung des TDP-43 in das Zytoplasma zu zeigen scheint. Diese geht mit der Entstehung der TDP-43-positiven Ablagerungen einher. Nach Auflösung der Ablagerungen ist auch eine Rückverteilung des TDP-43 in den Nukleus der Zellen zu sehen. Im Gegensatz hierzu ist die pathologische Leerung des Nukleus und zytoplasmatische Anreicherung des TDP-43 der TDP-43-Proteinopathien ein irreversibler Prozess (Neumann et al. 2006). Es handelt sich bei der hier gezeigten reversiblen Umverteilung wahrscheinlich um eine physiologische Reaktion auf den applizierten Stress, die dafür sorgt, dass sich TDP-43 in seiner Funktion als Shuttleprotein (Ayala et al. 2008) im Zytoplasma anreichert. Allerdings wäre auch vorstellbar, dass man durch wiederholte Applikation von Stress oder eine länger andauernde Stressexposition eine dauerhafte und pathologische Umverteilung des TDP-43 in das Zytoplasma erreichen könnte. Dies würde die oben erwähnte „Stressgranulahypothese“ (Dewey et al. 2012) unterstützen. Eine Arbeitsgruppe konnte bereits Ergebnisse zeigen, die in diese Richtung deuten. Sie konnten, nach einer dreißig Stunden dauernden Stressexposition mittels Paraquat die zu erwartenden TDP-43 enthaltenden Stressgranula nachweisen, die sich nach einem Erholungszeitraum von sechs Stunden größtenteils wieder auflösten. Allerdings verblieben einige Aggregate, die nun negativ für Stressgranulamarker waren, sich jedoch positiv für TDP-43 und Ubiquitin färbten, was ein Merkmal der TDP-43-Proteinopathien ist (Parker et al. 2012). Die Tatsache, dass man die reversible Umverteilung des TDP-43 in das Zytoplasma, nur in der Zelllinie

mit der N352S Mutation im TDP-43 sehen kann und nicht in den anderen beiden Zelllinien (sALS #1 und Gesund #1) ist auch interessant, da eine Arbeitsgruppe im Zellmodell zeigen konnte, dass eine zytoplasmatische Anreicherung von mutiertem TDP-43 zytotoxische Effekte hat (Barmada et al. 2010). Dies wirft die Frage auf, ob die temporäre und reversible Anreicherung des mutierten TDP-43 ebenfalls einen zytotoxischen Effekt hat. Allerdings handelt es sich bei den hier vorgelegten Ergebnissen lediglich um Immunfluoreszenzfärbungen bei denen eine Umverteilung des TDP-43 nicht quantitativ beurteilt werden kann, weshalb zur weiteren Beurteilung der Umverteilung des TDP-43 eine Untersuchung mittels Western Blot durchgeführt wurde.

Nachdem der Iodixanol basierte Gradient zur Auftrennung der Zytoplasma- und Nukleusfraktionen etabliert wurde, konnten die drei Zelllinien (ALS/TDP+ #1, sALS #1 und Gesund #1) vor, direkt nach, 1, 2, 3 und 5 h nach Hitzestress untersucht werden. Da andere Arbeitsgruppen durch zellulären Stress eine Rekrutierung von TDP-43 in zytoplasmatische Stressgranula zeigen konnten (Colombrita et al. 2009) (Liu-Yesucevitz et al. 2010) (Freibaum et al. 2010) (Dewey et al. 2011) (McDonald et al. 2011), sowie eine Arbeitsgruppe in PBMCs von Patienten mit ALS bereits ohne Applikation von Stress ein erhöhtes Level an zytoplasmatischem TDP-43 im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen konnte (De Marco et al. 2011), wurde besonders für die beiden ALS-Zelllinien (ALS/TDP+ #1 und sALS) eine Umverteilung des TDP-43 aus dem Nukleus in das Zytoplasma nach der Applikation von Hitzestress erwartet. Wie allerdings in Abbildung 5 zu erkennen ist, war nach der Applikation von Hitzestress in den beiden ALS-Zelllinien kein TDP-43 mehr im Western-Blot nachweisbar. Es wurde erst nach 3 h (ALS/TDP+ #1) und 5 h (sALS) wieder nachweisbar. In der Zelllinie der gesunden Kontrolle (Gesund #1) zeigte sich auch direkt nach dem Hitzestress keine Bande für TDP-43 mehr, allerdings war TDP-43 hier bereits 1 h nach Hitzestress wieder nachweisbar. Dieses Ergebnis scheint aufgrund der zytoplasmatischen Ablagerungen, die in Abbildung 7 zu sehen sind, nicht schlüssig zu sein. Auch konnte in den nukleären Fraktionen der Zelllinien (Abbildung 6) keine Zunahme des TDP-43 nach dem Hitzestress und Erholung gesehen werden, was für eine Rückverteilung des TDP-43 aus dem Zytoplasma in den Nukleus gesprochen hätte. Die Zelllinie sALS zeigte sogar eine leichte Abnahme des TDP-43 nach der Applikation von Hitzestress. Auch wurde in keiner anderen Arbeitsgruppe von einer Abnahme des zytoplasmatischen TDP-43 nach Applikation von zellulärem Stress berichtet, sondern eher von einer Zunahme (Colombrita et al. 2009) (Dewey et al. 2011) (Kabuta et al. 2015). Diese Arbeitsgruppe untersuchten die Zellen allerdings im Gegensatz zu der hier vorgelegten Arbeit nur mittels

Immunfluoreszenz-Färbungen und führten keine Trennung der Zytoplasma- und Nukleusfraktion durch.

