



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

# **Untersuchungen zur Proteinhomöostase in Modellen der Amyotrophen Lateralsklerose**

## **Diplomarbeit**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Diplom-Biologe**

(Dipl.-Biol.)

angefertigt am Institut für Pathobiochemie,  
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität

vorgelegt von **Benedikt Reiz**  
geboren am 30. August 1986 in Koblenz

Mainz, Dezember 2012

Dekan:

Professor Dr. Hans Zischler

Institut für Anthropologie

1. Gutachter:

PD Dr. Benjamin Altenhein

Institut für Genetik

2. Gutachter:

Professor Dr. Christian Behl

Institut für Pathobiochemie

There is a theory which states that if ever anyone discovers exactly what the Universe is for and why it is here, it will instantly disappear and be replaced by something even more bizarre and inexplicable. - There is another theory which states that this has already happened.

---

*Per Anhalter durch die Galaxis*  
- Douglas Noël Adams

Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen, sondern mit den Augen die Tür zu finden.

---

*Werner von Siemens*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Amyotrophe Lateralsklerose . . . . .	1
1.2	TDP-43 . . . . .	1
1.3	Autophagie . . . . .	1
1.4	Fragestellung und Zielsetzung . . . . .	1
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>2</b>
2.1	Material . . . . .	2
2.1.1	Verwendete Geräte . . . . .	2
2.1.2	Verwendete Chemikalien und Enzyme . . . . .	3
2.1.3	Verwendete Plastikwaren . . . . .	5
2.1.4	Verwendete Oligonukleotide . . . . .	6
2.1.5	Verwendete Antikörper . . . . .	7
2.1.6	Verwendete Organismen . . . . .	8
2.1.7	Verwendete Kits . . . . .	9
2.2	Methoden . . . . .	9
2.2.1	Zellbiologische Methoden . . . . .	9
2.2.1.1	Kultivierung der Zelllinien . . . . .	9
2.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl . . . . .	12
2.2.1.3	Transiente Transfektion mit der Kalziumphosphat-Methode . . . . .	12
2.2.1.4	Transiente Transfektion durch Elektroporation . . . . .	12
2.2.1.5	Ernten der Zellen . . . . .	12
2.2.1.6	Immunohistochemie . . . . .	12
2.2.1.7	Fotodokumentation . . . . .	13
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	13
2.2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	13
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>16</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>17</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>19</b>

## *Inhaltsverzeichnis*

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>20</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>21</b>
<b>Anhang</b>	<b>22</b>
<b>Danksagung</b>	<b>23</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>24</b>

# <sup>1</sup> **1 Einleitung**

## <sup>2</sup> **1.1 Amyotrophe Lateralsklerose**

## <sup>3</sup> **1.2 TDP-43**

## <sup>4</sup> **1.3 Autophagie**

## <sup>5</sup> **1.4 Fragestellung und Zielsetzung**

## 6 2 Material und Methoden

### 7 2.1 Material

#### 8 2.1.1 Verwendete Geräte

Name	Hersteller
Absaugsystem VacuSafe	Integra, Fernwald
Axiovert 2000 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
CLB-Transfection System	Biozym, Hessisch Oldendorf
Dampfsterilisator VarioClav	H+P, Oberschleißheim
Fusion-SL 3500.WL	Peqlab, Erlangen
Gefrierschränke -20°C	Liebherr, Kirchdorf
Heizbloc; Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Hera freeze HFC 486 Basic -80°C	Heraeus, Hanau
iCycler	Bio-Rad, München
Klimatisierte Brutschränke	Thermo, Dreieich
Kühlschränke 4°C	Liebherr, Kirchdorf
Laserscanning-Mikroskop; LSM 710	Carl Zeiss, Jena
Magnetrührer MR3000	Heidolph, Schwabach
Micro Ultrasonic Cell Disrupter	Fisher, Schwerte
Mikrotiterplattenlesegerät; Multiskan RC	Thermo Labsystems, Ulm
Mini PROTEAN III, Western Blotting System	Bio-Rad, München
Mini Trans-Blot Cell System	Bio-Rad, München
Netzteil Powerpac 300	Bio-Rad, München
PCR DNA Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz

Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Sorvall Zentrifuge	Sorvall/Thermo Scientific, Schwerte
Spektralphotometer; Nanodrop 1000	PeqLab, Erlangen
Stereomikroskop SZ61	Olympus, Hamburg
Sterilbank SterilGARD III Advence	The Baker Company, Sanford
Sterilbank U512	Heraeus, Hanau
Zentrifuge EBA 12	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Schwerte
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen

9

### 10 2.1.2 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Name	Hersteller
ABsolute SYBR Green Fluorescein	Thermo Scientific, Schwerte
Acrylamid/ Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat ( <a href="#">APS</a> )	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Pepton	Difco, Detroit (USA)
Bafilomycin A1	Alexis/Enzo, Lörrach
Bovines Serumalbumin ( <a href="#">BSA</a> )	Pierce, Bonn
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
4',6-Diamidin-2-phenylindol ( <a href="#">DAPI</a> )	Merck, Darmstadt
<a href="#">DEPC</a> -Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxynukleotidtriphosphate ( <a href="#">dNTPs</a> )	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid ( <a href="#">DMSO</a> )	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat ( <a href="#">Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></a> )	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium ( <a href="#">DMEM</a> )	Gibco, Karlsruhe
Elvanol	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen



## 2 Material und Methoden

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fötales bovines Serum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Geneticin (G-418)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hepes	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lambda Protein Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Luminol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
MG-132	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Microcystin LR	Enzo, Lörrach
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, München
$\text{NaN}_3$	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Paraphenylendiamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ZK PBS	Gibco, Karlsruhe
Penicillin	Gibco, Karlsruhe
PhosSTOP	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-L-Ornithin (PLO)	Roche, Mannheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protein G Sepharose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Proteinaseinhibitor Cocktail Complete Mini	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
	Roche, Mannheim

## 2 Material und Methoden

Rapamycin	Alexis/Enzo, Lörrach
Retinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
SensiMix SYBR & Fluorescein Kit	Bioline, Luckenwalde
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
SYTOX Orange	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Whatman Gel Blotting Papier	A.Hartenstein, Würzburg
Whatman-Protran Nitrozellulosemembran	A.Hartenstein, Würzburg
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

---

11

### 12 2.1.3 Verwendete Plastikwaren

Name	Hersteller
24-well Platten 2 cm <sup>2</sup>	Greiner, Frickenhausen
ABsolute QPCR Seal	Thermo Scientific, Dreieich
Gel Saver II Tip 1-100 µl	Starlab, Hamburg
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago
PCR Plastik	Thermo Scientific, Dreieich
Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl und 1000 µl	Starlab, Hamburg
Pipettenspitzen gest.10 µl, 20 µl, 200 µl und 1000 µl	Greiner, Frickenhausen
Quali- Low Retention Reaktionsgefäße 1,7 ml	Kisker, Steinfurth
Reaktionsgefäße 15 ml and 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	A. Hartenstein, Würzburg
Zellkulturschalen Cell Star 6 cm, 10 cm, 15 cm	Greiner, Frickenhausen
Zellspachtel 99010	TPP, Trasadingen

#### 13 2.1.4 Verwendete Oligonukleotide

**Tab. 2.1:** Verwendete Oligonukleotide für quantitative Real Time PCR-Analysen

Oligonukleotidname	Oligonukleotidsequenz 5'-3'
hrmGAPDH_RT_for	GCA CCA CCA ACT GCT TAG CAC
hrmGAPDH_RT_rev	CAC CAC CTT CTT GAT GTC ATC
RT_h/ms_L19_for	GAA ATC GCC AAT GCC AAC TC
RT_h/ms_L19_rev	TTC CTT GGT CTT AGA CCT GCG
RT_musTDP_for	AAT CAG GGT GGG TTT GGT AAC A
RT_musTDP_rev	GCT GGG TTA ATG CTA AAA GCA C

**Tab. 2.2:** Verwendete Oligonukleotide für siRNA-Experimente

Oligonukleotidname	Oligonukleotidsequenz 5'-3'	Anwendung
ns_siRNA	AUU CUC CGA ACG UGU CAC G	nonsense siRNA
siEGFP #1	GCA GCA CGA CUU CUU CAA G	siRNA gg. eGFP
siEGFP #3	CAG CCA CAA CGU CUA UAU C	siRNA gg. eGFP
siTDP_ms_a	GCU GAA GAG CUU CAG CAG U	siRNA gg. Murines TDP-43
siTDP_ms_b	UCA GUA UGG AGA AGU GGU A	siRNA gg. Murines TDP-43

**Tab. 2.3:** Verwendete Vektoren und Plasmide

Vektor	Verwendung	Hersteller
peGFP-N1	zelluläre Expression	Clontech, Basel
pFLAG-TDP-43 <sup>G290A</sup> -N1	zelluläre Expression	Heike Wolf, AG Behl
pFLAG-TDP-43 <sup>Q331K</sup> -N1	zelluläre Expression	Heike Wolf, AG Behl
pFLAG-TDP-43 <sup>WT</sup> -N1	zelluläre Expression	Heike Wolf, AG Behl
pTDP-43 <sup>G290A</sup> -eGFP-N1	zelluläre Expression	Heidrun Witan, AG Behl
pTDP-43 <sup>Q331K</sup> -eGFP-N1	zelluläre Expression	Heidrun Witan, AG Behl
pTDP-43 <sup>WT</sup> -eGFP-N1	zelluläre Expression	Heidrun Witan, AG Behl

## 14 2.1.5 Verwendete Antikörper

**Tab. 2.4:** Primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-FLAG	Maus (mk)	1:1000 <b>WB</b> 1:100 <b>IHC</b>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-GFP	Maus (mk)	1:1000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Lamp1	Ratte (pk)	1:200 <b>IHC</b>	DSHB, Departement of Biology, University of Iowa (USA)
anti-LC3 (Klon 2G6)	Maus (mk)	1:1000	Nano Tools, Tenningen
anti-mTOR	Kaninchen (mk)	in IP	Cell Signaling/NEB, FFM
anti-mTOR	Maus (mk)	1:1000	Merck Millipore, Darmstadt
anti-phospho-TDP-43	Kaninchen (pk)	1:1000	Proteintech Group, Manchester (UK)
anti-TDP-43	Kaninchen (pk)	1:1000	Proteintech Group, Manchester (UK)
anti-TDP-43	Kaninchen (pk)	1:1000	Abcam, Cambridge (UK)
anti- $\alpha$ -Tubulin	Maus (mk)	1:5000 <b>WB</b> 1:500 <b>IHC</b>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IgG aus Mausserum	Maus	in IP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

**Tab. 2.5:** Sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
anti-Kaninchen	Esel	HRP	1:10000	Jackson Immuno Research, Newmarket (UK)
anti-Maus	Esel	HRP	1:10000	Jackson Immuno Research, Newmarket (UK)
anti-Maus-Cy2	Esel	<b>Cy2</b>	1:200	Jackson Immuno Research, Newmarket (UK)
Anti-Maus-Cy5	Esel	<b>Cy5</b>	1:200	Jackson Immuno Research, Newmarket (UK)
Anti-Ratte-Cy2	Esel	<b>Cy2</b>	1:100	Jackson Immuno Research, Newmarket (UK)

## 15 2.1.6 Verwendete Organismen

Name	Hersteller
Escherichia coli (E. coli) DH5 $\alpha$ , chemisch kompetent	New Engand BioLabs; Frankfurt
HEK293T-Zellen	American Type Culture Collection; Manassas (USA)
N2A-Zellen	American Type Culture Collection; Manassas (USA)
N2A-TDP-43 <sup>WT</sup>	Heike Wolf, AG Behl
N2A-TDP-43 <sup>G290A</sup>	Heike Wolf, AG Behl
N2A-TDP-43 <sup>Q331K</sup>	Heike Wolf, AG Behl
HEK293A-ptfLC3	Christof Hiebel, AG Behl

## 16 2.1.7 Verwendete Kits

Name	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce/Thermo, Bonn
CBA055 K-LISA mTOR Activity Kit	Calbiochem/Merck, Darmstadt
JetStar 2.0 Maxi Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Mouse Autophagy Primer Library	Real Time Primes, Elkins Park (USA)
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden

## 17 2.2 Methoden

### 18 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 19 2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

20 Für diese Diplomarbeit wurden folgende Zelllinien verwendet. Die murine Neuroblastomli-  
 21 nie N2A (ATCC CCL-131) und die drei, von Heike Wolf (AG Behl) daraus hergestellten,  
 22 Linien welche stabil humane TDP-43-eGFP Konstrukte im peGFP-N1 Vektor exprimieren.