Eine Arbeitsgruppe untersuchte allerdings die lösliche und unlöslich Fraktion von Zellen nach oxidativem Stress und konnte eine Zunahme des TDP-43 in der unlöslichen, sowie eine Abnahme des TDP-43 in der löslich Fraktion zeigen (Kabuta et al. 2015). Somit wäre es möglich, dass die deutliche Abnahme des zytoplasmatischen TDP-43 nach Applikation von Hitzestress methodisch begründet ist. Es ist vorstellbar, dass die in Abbildung 7 gezeigten, durch Hitzestress entstehenden TDP-43-positiven Ablagerungen in der zur Auftrennung verwendeten Gradientenzentrifugation, aufgrund einer höheren Dichte nicht in der Fraktion der Zytoplasmaproteine verbleiben, sondern abzentrifugiert werden. Somit wäre eine genauere Untersuchung der einzelnen Phasen der Gradientenzentrifugation, sowie der entstehenden unlöslichen Fraktion sinnvoll. Sollte sich hier eine Zunahme des TDP-43 zeigen, würde das für diese Theorie sprechen. Allerdings bleibt bei dieser Theorie fraglich, weshalb auch nachdem in den Immunfluoreszenzfärbungen keine TDP-43-positiven Ablagerungen mehr zu sehen sind, immer noch kein TDP-43 in den Zytoplasmafractionen der Zelllinien nachweisbar ist. Dies trifft bei der Zelllinie ALS/TDP+ #1 auf den Messzeitpunkt 3 h nach Hitzestress und bei der Zelllinie sALS #1 auf die Messzeitpunkte 2 h und 3 h nach Hitzestress zu. Sind zu diesem Zeitpunkt möglicherweise noch lichtmikroskopisch nicht mehr nachweisbare TDP-43-positive Ablagerungen in den Zelllinien ALS/TDP+ #1 und sALS #1 vorhanden die abzentrifugiert werden? Eine andere Möglichkeit wäre, dass das TDP-43 unter Stressbedingungen abgebaut wird und nach einer gewissen Erholungszeit wieder neu synthetisiert wird. Allerdings spricht dagegen, dass es in den Immunfluoreszenz-Färbungen zu jedem Zeitpunkt im Zytoplasma nachweisbar war und es eher zu einer leichten Zunahme nach dem Hitzestress zu kommen scheint. Auch ist in der Literatur kein Hinweis darauf zu finden, dass TDP-43 unter Stressbedingungen vermehrt abgebaut wird. Lediglich nach der Apoptoseinduzierung mittels Staunospurin konnte in Gliomzellen ein niedriges TDP-43 Level gemessen werden (Nan et al. 2014). Hier wäre das Durchführen eines Apoptose-Assays sinnvoll, um zu überprüfen, ob es durch die Applikation des Hitzestress zu einer vermehrten Apoptose der Zellen kam. Die Arbeit von De Marco et al. 2011, die einen Teil der Grundlage meiner Arbeit darstellt und zeigen konnte, dass man in PBMCs von Patienten mit ALS im Vergleich zu gesunden Kontrollen ein erhöhtes Level an TDP-43 im Zytoplasma messen kann, unterschied sich im Versuchsaufbau in einigen Punkten von meiner Arbeit. Zum einen handelte es sich bei den untersuchten Zellen nicht um LCLs, sondern um PBMCs. Auch verwendete die

Arbeitsgruppe eine andere Methode um Zytoplasma und Nukleus aufzutrennen. Beim Versuch diese zu reproduzieren, erhielt ich stets stark verunreinigte Fraktionen. Weiterhin wurden die Zellen in dieser Arbeit keinem zellulären Stress ausgesetzt.

Betrachtet man nun die nukleären Fraktionen der untersuchten LCLs, die in Abbildung 6 zu sehen sind, fällt auf, dass hier das TDP-43 zu jedem Zeitpunkt nachweisbar ist. Mit Ausnahme der Zelllinie sALS #1 zeigte auch keine der untersuchten Zelllinien eine deutliche Abnahme des TDP-43 nach Hitzestress. Alle Zelllinien zeigen allerdings 3 bis

5 h nach Hitzestress eine Zunahme des TDP-43 in der nukleären Fraktion. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse wäre auch hier die bereits angesprochene methodische Problematik, dass die TDP-43-positiven Ablagerungen durch die Gradientenzentrifugation abzentrifugiert worden sein könnten. Dies könnte zum einen dazu führen, dass sich TDP-43 aus den Ablagerungen der Zytoplasmafraktion in der Nukleusfraktion wiederfindet, allerdings zeigten die Fraktionen wie in Abbildung 3 zu sehen nur minimale Verunreinigungen. Andererseits wäre es denkbar, dass sich im Nukleus der Zellen durch den Hitzestress ebenfalls TDP-43-positiv Ablagerungen bilden und man diese durch die Gradientenzentrifugation ebenfalls verliert. Dies würde auch zu den Ergebnissen einer Arbeitsgruppe passen, die im Nukleus von HeLa-Zellen TDP-43-positiv Stressgranula nach der Applikation von Hitzestress nachweisen konnte (Udan-Johns et al. 2014), sowie zu den Ergebnissen einer weiteren Arbeitsgruppe die nach oxidativem Stress eine Zunahme des TDP-43 in der unlöslichen und eine Abnahme in der löslichen Fraktion zeigen konnte (Kabuta et al. 2015). Diese Erklärung würde besonders gut den Ergebnissen der Zelllinie sALS #1 (Abbildung 6) passen, bei der das TDP-43 in der nukleären Fraktion nach Applikation von Hitzestress erst leicht abfällt und 5 h nach Hitzestress wieder ansteigt. Weniger gut passt diese Erklärung zu den nukleären TDP-43 Fraktionen der Zelllinien ALS/TDP+ #1 und Gesund #1, hier kommt es zu keinem initialen Abfall des TDP-43 nach Hitzestress, jedoch zu einem Anstieg des TDP-43 3 beziehungsweise 5 h nach Hitzestress. Folglich muss man sich fragen, ob es tatsächlich um einen methodischen Fehler handelt, oder ob es im Anschluss an den Hitzestress eventuell zu einer vermehrten Synthese von TDP-43 kommen könnte. Wie bereits oben erwähnt, gibt es hierfür bis jetzt keine weiteren Hinweise, weshalb man dieses Ergebnis weiter untersuchen sollte.

4.3 Unterschiede die TDP-43 Mutation

Wenn man nun die unterschiedlichen Zelllinien in Abbildung 7 vergleicht, fällt auf, dass die Zelllinie ALS/TDP+ #1 (Abbildung 7.a) mit einer N352S Mutation im TDP-43, mehr Ablagerungen aufzuweisen scheint, als die anderen beiden Zelllinien. Auch scheint es, dass diese Ablagerungen sich langsamer wieder auflösen als in den anderen beiden Zelllinien. Dies könnte dafür sprechen, dass die N352S Mutation im TDP-43 für die vermehrten Aggregate in dieser Zelllinie verantwortlich ist. Dies wirft interessante Gegensätze zu den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe auf, die ebenfalls LCLs von ALS-Patienten mit TDP-43 Mutationen untersuchten. Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien hatten eine D169G- und eine R361S-Mutation im TDP-43. Nach Applikation von oxidativem Stress zeigte die Zelllinie mit der R361S-Mutation eine geringere Menge an Stressgranula, als die Zelllinie mit D168G-Mutation, sowie die verwendete Kontrolle ohne TDP-43 Mutation (McDonald et al. 2011). In Anbetracht dieser sowie meiner Ergebnisse wäre es möglich, dass es bei der hier untersuchten N352S-Mutation zu einem *gain of function* in Bezug auf die Stressgranulaformation kommt. Unterdessen scheint die R361S-Mutation bei der Stressgranula-Formation eher einen *loss of function* zu verursachen und die D168G-Mutation diese gar nicht zu beeinflussen (McDonald et al. 2011).

Ein weiteres interessantes Ergebnis war, dass sich durch den Hitzestress lediglich bei der Zelllinie ALS/TDP + #1 eine reversible Umverteilung des TDP-43 in das Zytoplasma auslösen lässt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich durch zellulären Stress eine temporäre zytoplasmatische Anreicherung von TDP-43 auslösen lässt (Colombrita et al. 2009) (Dewey et al. 2011) (Kabuta et al. 2015). Allerdings verwendeten diese Arbeitsgruppen keine LCLs, sondern andere Zelllinien, von denen auch keine eine TDP-43 Mutation aufwies. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es in der Zelllinie ALS/TDP + #1, nach der Applikation des Hitzestresses zu einer Umverteilung des TDP-43 aus dem Nukleus in das Zytoplasma kam. Diese Umverteilung war mit der Auflösung der TDP-43-positiven Ablagerungen wieder reversibel. Die beiden anderen Zelllinien ohne TDP-43 Mutation zeigten diese Umverteilung nicht, woraus man schließen kann, dass möglicherweise die N352S Mutation im TDP-43 eine Ursache für diese Umverteilung sein könnte. Eine weitere Untersuchung von LCLs mit anderen TDP-43 Mutationen, sowie weiterer Kontrollen wäre hier sinnvoll, um zu überprüfen ob die Umverteilung von TDP-43 ins Zytoplasma durch Hitzestress sich lediglich bei der N352S Mutation zeigen lässt.

4.4 Fazit

Ziel meiner Doktorarbeit war es, in unserer Arbeitsgruppe ein Hitzestressmodell für LCLs zu entwickeln, um die Auswirkung des Stressors auf TDP-43 weiter zu untersuchen. Speziell hofften wir, eine Umverteilung des TDP-43 aus dem Nukleus in das Zytoplasma nach der Applikation von Hitzestress nachweisen zu können. Dies konnte in den IF-Färbungen für die Zelllinie ALS/TDP+ #1 mit einer N352S Mutation im TDP-43 gezeigt werden. Allerdings konnte dies leider im Western Blot nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich keine Anreicherung von TDP-43 im Zytoplasma. Stattdessen war, nach der Applikation von Hitzestress, das TDP-43 nicht mehr im Zytoplasma nachweisbar. Die wahrscheinlichste Ursache hierfür scheint zu sein, dass die entstanden TDP-43-positiven Ablagerungen in der Gradientenzentrifugation abzentrifugiert wurden oder sich in der unlöslichen Fraktion der Auftrennung befanden. Somit konnte meine These, dass durch Applikation von Hitzestress eine Umverteilung des TDP-43 aus dem Nukleus in das Zytoplasma auslösbar ist, nur mittels IF-Färbungen und nicht semiquantitativ mittels Western Blot bestätigt werden. Auch konnte interessanterweise die Umverteilung des TDP-43 in das Zytoplasma, lediglich in der Zelllinie mit einer TDP-43 Mutation gezeigt werden. Da es in diesem Bereich der Stressgranulahypothese bei TDP-43-Proteinopathien noch viel Bedarf an weiterer Aufklärung gibt, sind bereits weitere Experimente mit den hier etablierten Methoden in unserer Arbeitsgruppe geplant.

4.5 Ausblick

Da es bislang nicht gelungen ist, die Umverteilung des TDP-43 aus dem Nukleus in das Zytoplasma im Western Blot nachzuweisen, wäre es als erstes sinnvoll die restlichen Phasen der Gradientenzentrifugation, sowie die entstehende unlösliche Fraktion weiter zu untersuchen um zu überprüfen ob hier eine Zunahme von TDP-43 zu finden ist. Dies scheint wahrscheinlich, da an einer anderen Zelllinie gezeigt werden konnte, dass es durch Hitzestress zu einer Anreicherung von TDP-43 in der unlöslichen Fraktion kommt (Kabuta et al. 2015). Sollte sich in der unlöslichen Fraktion TDP-43 nachweisen lassen, wäre es weiterhin interessant, ob das TDP-43 in der unlöslichen Fraktion gegenüber der löslichen Fraktion Merkmale aufweist die typisch für die TDP-43-Proteinopathien sind (Neumann et al. 2006) (Arai et al. 2006). Diese Versuche sind bereits in unserer Arbeitsgruppe geplant. In Bezug auf die IF-Färbungen wäre es sinnvoll eine konfokale Mikroskopie durchzuführen um die genaue Lokalisation, sowie möglicherweise die Anzahl der Ablagerungen zu bestimmen. Auch wäre hier eine Färbung auf phosphoryliertes TDP-43 oder eine