Dabei handelt es sich zum Einen um wildtypisches transactive response DNA-binding protein in 43 (TDP-43) (N2A-TDP-43<sup>WT</sup>) und zum Anderen um zwei mutante Formen (N2A-TDP-43<sup>G290A</sup> und N2A-TDP-43<sup>Q331K</sup>). Diese besitzen eine Aminosäuresubstitution von Glycin zu Alanin an Position 290 (G290A) beziehungsweise (bzw.) von Glutamin zu Lysin an Position 331 (Q331K). Beide Mutationen wurden auch für ALS-Patienten beschrieben und liegen im C-terminalen Bereich des Proteins (Sreedharan et al., 2008; van Deerlin et al., 2008). Im weiteren Verlauf der Arbeit werden diese Zelllinien der Einfachheit halber als WT, G290A und Q331K bezeichnet. Die nicht transgenen, nativen N2A-Zellen als N2A. Des weiteren wurden für Immunohistochemische Untersuchungen zwei human embryonic kidney (HEK)-Zelllinien verwendet: HEK293T-Zellen (ATCC CRL-11268) und stabile HEK293A-ptfLC3 (Christof Hiebel, AG Behl). Letztere exprimieren stabil das Plasmid ptfLC3 (peGFP-C1+RFP-LC3b, Addgene).

Die Kultivierung der klonalen Linien erfolgte bei 37 °C in einem 5 % CO<sub>2</sub>-humidifizierten Brutschrank in Komplettmedium. Die Zellen wurden jeden zweiten bis dritten Tag in entsprechender Verdünnung auf neue Zellkulturschalen überführt (passagiert). Hierzu wurden die zu ca. 75 % konfluenten Schalen zunächst einmal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml 1x Trypsin für ca. 30 s inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 4 ml Komplettmedium von den Kulturschalen gespült und bei Raumtemperatur für 4 Minuten bei 311 g 311 abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 37 °C warmen Komplettmedium aufgenommen und resuspendiert. Abschließend wurden die entsprechenden Verdünnungen aus Zellkulturschalen ausplattiert. Um alterungsbedingte Veränderungen der Zellen zu vermeiden wurden sie maximal bis zur zwanzigsten Passage genutzt.

Den stabilen Linien N2A-TDP-43<sup>WT</sup>, N2A-TDP-43<sup>G290A</sup> und N2A-TDP-43<sup>Q331K</sup> wurde während der Kultivierung ständig 600 µg/ml Geneticin (G-418) zur Selektionierung zugegeben. Für die HEK293A-ptfLC3-Zellen wurde kein Penicillin/ Streptomycin im Medium verwendet.

### Komplettmedium

Phenolrothaltiges Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)  
10 % [V/V] aktives Fötales bovines Serum (FBS)  
1 % [V/V] Natriumpyruvat  
100 U/ml Penicillin  
100 U/ml Streptomycin

56 **1x Trypsinlösung (pH 7,4)**

57 0,05 % [m/V] Trypsin

58 0,01 % [m/V] Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

59 137 mM NaCl

60 2,7 mM KCl

61 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Anhydrat

62 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

63



64 Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in 10 % DMSO enthaltendem Kompletmedium  
65 bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und 48 Stunden später in flüssigen Stickstoff überführt. Um die Zel-  
66 len zu rekultivieren, wurden sie unter ständiger Bewegung in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad  
67 aufgetaut, in 10 ml Kompletmedium aufgenommen, abzentrifugiert und dann in neuem Me-  
68 dium aus neue Zellkulturschalen ausplattiert. Die ersten Versuche mit den Zellen wurden nach  
69 3 Passagierungen durchgeführt.

### 70 2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

### 71 2.2.1.3 Transiente Transfektion mit der Kalziumphosphat-Methode

### 72 2.2.1.4 Transiente Transfektion durch Elektroporation

73 anschließend auf Deckgläschen

### 74 2.2.1.5 Ernten der Zellen

75 1x PBS (pH 7,4)