Doppelfärbung auf TDP-43 und Ubiquitin denkbar. Außerdem ist es wichtig, dass die Versuche wiederholt werden, sowie weitere Zelllinien mit anderen Mutationen im TDP-43 untersucht werden. Weiterhin wäre es interessant, wie die Zellen auf lange andauernden Stress, sowie wiederholten Stress reagieren. Es wurde, wie auch in meiner Arbeit, schon mehrfach gezeigt, dass sich die durch Stress entstehenden TDP-43-positiven Stressgranula, innerhalb von Stunden wieder auflösen (Colombrita et al. 2009) (Liu-Yesucevitz et al. 2010) (Freibaum et al. 2010) (Dewey et al. 2011) (McDonald et al. 2011). Es gibt allerdings erst eine Arbeit, welche die Wirkung eines über längere Zeit applizierten Stressors auf eine Zelllinie untersucht. Hier zeigte sich, dass nach der Auflösung der initial entstandenen Stressgranula noch TDP-43-positiv, jedoch auf Stressgranulamarker negative Ablagerungen vorhanden waren. Diese zeigten für TDP-43-Proteinopathien typische Veränderungen (Parker et al. 2012). Somit gibt es erste Hinweise, die die Stressgranulahypothese der TDP-43-Proteinopathien von Dewey et.al. (siehe Abbildung 2) unterstützen. Die hier verwendeten LCLs würden die Möglichkeit bieten, die Wirkung einer langen Stressexposition auf Zelllinien mit ALS verursachende Mutationen zu untersuchen, ohne das mutierte Protein über Transfektion einbringen zu müssen. Weiterhin wäre es noch sinnvoll, Buffy coats zu analysieren, um zu überprüfen, dass die gezeigte Veränderungen nicht auf die Transformation mit EBV zurückzuführen sind.

5 Zusammenfassung

Ziel meiner Arbeit war es, zu überprüfen, ob man die für die TDP-43-Proteinopathien typische, pathologische Anreicherung von TDP-43 (TAR DNA binding Protein 43) im Zytoplasma durch Hitzestress auslösen kann, da Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen vermuten lassen, dass zellulärer Stress eine Rolle in der Entstehung der TDP-43-Proteinopathien spielt. Hierfür musste ein Zellmodell mit Hitzestress etabliert werden und die Zellen mit Immunfluoreszenz (IF)-Färbungen und Western-Blot weiter untersucht werden. Als Zelllinien wurden LCLs (Lymphoblastoid cell lines) von drei Patienten verwendet. Hierbei handelte es sich um zwei Patienten mit ALS (ALS/TDP+ #1 und sALS #1), wobei einer eine N352S Mutation im TDP-43 aufweist (ALS/TDP+ #1). Weiterhin wurde eine LCL einer gesunden Kontrollperson (Gesund #1) untersucht, um mögliche Unterschiede zwischen den Zelllinien der Patienten mit und ohne Mutation, sowie der gesunden Kontrolle zu zeigen. Die Zelllinien wurden für 1 h einem Hitzestress von 42 °C ausgesetzt und anschließend zu den Messzeitpunkten direkt nach, 1, 2, 3 und 5 h mittels IF-Färbungen und Western-Blot untersucht. Eine Kontrolle je Zelllinie wurde keinem Hitzestress ausgesetzt. Mittels IF-Färbungen konnte gezeigt werden, dass TDP-43 ohne Hitzestress hauptsächlich im Nukleus lokalisiert ist und sich nur zu einem geringen Teil im Zytoplasma befindet. Direkt nach der Applikation ist bei der Zelllinie ALS/TDP+ #1 eine Verschiebung des TDP-43 in das Zytoplasma zu sehen, diese geht mit der Entstehung von TDP-43-positiven Ablagerungen einher. In den anderen beiden Zelllinien sALS #1 und Gesund #1 kommt es in einem geringeren Maße ebenfalls zur Entstehung der TDP-43-positiven Ablagerungen. Diese TDP-43-positiven Ablagerungen lösen sich im weiteren Verlauf wieder auf, was mit einer Rückverteilung des TDP-43 in den Nukleus einhergeht. So sind sie bei der Zelllinie ALS/TDP+ #1 nach 2 h Erholungszeit nicht mehr nachweisbar, während sie bei den Zelllinien sALS #1 und Gesund #1 bereits nach 1 h Erholungszeit nicht mehr nachweisbar sind. Dies passte zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die eine Rekrutierung von TDP-43 in Stressgranula beschreiben, weshalb eine Doppelfärbung mit TIA-1 (T-cell intracellular antigen 1) durchgeführt wurde, einem Stressgranulamarker. Wie in Abbildung 8 zu sehen, scheinen TDP-43 und TIA-1 kolokalisiert zu sein, wobei dies mit konfokalen Aufnahmen noch bestätigt werden müsste. Die IF-Färbungen zeigten somit, dass wie bereits bekannt, TDP-43 durch Hitzestress in Stressgranula rekrutiert werden kann. Interessanterweise scheint die N352S Mutation im TDP-43 der Zelllinie ALS/TDP+ #1 diesen Effekt zu verstärken. Es könnte sich somit möglicherweise um eine *gain of function* Mutation in Bezug auf die Stressgranula Entstehung handeln. Dies ist besonders interessant,

da für andere TDP-43 Mutationen ein *loss of function* in Bezug auf die Stressgranula-Entstehung bekannt ist.

Um die in der IF-Färbung gezeigte Umverteilung des TDP-43 in das Zytoplasma nach Hitzestress genauer zu analysieren, sollten die Zytoplasma- und Nukleusfraktion der Zellen mittels Western-Blot untersucht werden. Hierfür wurde eine auf Iodixanol basierende Gradientenzentrifugation verwendet. Die Umverteilung des TDP-43 aus dem Nukleus in das Zytoplasma, durch die Applikation von Hitzestress, konnte im Western-Blot allerdings nicht bestätigt werden. So war in allen drei Zelllinien ohne Hitzestress TDP-43 im Zytoplasma nachweisbar ist. Direkt nach der Applikation von Hitzestress konnte jedoch in keiner der drei Zelllinien TDP-43 im Zytoplasma nachgewiesen werden. Das TDP-43 wurde in den Zelllinien nach einer Erholungszeit von 1 h (Gesund #1), 3 h (ALS/TDP+ #1) und 5 h (sALS #1) wieder nachweisbar. Auch zeigten auch die Blots der nukleären Fraktion, dass es zu keiner Umverteilung des TDP-43 in den Nukleus kommt, da sich hier nach Applikation von Hitzestress keine Zunahme von TDP-43 zeigte. Im Falle der Zelllinie sALS #1 kommt es sogar zu einer Abnahme des nukleären TDP-43 nach der Applikation von Hitzestress. Diese Ergebnisse lassen, gemeinsam mit den IF-Färbungen, in denen das TDP-43 in zytoplasmatischen Ablagerungen zu sehen ist, am ehesten an eine methodische Problematik denken. So wäre es vorstellbar, dass das in den TDP-43-positiven Ablagerungen gebundene TDP-43, aufgrund seiner erhöhten Dichte, bei der Gradientenzentrifugation abzentrifugiert wird oder sich in der entstehenden unlöslichen Fraktion befindet. Dies sollte in weiteren Experimenten überprüft werden. Somit konnte ich ein Hitzestressmodell für LCLs in unserer Arbeitsgruppe etablieren und mittels IF-Färbungen, für die Zelllinie ALS/TDP+ #1 eine Umverteilung des TDP-43 in das Zytoplasma durch die Applikation von Hitzestress zeigen, allerdings gelang die gewünschte Bestätigung dieses Ergebnisses mittels Western-Blot nicht.

6 Literaturverzeichnis

1. Agosta F, Valsasina P, Riva N, Copetti M, Messina MJ, Prella A, Comi G, Filippi M: The cortical signature of amyotrophic lateral sclerosis. PLoS ONE [Electronic Resource], 7: e42816 (2012)
2. Alquezar C, Esteras N, Bartolome F, Merino JJ, Alzualde A, Lopez de Munain A, Martin-Requero A: Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTLN-TDP dementia. *Neurobiol.Aging*, 33: 429.e7-429.20 (2012)
3. Andersen PM, Al-Chalabi A: Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nature Reviews Neurology*, 7: 603-615 (2011)
4. Anderson P, Kedersha N: Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem.Sci.*, 33: 141-150 (2008)
5. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 351: 602-611 (2006)
6. Ash PE, Zhang YJ, Roberts CM, Saldi T, Hutter H, Buratti E, Petrucelli L, Link CD: Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*. *Hum.Mol.Genet.*, 19: 3206-3218 (2010)
7. Ayala V, Granado-Serrano AB, Cacabelos D, Naudi A, Ilieva EV, Boada J, Caraballo-Miralles V, Llado J, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M: Cell stress induces TDP-43 pathological changes associated with ERK1/2 dysfunction: implications in ALS. *Acta Neuropathol.*, 122: 259-270 (2011)
8. Ayala YM, De Conti L, Avendano-Vazquez SE, Dhir A, Romano M, D'Ambrogio A, Tollervey J, Ule J, Baralle M, Buratti E, Baralle FE: TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J.*, 30: 277-288 (2011)

9. Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu YF, Petrucelli L, Buratti E, Baralle FE: Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J.Cell.Sci.*, 121: 3778-3785 (2008)
10. Barmada SJ, Serio A, Arjun A, Bilican B, Daub A, Ando DM, Tsvetkov A, Pleiss M, Li X, Peisach D, Shaw C, Chandran S, Finkbeiner S: Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models. *Nature Chemical Biology*, 10: 677-685 (2014)
11. Barmada SJ, Skibinski G, Korb E, Rao EJ, Wu JY, Finkbeiner S: Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 30: 639-649 (2010)
12. Bartolome F, de Las Cuevas N, Munoz U, Bermejo F, Martin-Requero A: Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients: cross-talk of Ca²⁺/calmodulin and ERK1/2 signaling pathways. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 64: 1437-1448 (2007)
13. Bentmann E, Neumann M, Tahirovic S, Rodde R, Dormann D, Haass C: Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *J.Biol.Chem.*, 287: 23079-23094 (2012)
14. Braak H, Brettschneider J, Ludolph AC, Lee VM, Trojanowski JQ, Del Tredici K: Amyotrophic lateral sclerosis--a model of corticofugal axonal spread. *Nature Reviews Neurology*, 9: 708-714 (2013)
15. Brady OA, Meng P, Zheng Y, Mao Y, Hu F: Regulation of TDP-43 aggregation by phosphorylation and p62/SQSTM1. *J.Neurochem.*, 116: 248-259 (2011)
16. Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Irwin DJ, Grossman M, Suh E, Van Deerlin VM, Wood EM, Baek Y, Kwong L, Lee EB, Elman L, McCluskey L, Fang L, Feldengut S, Ludolph AC, Lee VM, Braak H, Trojanowski JQ: Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann.Neurol.*, 74: 20-38 (2013)
17. Brownell B, Oppenheimer DR, Hughes JT: The central nervous system in motor neurone disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 33: 338-357 (1970)

18. Bunina T L: [On intracellular inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis]. *Zhurnal Nevropatologii i Psikhatrii Imeni S - S - Korsakova*, 62: 1293-1299 (1962)
19. Buratti E, Brindisi A, Giombi M, Tisminetzky S, Ayala YM, Baralle FE: TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J.Biol.Chem.*, 280: 37572-37584 (2005)
20. Buratti E, De Conti L, Stuani C, Romano M, Baralle M, Baralle F: Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *FEBS Journal*, 277: 2268-2281 (2010)
21. Buratti E, Dork T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, Baralle FE: Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J.*, 20: 1774-1784 (2001)
22. Cairns NJ, Neumann M, Bigio EH, Holm IE, Troost D, Hatanpaa KJ, Foong C, White CL 3rd, Schneider JA, Kretzschmar HA, Carter D, Taylor-Reinwald L, Paulsmeyer K, Strider J, Gitcho M, Goate AM, Morris JC, Mishra M, Kwong LK, Stieber A, Xu Y, Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM, Mackenzie IR: TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions. *Am.J.Pathol.*, 171: 227-240 (2007)
23. Carlomagno Y, Zhang Y, Davis M, Lin WL, Cook C, Dunmore J, Tay W, Menkosky K, Cao X, Petrucelli L, Deture M: Casein kinase II induced polymerization of soluble TDP-43 into filaments is inhibited by heat shock proteins. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 9: e90452 (2014)
24. Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, Nakanishi A: The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J.Neurol.Sci.*, 169: 13-21 (1999)
25. Che MX, Jiang YJ, Xie YY, Jiang LL, Hu HY: Aggregation of the 35-kDa fragment of TDP-43 causes formation of cytoplasmic inclusions and alteration of RNA processing. *FASEB Journal*, 25: 2344-2353 (2011)
26. Chen-Plotkin AS, Lee VM, Trojanowski JQ: TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 6: 211-220 (2010)