76 137 mM NaCl

77 2,7 mM KCl

78 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Anhydrat

79 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

80

### 81 2.2.1.6 Immunohistochemie

82 Zur *in situ*-Detektion von Proteinen in Zellen wurde die Immunohistochemie genutzt. Dazu  
83 wurden die Zellen in gewünschter Dichte entweder in Kompletmedium oder Differenzie-  
84 rungsmedium auf Deckgläschen ausplattiert und kultiviert. Für die HEK293A-ptfLC3-Zellen  
85 wurde dem Medium kein Penicillin/ Streptomycin zugesetzt und die Deckgläschen wurden vor  
86 Verwendung mit Poly-L-Ornithin (PLO) beschichtet. Hierzu wurden sie eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$   
87 mit PLO, in einer 1:100 Verdünnung, inkubiert und anschließend zweimal mit 1x PBS gewa-  
88 schen. Transiente Transfektionen mit der Kalziumphosphat-Methode wurden nach 24 Stunden  
89 durchgeführt. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion (Kalziumphosphat) bzw.  
90 72 Stunden nach Ausplattierung (Elektroporation) mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert  
91 (15 min) und anschließend dreimal für zehn Minuten mit 1x PBS gewaschen. Anschließend  
92 wurden entweder Antikörperfärbungen durchgeführt, oder die Deckgläschen wurden mit Ein-  
93 deckmedium auf den Objektträgern platziert und mit Nagellack fixiert.

Für die Färbung wurden die Zellen mit dem entsprechenden Primärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit den zugehörigen Carbocyanin 2 (Cy2)- oder Carbocyanin 5 (Cy5)- gekoppelten Sekundärantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Antikörper wurden jeweils in Verdünnungspuffer angesetzt. Eine abschließende Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) [1:100 in 1x PBS, 15 min, RT, dunkel] oder SYTOX Orange [1:100.000 in 1x PBS, 10 min, RT, dunkel] färbte die Zellkerne. Zuletzt wurden die Deckgläschen nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x PBS, mit Eindeckmedium auf den Objektträgern platziert und mit Nagellack fixiert.

### **Verdünnungspuffer**

10 % FBS

in 1x PBS

### **Eindeckmedium (pH 8,0)**

1 g Elvanol

7 ml 1x PBS

3 ml Glycerol

10 mg Paraphenylendiamin

### **2.2.1.7 Fotodokumentation**

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

## **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

## 116 **3 Ergebnisse**

## 117 **4 Diskussion**

## <sup>118</sup> **5 Zusammenfassung**

# Literaturverzeichnis

119

120 van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM et al. (2008). Tardbp mutations in amyotrophic la-  
121 teral sclerosis with tdp-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet*  
122 *neurology*, 7(5):409–416.

123 Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB et al. (2008). Tdp-43 mutations in familial and sporadic  
124 amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5870):1668–1672.



## 125 Abkürzungsverzeichnis

126	<b>ALS</b>	Amyotrophe Lateralsklerose
127	<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
128	<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
129	<b>bzw.</b>	beziehungsweise
130	<b>°C</b>	Grad Celsius
131	<b>ca.</b>	circa
132	<b>CO<sub>2</sub></b>	[Kohlendioxid
133	<b>Cy2</b>	Carbocyanin 2
134	<b>Cy5</b>	Carbocyanin 5
135	<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
136	<b>DEPC</b>	Diethyldicarbonat
137	<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
138	<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
139	<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
140	<b>dNTP</b>	Desoxynukleotidtriphosphat
141	<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
142	<b>eGFP</b>	enhanced green fluorescent protein
143	<b>FBS</b>	Fötales bovines Serum
144	<b>g</b>	Erdbeschleunigung
145	<b>G-418</b>	Geneticin
146	<b>GFP</b>	green fluorescent protein
147	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
148	<b>HCl</b>	Salzsäure
149	<b>HEK</b>	human embryonic kidney
150	<b>IHC</b>	Immunohistochemie
151	<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
152	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
153	<b>MG-132</b>	carbobenzoxy-leucyl-leucyl-leucinal, ZLLLal
154	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
155	<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumhydrogenphosphat
	<b>NaCl</b>	Natriumchlorid



# <sup>168</sup> **Abbildungsverzeichnis**

# Tabellenverzeichnis

170	2.1	Verwendete Oligonukleotide für quantitative Real Time PCR-Analysen . . .	6
171	2.2	Verwendete Oligonukleotide für siRNA-Experimente . . . . .	7
172	2.3	Verwendete Vektoren und Plasmide . . . . .	7
173	2.4	Primäre Antikörper . . . . .	8
174	2.5	Sekundäre Antikörper . . . . .	8

# 175 **Anhang**

# <sup>176</sup> Danksagung

# <sup>177</sup> Eidesstattliche Erklärung

<sup>178</sup> Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich, Benedikt Reiz, die vorliegende Diplomarbeit  
<sup>179</sup> selbständig verfasst und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und  
<sup>180</sup> Hilfsmittel angefertigt habe.

<sup>181</sup> Mainz, 26. Oktober 2012

<sup>182</sup> \_\_\_\_\_

<sup>183</sup> Benedikt Reiz