27. Chio A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, White LA: Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*, 41: 118-130 (2013)
28. Choksi DK, Roy B, Chatterjee S, Yusuff T, Bakhoun MF, Sengupta U, Ambegaokar S, Kaye R, Jackson GR: TDP-43 Phosphorylation by casein kinase Iepsilon promotes oligomerization and enhances toxicity in vivo. *Hum.Mol.Genet.*, 23: 1025-1035 (2014)
29. Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, Buratti E, Silani V, Ratti A: TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J.Neurochem.*, 111: 1051-1061 (2009)
30. de las Cuevas N, Munoz U, Hermida OG, Martin-Requero A: Altered transcriptional regulators in response to serum in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Neurobiol.Aging*, 26: 615-624 (2005)
31. de las Cuevas N, Urcelay E, Hermida OG, Saiz-Diaz RA, Bermejo F, Ayuso MS, Martin-Requero A: Ca²⁺/calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements pRb and p27kip1 involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia. *Neurobiol.Dis.*, 13: 254-263 (2003)
32. De Marco G, Lupino E, Calvo A, Moglia C, Buccinna B, Grifoni S, Ramondetti C, Lomartire A, Rinaudo MT, Piccinini M, Giordana MT, Chio A: Cytoplasmic accumulation of TDP-43 in circulating lymphomonocytes of ALS patients with and without TARDBP mutations. *Acta Neuropathol.*, 121: 611-622 (2011)
33. Dengler R, Grehl T, Hecht M, Ludolph AC, Meyer T, Löscher W, Petri S, Weber M, Weishaupt J.: *Amyotrophe Lateralsklerose S1-Leitlinie.* (2014)
34. Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Dries DR, Mayer P 3rd, Good SK, Johnson BA, Herz J, Yu G: TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Molecular & Cellular Biology*, 31: 1098-1108 (2011)
35. Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Johnson BA, Herz J, Yu G: TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key? *Brain Res.*, 1462: 16-25 (2012)

36. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, Armakola M, Geser F, Greene R, Lu MM, Padmanabhan A, Clay-Falcone D, McCluskey L, Elman L, Juhr D, Gruber PJ, Rub U, Auburger G, Trojanowski JQ, Lee VM, Van Deerlin VM, Bonini NM, Gitler AD: Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*, 466: 1069-1075 (2010)
37. Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP: Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *Journal of Proteome Research*, 9: 1104-1120 (2010)
38. Freischmidt A, Muller K, Ludolph AC, Weishaupt JH: Systemic dysregulation of TDP-43 binding microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica Communications*, 1: 42 (2013)
39. Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, Anderson P: Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol.Biol.Cell*, 15: 5383-5398 (2004)
40. Hans F, Fiesel FC, Strong JC, Jackel S, Rasse TM, Geisler S, Springer W, Schulz JB, Voigt A, Kahle PJ: UBE2E ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitin isopeptidase Y regulate TDP-43 protein ubiquitination. *J.Biol.Chem.*, 289: 19164-19179 (2014)
41. Hart MP, Gitler AD: ALS-associated ataxin 2 polyQ expansions enhance stress-induced caspase 3 activation and increase TDP-43 pathological modifications. *Journal of Neuroscience*, 32: 9133-9142 (2012)
42. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H: Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann.Neurol.*, 64: 60-70 (2008)
43. Hebron ML, Lonskaya I, Sharpe K, Weerasinghe PP, Algarzae NK, Shekoyan AR, Moussa CE: Parkin ubiquitinates Tar-DNA binding protein-43 (TDP-43) and promotes its cytosolic accumulation via interaction with histone deacetylase 6 (HDAC6). *J.Biol.Chem.*, 288: 4103-4115 (2013)

44. Huang CC, Bose JK, Majumder P, Lee KH, Huang JT, Huang JK, Shen CK: Metabolism and mis-metabolism of the neuropathological signature protein TDP-43. *J.Cell.Sci.*, 127: 3024-3038 (2014)
45. Igaz LM, Kwong LK, Xu Y, Truax AC, Uryu K, Neumann M, Clark CM, Elman LB, Miller BL, Grossman M, McCluskey LF, Trojanowski JQ, Lee VM: Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Am.J.Pathol.*, 173: 182-194 (2008)
46. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G: Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain*, 136: 1371-1382 (2013)
47. Ince PG, Lowe J, Shaw PJ: Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology. *Neuropathology & Applied Neurobiology*, 24: 104-117 (1998)
48. Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hisanaga S, Hasegawa M: Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTL-D-U and ALS. *FEBS Lett.*, 582: 2899-2904 (2008)
49. Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, Bourguoin P, Rochefort D, Bel Hadj S, Durham HD, Vande Velde C, Rouleau GA, Drapeau P: Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum.Mol.Genet.*, 19: 671-683 (2010)
50. Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA: TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat.Genet.*, 40: 572-574 (2008)
51. Kabuta C, Kono K, Wada K, Kabuta T: 4-Hydroxynonenal induces persistent insolubilization of TDP-43 and alters its intracellular localization. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 463: 82-87 (2015)

52. Kato S: Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.*, 115: 97-114 (2008)
53. Kim HJ, Jeon BS, Yoon MY, Park SS, Lee KW: Increased expression of alpha-synuclein by SNCA duplication is associated with resistance to toxic stimuli. *Journal of Molecular Neuroscience*, 47: 249-255 (2012)
54. Kimura T, Jiang H, Konno T, Seto M, Iwanaga K, Tsujihata M, Satoh A, Onodera O, Kakita A, Takahashi H: Bunina bodies in motor and non-motor neurons revisited: a pathological study of an ALS patient after long-term survival on a respirator. *Neuropathology*, 34: 392-397 (2014)
55. Kraemer BC, Schuck T, Wheeler JM, Robinson LC, Trojanowski JQ, Lee VM, Schellenberg GD: Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta Neuropathol.*, 119: 409-419 (2010)
56. Kwong LK, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM: TDP-43 proteinopathies: neurodegenerative protein misfolding diseases without amyloidosis. *NeuroSignals*, 16: 41-51 (2008)
57. Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685 (1970)
58. Laferriere F, Polymenidou M: Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Swiss Medical Weekly*, 145: w14054 (2015)
59. Lattante S, Rouleau GA, Kabashi E: TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. *Hum.Mutat.*, 34: 812-826 (2013)
60. Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, Buller J, Swash M, Martin JE, Gallo JM, Weller RO, Anderton BH: Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain*, 114: 775-788 (1991)
61. Li HY, Yeh PA, Chiu HC, Tang CY, Tu BP: Hyperphosphorylation as a defense mechanism to reduce TDP-43 aggregation. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 6: e23075 (2011)

62. Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW: Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*, 79: 416-438 (2013)
63. Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang YJ, Vanderweyde T, Citro A, Mehta T, Zaarur N, McKee A, Bowser R, Sherman M, Petrucelli L, Wolozin B: Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 5: e13250 (2010)
64. Lowe J, Aldridge F, Lennox G, Doherty F, Jefferson D, Landon M, Mayer RJ: Inclusion bodies in motor cortex and brainstem of patients with motor neurone disease are detected by immunocytochemical localisation of ubiquitin. *Neurosci.Lett.*, 105: 7-13 (1989)
65. Lowe J, Lennox G, Jefferson D, Morrell K, McQuire D, Gray T, Landon M, Doherty FJ, Mayer RJ: A filamentous inclusion body within anterior horn neurones in motor neurone disease defined by immunocytochemical localisation of ubiquitin. *Neurosci.Lett.*, 94: 203-210 (1988)
66. Ludolph AC, Brettschneider J: TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis - is it a prion disease? *European Journal of Neurology*, 22: 753-761 (2015)
67. Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M: TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurology*, 9: 995-1007 (2010)
68. Main PA, Thomas P, Esterman A, Fenech MF: Necrosis is increased in lymphoblastoid cell lines from children with autism compared with their non-autistic siblings under conditions of oxidative and nitrosative stress. *Mutagenesis*, 28: 475-484 (2013)
69. Mancini C, Roncaglia P, Brussino A, Stevanin G, Lo Buono N, Krmac H, Maltecca F, Gazzano E, Bartoletti Stella A, Calvaruso MA, Iommarini L, Cagnoli C, Forlani S, Le Ber I, Durr A, Brice A, Ghigo D, Casari G, Porcelli AM, Funaro A, Gasparre G, Gustincich S, Brusco A: Genome-wide expression profiling and functional characterization of SCA28 lymphoblastoid cell lines reveal impairment in cell growth and activation of apoptotic pathways. *BMC Medical Genomics [Electronic Resource]*, 6: 22 (2013)
70. Marini M, Lapalombella R, Canaider S, Farina A, Monti D, De Vescovi V, Morellini M, Bellizzi D, Dato S, De Benedictis G, Passarino G, Moresi R, Tesi S, Franceschi C:

- Heat shock response by EBV-immortalized B-lymphocytes from centenarians and control subjects: a model to study the relevance of stress response in longevity. *Exp.Gerontol.*, 39: 83-90 (2004)
71. Matsumoto A, Fujiwara Y: Abnormal and deficient processing of beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 175: 361-365 (1991)
72. Mattle H, Mumenthaler M: *Neurologie*, 13, Thieme, Stuttgart, S. 329-332 (2013)
73. McDonald KK, Aulas A, Destroismaisons L, Pickles S, Beleac E, Camu W, Rouleau GA, Vande Velde C: TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum.Mol.Genet.*, 20: 1400-1410 (2011)
74. Meyerowitz J, Parker SJ, Vella LJ, Ng DC, Price KA, Liddell JR, Caragounis A, Li Q-X, Masters CL, Nonaka T, Hasegawa M, Bogoyevitch MA, Kanninen KM, Crouch PJ, White AR: C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. *Molecular neurodegeneration*, 6: 57 (2011)
75. Munoz U, Bartolome F, Bermejo F, Martin-Requero A: Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol.Aging*, 29: 1474-1484 (2008)
76. Nagy Z, Combrinck M, Budge M, McShane R: Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurosci.Lett.*, 317: 81-84 (2002)
77. Nan YN, Zhu JY, Tan Y, Zhang Q, Jia W, Hua Q: Staurosporine induced apoptosis rapidly downregulates TDP- 43 in glioma cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: Apjcp*, 15: 3575-3579 (2014)
78. Neumann M, Kwong LK, Lee EB, Kremmer E, Flatley A, Xu Y, Forman MS, Troost D, Kretschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM: Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta Neuropathol.*, 117: 137-149 (2009)

79. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314: 130-133 (2006)
80. Ou SH, Wu F, Harrich D, Garcia-Martinez LF, Gaynor RB: Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J.Virol.*, 69: 3584-3596 (1995)
81. Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Crouch PJ, Kanninen KM, White AR: Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates. *Neurochem.Int.*, 60: 415-424 (2012)
82. Poglitsch M, Katholnig K, Saemann MD, Weichhart T: Rapid isolation of nuclei from living immune cells by a single centrifugation through a multifunctional lysis gradient. *J.Immunol.Methods*, 373: 167-173 (2011)
83. Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY, Ling SC, Sun E, Wancewicz E, Mazur C, Kordasiewicz H, Sedaghat Y, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Yeo GW, Cleveland DW: Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat.Neurosci.*, 14: 459-468 (2011)
84. Ravits JM, La Spada AR: ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology*, 73: 805-811 (2009)
85. Rose S, Frye RE, Slattery J, Wynne R, Tippet M, Pavliv O, Melnyk S, James SJ: Oxidative stress induces mitochondrial dysfunction in a subset of autism lymphoblastoid cell lines in a well-matched case control cohort. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 9: e85436 (2014)
86. Rosen D R: Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 364: 362 (1993)

87. Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch NA, Xu YF, Stewart H, Kelley BJ, Kuntz K, Crook RJ, Sreedharan J, Vance C, Sorenson E, Lippa C, Bigio EH, Geschwind DH, Knopman DS, Mitsumoto H, Petersen RC, Cashman NR, Hutton M, Shaw CE, Boylan KB, Boeve B, Graff-Radford NR, Wszolek ZK, Caselli RJ, Dickson DW, Mackenzie IR, Petrucelli L, Rademakers R: Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genetics*, 4: e1000193 (2008)
88. Scotter EL, Chen H-J, Shaw CE: TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics*, 352-363 (2015)
89. Sephton CF, Good SK, Atkin S, Dewey CM, Mayer P 3rd, Herz J, Yu G: TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *J.Biol.Chem.*, 285: 6826-6834 (2010)
90. Seyfried NT, Gozal YM, Dammer EB, Xia Q, Duong DM, Cheng D, Lah JJ, Levey AI, Peng J: Multiplex SILAC analysis of a cellular TDP-43 proteinopathy model reveals protein inclusions associated with SUMOylation and diverse polyubiquitin chains. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9: 705-718 (2010)
91. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Bellerocche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE: TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 319: 1668-1672 (2008)
92. Steinacker P, Feneberg E, Weishaupt J, Brettschneider J, Tumani H, Andersen PM, von Arnim CF, Böhm S, Kassubek J, Kubisch C, Lulé D, Müller H-P, Mücke R, Pinkhardt E, Oeckl P, Rosenbohm A, Anderl-Straub S, Volk AE, Weydt P, Ludolph AC, Otto M: Neurofilaments in the diagnosis of motoneuron diseases: a prospective study on 455 patients. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, (2015)
93. Tsai HF, Lin SJ, Li C, Hsieh M: Decreased expression of Hsp27 and Hsp70 in transformed lymphoblastoid cells from patients with spinocerebellar ataxia type 7. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 334: 1279-1286 (2005)
94. Turner MR, Benatar M: Ensuring continued progress in biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, 51: 14-18 (2015)

95. Udan-Johns M, Bengoechea R, Bell S, Shao J, Diamond MI, True HL, Weihl CC, Baloh RH: Prion-like nuclear aggregation of TDP-43 during heat shock is regulated by HSP40/70 chaperones. *Hum.Mol.Genet.*, 23: 157-170 (2014)
96. van Eersel J, Ke YD, Gladbach A, Bi M, Gotz J, Kril JJ, Ittner LM: Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon proteasome inhibition in cultured neurons. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 6: e22850 (2011)
97. Wang F, Gregory C, Sample C, Rowe M, Liebowitz D, Murray R, Rickinson A, Kieff E: Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J.Virol.*, 64: 2309-2318 (1990)
98. Wang HY, Wang IF, Bose J, Shen CK: Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics*, 83: 130-139 (2004)
99. Weydt P, Oeckl P, Huss A, Müller K, Volk AE, Kuhle J, Knehr A, Andersen PM, Prudlo J, Steinacker P, Weishaupt JH, Ludolph AC, Otto M: Neurofilaments levels as biomarkers in asymptomatic and symptomatic familial ALS. *Annals of Neurology*, (2015)
100. Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Pereson S, Joris G, Cuijt I, Smits V, Ceuterick-de Groote C, Van Broeckhoven C, Kumar-Singh S: TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 107: 3858-3863 (2010)
101. Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM: Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J.Biol.Chem.*, 283: 13302-13309 (2008)
102. Wolozin B: Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 7: 56 (2012)
103. Wu LS, Cheng WC, Hou SC, Yan YT, Jiang ST, Shen CK: TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis: the Journal of Genetics & Development*, 48: 56-62 (2010)

104. Wu LS, Cheng WC, Shen CK: Targeted depletion of TDP-43 expression in the spinal cord motor neurons leads to the development of amyotrophic lateral sclerosis-like phenotypes in mice. *J.Biol.Chem.*, 287: 27335-27344 (2012)

105. Yang C, Tan W, Whittle C, Qiu L, Cao L, Akbarian S, Xu Z: The C-terminal TDP-43 fragments have a high aggregation propensity and harm neurons by a dominant-negative mechanism. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 5: e15878 (2010)

7 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Markus Otto für das Ermöglichen dieser Arbeit und für seine Anregungen, sowie bei der gesamten Arbeitsgruppe Otto für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Mertens und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die Bereitstellung der Zelllinien, sowie das Einarbeiten in deren Handhabung danken. Bei Frau PD Dr. Petra Steinacker möchte ich mich für die Betreuung während meiner Zeit im Labor und für das Korrekturlesen bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Stephen Meier für zahlreiche Hilfestellung bei Laborarbeiten und die aufmunternden Worte.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lukas Ferdinand Tümmers

Geburtstag: 04.04.1988

Geburtsort: Stuttgart

Schulbildung:

1998 - 2007 Philipp-Matthäus-Hahn-Gymnasium in
Echterdingen

Zivildienst:

September 2007 - Mai 2008 Zivildienst im Pflegedienst am Klinikum Garmisch-
Partenkirchen

Hochschulausbildung:

Oktober 2008 - Mai 2014 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm

August 2010 Physikum (1,0)

April 2014 2. Staatsexamen (2,0)

Mai 2015 3. Staatsexamen (1,0)

Famulaturen:

März/April 2011 Unfallchirurgie, Uniklinikum Ulm

August/September 2012 Allgemein- und Unfallchirurgie, Filderklinik
Bonlanden

März 2013 Intensivmedizin, Donauklinik Neu-Ulm

April 2013 Ultraschallambulanz, Uniklinikum Ulm

September 2013 Orthopädie, Western Regional Hospital, Pokhara
Nepal

Praktisches Jahr:

Mai 2014 - April 2015 Klinikverbund Kempten-Oberallgäu
Prüfungsfächer: Innere Medizin, Chirurgie,
Anästhesie und Orthopädie

Tätigkeit als Tutor:

Sommersemester 2010 Tutor für Mikroskopische Anatomie bei Prof. Dr.
Britsch

Wintersemester 2011/12 Tutor für Makroskopische Anatomie bei Prof. Dr.
Böckers

Sommer-/ Wintersemester 2013/14 Tutor für Pharmakologie und Toxikologie bei Prof.
Dr. Gierschik

Promotion:

Oktober 2011 – Januar 2017 Stipendium des Promotionsprogramms
Experimentelle Medizin der Universität Ulm für
meine Promotion zum Thema: „*Etablierung und
Anwendung eines Zellkulturmodells aus EBV-
transformierten B-Lymphozyten zur Untersuchung des
Einflusses von zellulärem Stress auf das Protein TDP-
43*“ bei Prof. Dr. med. Markus Otto.

September 2012

Poster auf der 8. internationalen Konferenz über Frontotemporale Demenzen 5.-7. September 2012, Manchester, UK: „*B lymphocytes as tool for the analysis of TDP-43 pathophysiology*” (Petra Steinacker*, Lukas Tümmers*, Stefan Lehnert, Emily Feneberg, Babette Hinterleitner, Albert C. Ludolph, Markus Otto)

Beruflicher Werdegang:

Seit Januar 2016

Assistenzarzt in der Orthopädie und Unfallchirurgie des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart.