

Universität Bielefeld

Fakultät für Physik

**Rasterkraftmikroskopische Untersuchung
der *in vitro* Assemblierung und Struktur
des Intermediärfilaments Desmin**

Diplomarbeit

vorgelegt von

Mareike Dieding

9. Juni 2011

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dario Anselmetti
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas R. Huser

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt und sämtliche verwendeten Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche erwähnt und kenntlich gemacht zu haben.

Mareike Dieding, Bielefeld, 09.06.2011

Danksagung

Selbstverständlich ist das Zustandekommen dieser Arbeit nicht ohne die vielfältige und großzügige Unterstützung von verschiedenen Personen denkbar.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti. Er hat es mir ermöglicht diese Arbeit unter ausgezeichneten Arbeitsbedingungen durchzuführen und hat stets sehr großes Interesse am Fortschritt der Arbeit gezeigt.

Herrn Prof. Dr. Thomas R. Huser danke ich für seine freundliche Bereitschaft, das Zweitgutachten zu erstellen.

Ich danke Herrn Dr. Volker Walhorn für die beispielhafte Betreuung und die vielen feinfühlig und wertvollen Diskussionen.

Andreas Brodehl bin ich für seine vielfältige Unterstützung dankbar. Ein Großteil der Arbeit lag in der Expression und Reinigung der Proteine, die er durchgeführt hat. Die Fragestellung der Arbeit ist durch sein großes Interesse an physikalischen Methoden entstanden. Die enge und freundschaftliche Zusammenarbeit, habe ich stets als angenehm und motivierend empfunden.

Herrn PD Dr. Hendrik Milting vom Herz- und Diabeteszentrum NRW in Bad Oeynhausens danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Für die vielen Fragen zwischendurch und die nette Atmosphäre danke ich meinen Bürokollegen, im Besonderen Sebastian Zünkeler der immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Alexander Harder danke ich für die Hilfestellung beim AFM und Christoph Pelargus für den technischen Support.

Die netten und zum Teil freundschaftlichen Beziehungen innerhalb der gesamten Arbeitsgruppe schufen ein hervorragendes Arbeitsklima, daher ein Danke an alle.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Volker Walhorn, Sebastian Zünkeler, Andreas Brodehl und besonders Svenja Krüger, die sich trotz umständlicher Formulierungen durch diese Arbeit gekämpft und zur Lesbarkeit beigetragen hat.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während des gesamten Studiums.

Einleitung

Das in dieser Arbeit im Fokus stehende Protein Desmin ist ein Intermediärfilament (IF) des Cytoskeletts in Muskelzellen. Seit Jahren wird eine Vielzahl von Desmin-Mutationen mit Skelett- und Herzmuskelerkrankungen assoziiert. Viele der krankheitsauslösenden Desmin-Mutationen sind in evolutionär hoch konservierten Regionen des Desmin-Gens lokalisiert. Kürzlich wurden Desmin-Mutationen mit ARVC (Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie) in Zusammenhang gebracht (Klauke u. a., 2010; van Tintelen u. a., 2009; Otten u. a., 2010). ARVC ist eine angeborene Herzmuskelkrankheit. Sie äußert sich klinisch durch lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen und ist ein häufiger Grund für den plötzlichen Herztod bei jungen Menschen und Sportlern (Maron und Pelliccia, 2006).

Auch wenn es Fortschritte im Bezug auf das Wissen über die zelluläre Funktion von Desmin innerhalb des Cytoskeletts gibt, sind die Auswirkungen der einzelnen Mutationen bisher unzureichend verstanden. Die Kenntnisse über den Assemblierungsprozess des Desmin-ähnlichen IF-Protein Vimentin ermöglichen es, die Wirkung der Desmin-Mutation auf die Assemblierung abzuleiten.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, den Einfluss der einzelnen Mutationen auf Assemblierung und Struktur zu untersuchen. Der Desmin Wildtyp (WT) und sechs Desmin-Mutanten, die mit ARVC assoziiert sind, werden mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM, *atomic force microscopy*) analysiert. Dieses eignet sich besonders, die Struktur der Desmin-Filamente im Detail abzubilden. Hierzu wird das Desmin rekombinant in *E. coli*-Bakterien exprimiert, *in vitro* assembliert und auf einem Substrat immobilisiert.

Zusätzliche Anhaltspunkte bieten die in Kooperation mit dem Herz- und Diabeteszentrum NRW entstandenen Fluoreszenz-Aufnahmen von Desmin-transfizierten Zellen. Sie ermöglichen einen direkten Vergleich zwischen *in vitro* und *in vivo* Assemblierung.

Inhaltsverzeichnis

1 Grundlagen	1
1.1 Intermediärfilament-Proteine	1
1.1.1 Struktur	1
1.1.2 <i>in vitro</i> Assemblierung	2
1.1.3 Desmin Funktion	3
1.2 Desmin-Mutation als Ursache für Myopathien	4
1.2.1 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	5
1.2.2 Desmin-Mutationen	6
1.3 Rasterkraftmikroskopie	9
1.3.1 Tapping Modus	11
2 Material & Methoden	14
2.1 Desmin Expression und Reinigung	14
2.2 Desmin <i>WT_P</i>	15
2.3 Faltung und Assemblierung	16
2.4 Reproduzierbarkeit der Messungen	16
2.5 Puffer	16
2.6 Rasterkraftmikroskopie	17
2.6.1 Mikroskop	17
2.6.2 Substrate & Immobilisierung	17
2.6.3 Vergleich der Substrate	19
2.6.4 Bearbeitung der Rohdaten	20
3 Ergebnisse	22
3.1 Protein Lagerung	22
3.2 Verschiedene Substrate	24
3.3 Strukturuntersuchungen des Desmin Wildtyps und der Mutanten	25
3.3.1 ...vor der Assemblierung	26

Inhaltsverzeichnis

3.3.2	...nach der Assemblierung	36
3.4	Einfluss der Assemblierungszeit	49
3.4.1	Desmin WT	49
3.4.2	Desmin S13F	52
3.5	Desmin transfizierte Zellen	52
4	Diskussion	54
4.1	Desmin Assemblierung	54
4.2	Vergleich Desmin WT und Mutanten	55
4.3	Zusammenfassung & Ausblick	56

Abkürzungsverzeichnis

AFM	<i>atomic force microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie
APTES	3-Aminopropyltriethoxy Silan
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie, <i>arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy</i>
AS	Aminosäure
DES	Desmin-Gen
DRM	<i>desmin-related myopathy</i>
EM	Elektronenmikroskopie
IF	Intermediärfilament
MPL	<i>mass per length</i>
RMS	<i>root mean square</i>
RT	Raumtemperatur
SAXS	<i>small angle X-ray scattering</i>
STM	<i>scanning tunneling microscopy</i> , Rastertunnelmikroskopie
TSG	<i>Template-Striped Gold</i>
ULF	<i>Unit length filament</i>
WT	<i>wild-type</i> , Wildtyp

1 Grundlagen

1.1 Intermediärfilament-Proteine

Das Cytoskelett eukariotischer Zellen setzt sich aus drei verschiedenen Typen von Filamentnetzwerken zusammen: Aktinfilamente, Intermediärfilamente (IF) und Mikrotubuli. Der Name Intermediärfilament rührt daher, dass der Durchmesser der IF (~10 nm) zwischen dem der Aktinfilamente (~7 nm) und dem der Mikrotubuli (~25 nm) liegt. Der Durchmesser von etwa 10 nm wurde mittels Elektronenmikroskopie (EM) bestimmt (Ishikawa, 1968; Hynes und Destree, 1978).

IF werden in sechs Klassen unterteilt: saure und basische Keratine (Typ I & Typ II); Desmin, Vimentin, Saures Glialfaserprotein und Peripherin (Typ III); Neurofilament-Proteine (Typ IV); Lamine (Typ V) und Filamente der Augenlinse (Typ VI) (Fuchs und Weber, 1994; Szeverenyi u. a., 2008).

Die unterschiedlichen IF weisen Homologien in ihrer Primärstruktur auf, so stimmen bei Intermediärfilamenten des Typs III die Aminosäuresequenzen untereinander (z.B. Desmin und Vimentin) in über 70% überein (Geisler u. a., 1982). Im Vergleich von Typ I und II mit Typ III finden sich nur Übereinstimmungen von 25-40% (Fuchs und Weber, 1994). Trotz der unterschiedlichen Überschneidungsmengen in der Primärstruktur ist die Sekundärstruktur für alle IF charakteristisch.

1.1.1 Struktur

Zentraler Kern in der Sekundärstruktur von IF ist die etwa 45 nm lange α -helikale Domäne (*Rod*), welche von nicht-helikalen¹ N- und C-terminalen Domänen (*Head* und *Tail*) flankiert wird. Die *Rod*-Domäne wird von drei nicht-helikalen Linkerregionen unterbrochen, die verbleibenden vier helikalen Segmente werden 1A, 1B, 2A und 2B genannt (s. Abb. 1.1).

¹Bei Desmin sind die *Head*- und *Tail*-Domänen globulär.

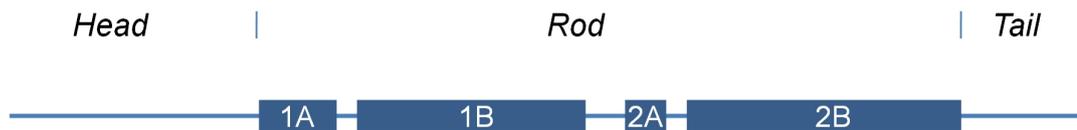


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Domänen in der Sekundärstruktur von IF.

Zwei Monomere fügen sich parallel zu einem so genannten *coiled-coil* zusammen, bei der sich die α -helikalen Domänen um eine gemeinsame Achse winden (s. Abb. 1.2). Diese *coiled-coil* Dimere sind die Grundbausteine für die *in vitro* Assoziation zu Filamenten. Unter geringer Ionenstärke und physiologischem pH-Wert bilden sie Tetramere, die aus zwei antiparallel angeordneten Dimeren bestehen. Im ausgereiften Filament liegen die Tetramere nahezu parallel zur Filamentachse. Wegen der antiparallelen Anordnung der polaren Dimere sind die Tetramere apolar, daher sind auch die ausgebildeten IF, im Gegensatz zu den Mikrotubuli und den Aktinfilamenten, apolar (Herrmann u. a., 2007).

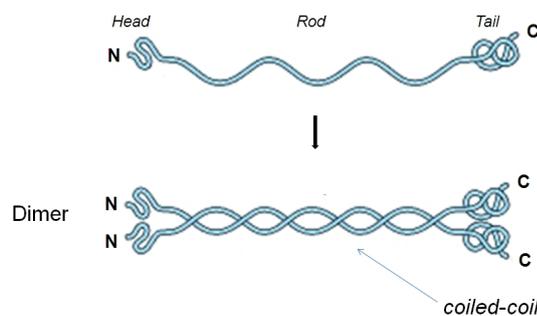


Abbildung 1.2: Darstellung der *coiled-coil*-Struktur in Dimeren (vgl. Cooper, 2000).

1.1.2 *in vitro* Assemblierung

Eine charakteristische Eigenschaft von IF ist ihre Fähigkeit, *in vitro* unter physiologischen Bedingungen (ohne Hilfe von Kofaktoren) zu assemblieren.

In Herrmann u. a. (2007) werden cytoplasmatische IF in zwei Assemblierungsgruppen eingeteilt: Keratin und Vimentin-ähnliche IF Proteine, zu denen Desmin gehört. Keratine assemblieren zu heteropolymeren Dimeren, die sich aus einem basischen und einem sauren Monomer zusammensetzen. Im Gegensatz dazu können Vimentin-ähnliche Proteine homopolymere Dimere bilden. Weiterhin können sie *in vivo* und *in vitro* zu heteropolymeren Dimeren assoziieren. Diese setzen sich aus Proteinen derselben Assemblierungsgruppe zusammen (Herrmann u. a., 2007; Fuchs und Weber, 1994).

Die Abbildung 1.3 zeigt schematisch die Assemblierung der zweiten Assemblierungsgruppe. Die Assemblierung setzt bei der schrittweisen Dialyse aus ureahaltigem Puffer in Tris-HCl-Puffer (pH 8.4) oder Phosphatpuffer (pH 7.5) ein. Herrmann und Aebi (2004) beschreiben nach der Dialyse in einen Puffer mit geringer Ionenstärke ein „einfrieren“ des Vimentin im Tetramer-Status. Kirmse u. a. (2010) zeigten diese Tetramerbildung auch mit Desmin und 2 mM Phosphatpuffer (pH 7,5 und 1 mM DTT).

Die Assemblierung von Tetrameren bis zum ausgebildeten Filament wird durch Erhöhung der Salzkonzentration initiiert. Tetramere der zweiten Assemblierungsgruppe assoziieren lateral zu etwa 60 nm langen Filamenten, den *unit-length filaments* (ULFs).²

Anschließend folgt eine Phase, in der die ULFs zu langen Filamenten wachsen. Ein kinetisches Model wurde von Kirmse u. a. (2007) vorgestellt.

Mass-per-length (MPL) Untersuchungen per EM an ULFs und ausgebildeten Filamenten zeigen eine heterogene Molekülanzahl sowohl zwischen verschiedenen IF als auch innerhalb der Filamente selbst (Harald Herrmann u. a., 1999). Des Weiteren wurde mehrfach eine zeitabhängige Komprimierung der Filamente beobachtet. Von Stromer u. a. (1987) wurde eine Temperatur- und ionenabhängige EM-Messung der Radien an Desmin durchgeführt, dabei wurde ein durchschnittlicher Durchmesser von 14,9 nm nach 5 min und 13,6 nm nach 60 min Assemblierungszeit beobachtet.

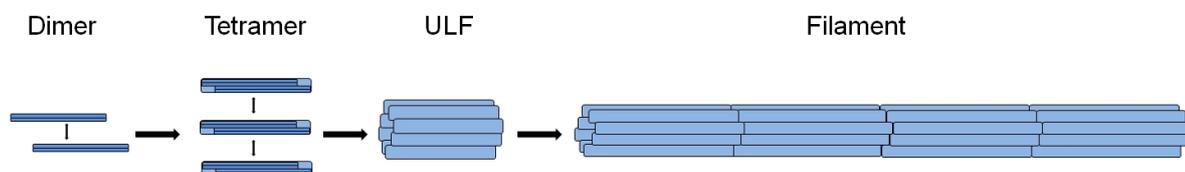


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Assoziation zu Filamenten (Assemblierungsgruppe 2). Zwei antiparallel versetzte Dimere bilden das Tetramer. Die laterale Vereinigung von mehreren Tetrameren ergeben ein ULF. Die ULFs fügen sich longitudinal zu Filamenten.

1.1.3 Desmin Funktion

Desmin ist das wichtigste IF in allen Muskelzellen. Es wird im glatten Muskel, im Skelett-Muskel und im Herz-Muskel exprimiert und ist ein struktureller Bestandteil des Cytoskeletts. Außerhalb der Sarkomere bilden die Desmin-Filamente ein Netzwerk und

²Wie SAXS (*small angle X-Ray scattering*) Untersuchungen mit Vimentin zeigen, werden ULFs in Bruchteilen von Sekunden gebildet (Sokolova u. a., 2006; Brennich u. a., 2011).

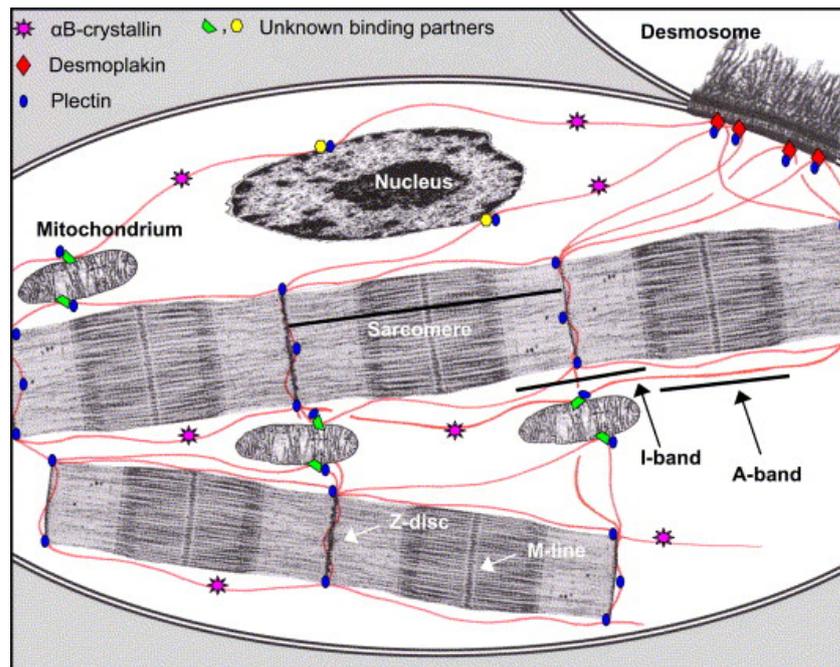


Abbildung 1.4: Schematisches Modell zur Darstellung der Lokalisation von Desmin in einer Muskelzelle. Desmin-Filamente verbinden die Z-Scheiben benachbarter Myofibrillen, Mitochondrien und den Zellkern miteinander. Des Weiteren binden sie an Desmosomen (bei Herzmuskelzellen), welche die einzelnen Muskelzellen verbinden. Auf diese Weise sorgt Desmin für die interzelluläre mechanische Integrität (Mit freundlicher Genehmigung aus: Bär u. a. (2004)).

verbinden die benachbarten Z-Scheiben der Myofibrille sowie die Myofibrillen untereinander. Darüber hinaus verbinden sie das myofibrillare System mit dem Zellkern und den Desmosomen, welche den Zell-Zell-Kontakt in Herzmuskelzellen herstellen (s. Abb. 1.4).

1.2 Desmin-Mutation als Ursache für Myopathien

Muskelerkrankungen werden als Myopathie bezeichnet. Stehen diese in Verbindung mit Desmin werden sie als Desminopathie oder *desmin-related myopathies* (DRM) bezeichnet. Symptomatisches Kennzeichen dieser Krankheit ist eine Schwächung der Muskulatur, die in den unteren Extremitäten beginnt und sich weiter in der Rumpf-, Hals-, Gesichts- und Atemmuskulatur ausbreitet. In einigen Fällen manifestiert sich DRM als unaufhaltsam fortschreitende Skelettmypathie ohne Anzeichen von Herz-Beteiligung, in anderen Fällen ist eine Kardiomyopathie der führende oder auch exklusive Befund (Goldfarb, 2004). Histologische Schnitte der betroffenen Skelett- und Herzmuskeln weisen

abnorme Bereiche mit granularem und granularfilamentartigem Material auf. Immunohistologische Untersuchungen zeigen, dass diese Bereiche aggregiertes Desmin enthalten (Goebel, 1995).

Dies kann durch Mutationen im Desmin hervorgerufen werden (Goldfarb u. a., 1998; Munoz-Marmol, 1998), aber auch durch Mutationen in α B-Cristallin (Fardeau u. a., 2000; Vicart u. a., 1998). α B-Cristallin gehört zur Familie der Hitzeschockproteine mit Chaperon-ähnlicher Funktion (Bassuk, 1997; Perng u. a., 1999). Es wird angenommen, dass es das Desmin stabilisiert und vor Aggregation schützt. Mutationen im α B-Cristallin-Gen sind ursächlich für eine Coaggregation mit Desmin und werden daher den DRM zugeordnet (Goldfarb and Dalakas, 2009).

1.2.1 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

Die Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine Herzmuskelkrankheit, die meist familiengebunden auftritt. Klinisch äußert sich ARVC durch schwere Funktionsstörungen der rechten Herzkammer (Ventrikel), lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen und plötzlichen Herztod, besonders bei jungen Menschen und Sportlern. Die Abbildung 1.5 zeigt den rechten Ventrikel eines betroffenen Herzens und den fortschreitenden Verlust von Kardiomyocyten, die durch Fett- und Bindegewebszellen ersetzt werden.



Abbildung 1.5: ARVC ist durch den pathologischen Ersatz von Kardiomyocyten durch fibrotisches Gewebe (weiße Stellen innerhalb der Ventrikelwand) charakterisiert (Abb. bereitgestellt von: E. & H. Klessmann Institut).

Typischerweise werden in desmosomalen Genen ARVC auslösende Mutationen identifiziert. Etwa 50% der betroffenen Patienten tragen Mutationen in diesen Genen (Awad u. a., 2008). In Abbildung 1.6 ist der schematische Aufbau der Desmosomen verdeutlicht. Auf der cytoplasmatischen Seite benachbarter Zellen befinden sich Haftplatten,

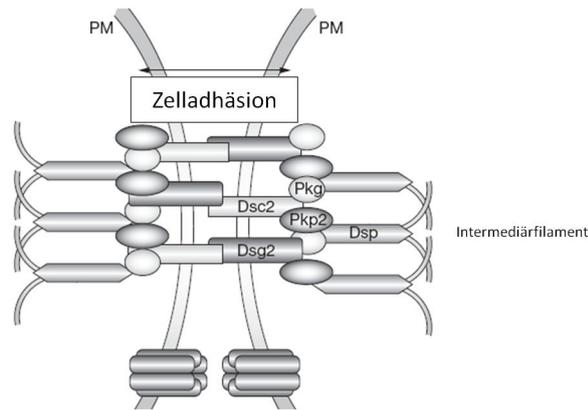


Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau von Desmosomen. Abkürzungen: Dsc2, Desmocollin-2; Dsg2, Desmoglein-2; Dsp, Desmoplakin; Pkg, Plakoglobin; Pkp2, Plakophilin-2; PM, Plasmamembran (vgl. Awad u. a., 2008).

die hauptsächlich aus Plakoglobin bestehen. Die Haftplatten sind auf der einen Seite durch Transmembranproteine (Desmoglein und Desmocollin) mit der Nachbarzelle und auf der anderen Seite über Intermediärfilamente mit dem Cytoskelett der Zelle verbunden. Mechanisch stark beanspruchte Zellen, wie Epithelzellen oder Muskelzellen, können so Scherkräfte auf den gesamten Zellverbund verteilen (Lodish und Lange, 2001). In Herzmuskelzellen sind Desmosomen mit dem IF, bestehend aus Desmin, verbunden.

Mutationen im Desmin führen zu einem breiten Spektrum von Myopathien und im Besonderen zu Kardiomyopathien, welche mit Herzrhythmusstörungen und rechtsventrikulären Versagen einhergehen können. Kürzlich gefundene Desmin-Mutationen bei Patienten mit ARVC Phänotyp deuten darauf hin, dass auch Desmin-Mutationen ursächlich für ARVC sind und beim epidemiologischen *Screening* miteinbezogen werden sollten (Klauke u. a., 2010; van Tintelen u. a., 2009; Otten u. a., 2010).

1.2.2 Desmin-Mutationen

Die im Folgenden aufgeführten sechs Mutationen stehen im Zusammenhang mit ARVC. Grundlage für eine ARVC-Diagnose sind die *Task force criteria*, dies ist eine Auflistung aller Haupt- und Nebenkriterien, die zu einer Diagnose herangezogen werden (s. Cox u. a., 2010; ARVD.COM, 08.03.2011). In der Literatur wird im Zusammenhang mit Desmin-Mutationen zwischen dem ARVC- und ARVC(-ähnlichem)-Phänotyp unterschieden. Bei dem ARVC-Phänotyp sind ausreichend Kriterien für die eindeutige ARVC-Diagnose erfüllt, bei dem ARVC(-ähnlichem) nur einige, so dass eine Erkrankung an ARVC nicht

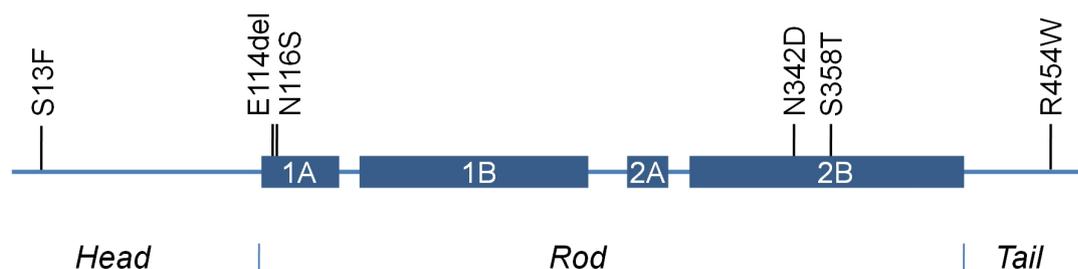


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Aminosäurekette (470 AS) von Desmin und die Positionen der untersuchten Mutationen.

ausgeschlossen werden kann.

Fünf von den aufgeführten Mutationen sind Punktmutationen, d.h. dass sich nur eine Base im Gen verändert. In diesen fünf Fällen resultiert eine *Missense*-Mutation, durch die das veränderte Codon für eine andere Aminosäure (AS) codiert. Welche AS ausgetauscht wird, kann an der Bezeichnung der Mutation abgelesen werden. Zum Beispiel ist N116S ein Austausch der Aminosäure Asparagin (N) gegen Serin (S), 116 steht für die Position in der Aminosäurekette ausgehend vom N-Terminus.

Die sechste Mutation ist die *Deletions*-Mutation E114del, diese führt zu einer Deletion des Glutamat 114-Restes.

N116S und S358T

Klauke u. a. (2010) untersuchten 22 ARVC-Patienten auf Mutationen in desmosomalen Genen und im Desmin-Gen (DES). Bei einem Patienten fanden sie die Punktmutation N116S in Desmin. Mutationen in desmosomalen Genen konnten ausgeschlossen werden. DNA-Screenings der Familie zeigten, dass N116S eine spontane Mutation ist. Sie liegt in dem 1A Segment der *Rod*-Domäne und ist absolut konserviert in den IF von Eukarioten.

Ferner konnte eine weitere Desmin Variation³ eines ARVC Patienten nachgewiesen werden. Diese Variation S358T ist bisher noch nicht veröffentlicht, da noch nicht abschließend geklärt ist, ob sie krankheitsauslösend ist. S358 liegt in dem 2B Segment der *Rod*-Domäne (s. Abb. 1.7).

³Die Mutation bezeichnet eine Genveränderung, die vom „Normalen“ abweicht, es kann aber durchaus mehrere Variationen des Gens geben. Erst wenn die Variation in unter ein Prozent der Population vorkommt, wird sie als Mutation bezeichnet. In dieser Arbeit werden Desmin WT und Mutationen gegenübergestellt, wobei die S358T mit einbezogen wird. Obwohl diese faktisch nicht als Mutation bezeichnet werden darf, da die Häufigkeit, mit der diese Variation auftritt, noch nicht untersucht wurde.

S13F

Peter van Tintelen (van Tintelen u. a., 2009) untersuchte 27 Personen aus fünf Familien mit der identischen Punktmutation S13F. Bei sechs dieser Personen wurde eine rechtsventrikuläre Herzinsuffizienz festgestellt, zwei davon erfüllten die *Task force criteria* für ARVC. Pica u. a. (2008) beobachteten in Zelltransfektionsstudien mit der Desmin-Mutante S13F eine große Akkumulation, die von filamentösen Netzwerken umgeben war. In EM Untersuchungen von Sharma u. a. (2009) bildete die Mutante S13F filamentöse Aggregate. Mixturen von Desmin S13F und WT zeigten in derselben Studie verwickelte Netzwerke von Filamenten. Die Mutation S13F liegt in der *Head*-Domäne (s. Abb. 1.7), welche hoch konserviert über IF Type III & IV und über andere Spezies ist. Außerdem ist S13 eine von vier möglichen Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C, die eventuell wichtig für Desmin-Assemblierung und -Disassemblierung ist (Kitamura u. a., 1989).

E114del

Vernengo u. a. (2010) untersuchten fünf Generationen einer Familie mit schwerer Kardiomyopathie und Skelettmuskelyopathie. Auffallende Merkmale lauten: Atriale Dilation, Arrhythmie, Leitungsblockade und plötzlicher Herztod, sowie eine rechtsventrikuläre Dilatation. Die Familie trägt eine *Deletions*-Mutation E114del im 1A Segment der α -helikalen Domäne von Desmin (s. Abb. 1.7). Diese Aminosäure ist ebenfalls hoch konserviert über verschiedene Spezies. Modelldaten deuten darauf hin, dass das Fehlen von E114 zu einer Drehung des helikalen Rückgrats um 100° führt und so das elektrostatische Potential beeinflusst wird. Zelltransfektionsstudien mit dieser Mutante zeigen, dass die Mutante E114del keine Filamentnetzwerke bilden kann und kleine Aggregate formt (Vernengo u. a., 2010).

N342D und R454W

Otten u. a. (2010) untersuchten den klinischen Phänotyp in zwei Familien, die zwei verschiedene DES Mutationen tragen: N342D und R454W. In der ersten Familie (N342D) wurde bei einem Familienmitglied DRM mit ARVC(-ähnlichem) Phänotyp festgestellt.

In der zweiten Familie (R454W) liegt eine schwere biventrikuläre Kardiomyopathie vor. Mutationen in den desmosomalen Genen wurden ausgeschlossen. Sie zeigten, dass die Mutante R454W die Lokalisation von Desmoplakin und Plakophilin 2 an dem Glanzstreifen (*intercalated disk*) beeinflusst. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen

desmosomalen Myopathien und Kardiomyopathien, verursacht durch DES-Mutationen, hindeuten. Außerdem untersuchten sie 20 ARVC-Patienten und 30 Patienten mit ARVC(-ähnlichem) Phänotyp auf Mutationen im DES Gen, wobei sie keine weitere DES-Mutation fanden. Dies weist darauf hin, dass ein ARVC(-ähnlicher) Phänotyp bei DES Mutationen eher selten vorkommt (Otten u. a., 2010).

Die Desmin Mutation N342D liegt in der α -helikalen Domäne (1.7). Untersuchungen von Dalakas u. a. (2003) mit transfizierten Zellen zeigen, dass die Mutante N342D keine intrazellulären Netzwerke bildet. Die Mutation R454W liegt in der Tail-Domäne und ist hoch konserviert (Bär u. a., 2007). Bär u. a. (2007) berichten von R454W transfizierten Zellen, die kurze, irreguläre Filamente und hauptsächlich Aggregate zeigen. Ferner untersuchten sie die *in vitro* Assemblierung mit EM. Danach scheint die Mutante normale ULFs und kurze Filamente zu bilden, aber keine ausgedehnten Filamente. Sie stellten die Hypothese auf, dass die Filamente aufgrund von veränderten molekularen Wechselwirkungen eine intrinsische Instabilität erreichen und zu einem späteren Zeitpunkt zerfallen.

1.3 Rasterkraftmikroskopie

Binnig, Quate und Gerber stellten das Rasterkraftmikroskop erstmals 1986 vor (Binnig und Quate, 1986). Das AFM ist eine Erweiterung aus dem prinzipiellen Design des von ihnen vier Jahre zuvor entwickelten Rastertunnelmikroskops (*scanning tunneling microscopy*, STM). Das STM war das erste Instrument, welches direkt die dreidimensionale Struktur von Festkörpern mit atomarer Auflösung abbilden konnte. (Binnig u. a., 1982). Seit der Einführung dieser Mikroskope wurden viele Varianten, die auf demselben Prinzip beruhen und unter dem Oberbegriff Rastersondenmikroskop (*scanning probe microscopy*, SPM) bekannt sind, entwickelt. Das grundlegende Prinzip ist eine Sonde (*probe, tip*), die die Oberfläche der Probe (*sample*) abrastert. Die Wechselwirkungen zwischen Sonde und Probe werden interpretiert und als dreidimensionales Bild ausgegeben.

Das AFM misst sehr kleine Kräfte (weniger als 1 nN), welche zwischen Sonde und Probenoberfläche vorliegen. Diese Kräfte werden durch die Auslenkung des Cantilevers gemessen. Der Cantilever ist ein flexibler Federbalken mit kleiner Masse, an dessen Ende sich eine sehr scharfe Spitze (Tip) befindet. Tips mit Radien zwischen 5 nm und 50 nm sind üblich (Bhushan, 2007).

Das AFM kann in verschiedenen abbildenden Modi betrieben werden. Eine erste Unterteilung erfolgt in den statischen (auch Kontakt- oder repulsiv) Modus und den dyna-

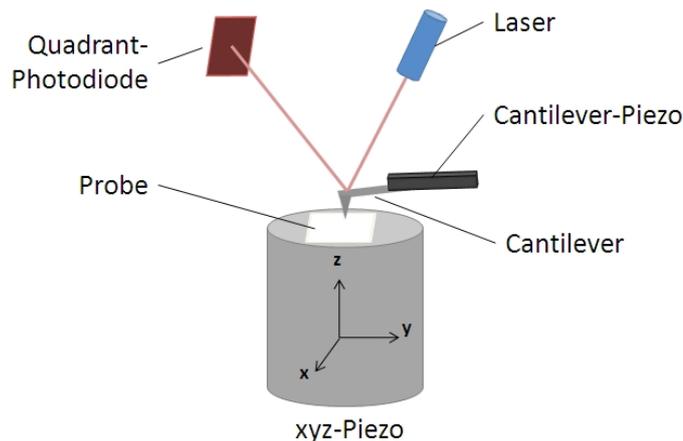


Abbildung 1.8: Prinzipieller Aufbau eines AFM.

mischen (auch attraktiver oder noncontact) Modus. Im statischen Modus wird der Tip in Kontakt zur Probenoberfläche gebracht. Die Atome an der Spitze des Tips erfahren eine schwache repulsive Kraft, ausgehend von der Überlappung der Atomorbitale von Probenoberfläche und Spitze. Diese repulsive Kraft führt dazu, dass sich der Cantilever auslenkt. Diese Auslenkung wird meist mit der *optical beam deflection*-Methode (Lichtzeigermethode) gemessen: Ein Laserstrahl wird am Ende des Cantilevers reflektiert und mit einer 4-Quadrant-Photodiode detektiert. Im dynamischen Modus wird der Tip an die Probenoberfläche angenähert und mit einem piezoelektrischen Element in Schwingung versetzt (s. Abb. 1.8).

Um ein topographisches Abbild der Probe zu erhalten, bewegt sich die Probe lateral, Zeile für Zeile unter dem Tip hinweg. Die Positionierung erfolgt über ein piezoelektrisches Stellelement, hier in Form eines Zylinders (vgl. Abb. 1.8). Während des Scans wird gleichzeitig die Kraft oder der Kraftgradient gemessen, dieser ist abhängig vom Abstand zwischen Probe und Tip. Im statischen Modus wird die Wechselwirkung zwischen Probe und Tip über die Auslenkung des Cantilevers gemessen. Im dynamischen Modus wird die Kraft über die Verschiebung der Resonanzfrequenz (bzw. Amplitude) des Cantilevers gemessen. Um die topographischen Informationen zu erhalten, wird die Kraft entweder direkt erfasst oder wird als Kontrollparameter für eine Feedbackschleife benutzt, um damit die Kraft oder einen abgeleiteten Wert konstant zu halten (Bhushan, 2007).

1.3.1 Tapping Modus

Laterale Kräfte, die während des Scans im Kontakt-Modus auf den Tip wirken, beeinflussen die Messung (den Boef, 1991). Um den Effekt lateraler Kräfte zu minimieren, kann das AFM im Tapping Modus (auch *amplitude modulation*, AM) betrieben werden. Die Wechselwirkung zwischen Tip und Probe liegt hierbei zwischen dem attraktivem und attraktiv-repulsivem Regime und wird daher im englischen auch *intermittend mode* genannt. Der Tapping Modus eignet sich besonders für weiche Proben, wie z.B. biologische Proben (Radmacher u. a., 1992).

Die Oszillation des Cantilevers wird durch drei Parameter bestimmt: Amplitude, Phase und Frequenz. Die Wechselwirkung zwischen Tip und Probe kann alle drei Parameter beeinflussen, dies sind die internen Parameter. Die Oszillation wird extern durch Anregungsamplitude und Anregungsfrequenz bestimmt, dies sind die externen Parameter. Die externen Parameter werden durch den Experimentator festgelegt, während die internen Parameter gemessen werden und die wichtigen Informationen über die Wechselwirkung beinhalten. Im AM Modus wird die Anregungsfrequenz auf einen Wert nahe der Resonanzfrequenz festgelegt und die Anregungsamplitude wird über eine Feedbackschleife konstant gehalten (Bhushan, 2007).

Die Wechselwirkung zwischen Tip und Probe kann qualitativ mit dem Lennard-Jones-Potential dargestellt werden:

$$V(r) = \epsilon \left\{ \left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right\} \quad (1.1)$$

mit dem Abstand r (hier: Tip-Proben-Abstand), dem Potentialminimum ϵ und dem Abstand r_0 , bei dem das Minimum des Potentials liegt. Bei kleinerem Abstand als r_0 beschreibt das Potential die Pauli-Abstoßung, die Wechselwirkung hat eine kurze Reichweite und ist repulsiv. Bei größerem Abstand überwiegen attraktive Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Im Tapping Modus kann der Tip in beiden Bereichen oszillieren (s. Abb. 1.9).

Das Lennard-Jones-Potential beschreibt die Wechselwirkung nicht vollständig unter Umgebungsbedingungen. Adhäsionskräfte zwischen Tip und Probenoberfläche sind hier immer präsent (O'Shea u. a., 1992). Diese entstehen etwa durch einen Kondensatfilm auf der Oberfläche, der einen Wasserminiskus zwischen Probenoberfläche und Tip verursacht. Die elektrostatische Wechselwirkung tritt bei geladenen oder leitenden Proben auf, diese wird durch das Coulomb-Gesetz beschrieben:

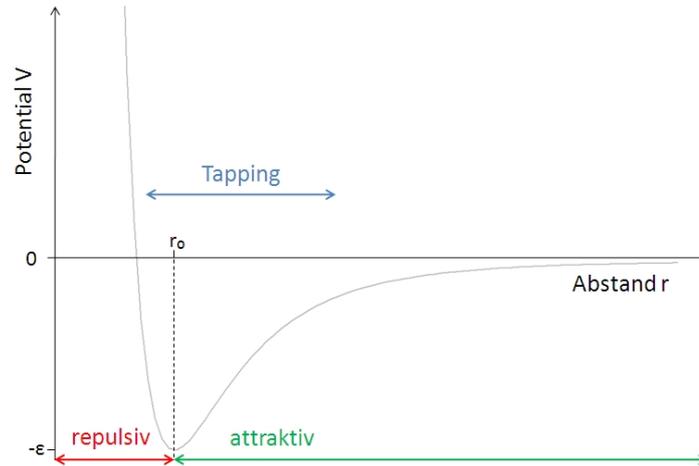


Abbildung 1.9: Das Lennard-Jones-Potential beschreibt die Wechselwirkung zwischen Tip und Probe.

$$F(r) = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r^2}. \quad (1.2)$$

Die Coulombkraft F ist abhängig vom Abstand r zweier Ladungen q , ϵ_0 und ϵ sind die Permittivitäten im Vakuum und Medium.

Das grundlegende Konzept zur Messung der Kräfte zwischen Tip und Probe im dynamischen Modus soll mit dem Modellsystem des harmonischen Oszillators erklärt werden. Der Cantilever repräsentiert eine Feder mit einer Federkonstante k (Daniel Rugar und Paul Hansma, 1990, $k \approx 10 \frac{N}{m}$). Der Cantilever wird durch ein piezoelektrisches Element mit der Anregungsfrequenz ω angeregt (s. Abb. 1.8). Die Oszillation des Cantilevers ist durch drei Größen bestimmt: Amplitude, Frequenz und Phasendifferenz zwischen Anregung und Oszillation. Abbildung 1.10 zeigt qualitativ den Zusammenhang zwischen Amplitude und Phase bei unterschiedlicher Anregungsfrequenz. Die Amplitude ist maximal bei der Eigenfrequenz ω_0 des Cantilevers.

Im Tapping Modus wird der Cantilever nahe der Resonanzfrequenz angeregt. Bei großer Distanz zur Probe (ohne äußere Wechselwirkung) oszilliert der Cantilever mit der „freien Amplitude“. Wenn der Tip in den Bereich der Wechselwirkungskräfte der Probe kommt, ändert sich die Amplitude. Normalerweise nimmt die Amplitude mit geringerer Distanz zur Probe ab (Bhushan, 2007). Die Distanz zur Probe kann vom Experimentator über den so genannten *Set-Point* festgelegt werden. Üblicherweise wird der *Set-point* so gewählt, dass die Amplitude des Cantilevers leicht unterhalb der freien Amplitude liegt.

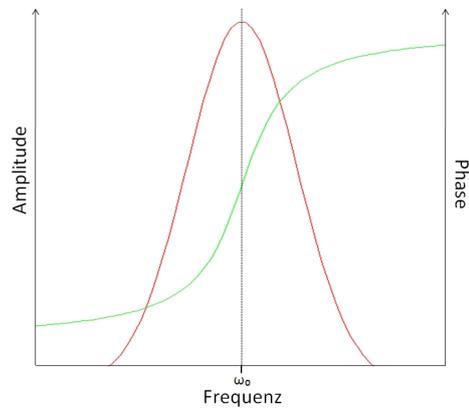


Abbildung 1.10: Phase (grün) und Amplitude (rot) eines harmonischen Oszillators in Abhängigkeit der Anregungsfrequenz.

2 Material & Methoden

2.1 Desmin Expression und Reinigung

Zur Expression von Desmin WT und Mutanten werden *Escherichia coli* BL21 DE3 (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit entsprechenden Plasmiden transformiert. Die Zellen werden in LB-Medium bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600nm}) zwischen 0,5 und 0,8 bei 37°C in einem Schüttel-Inkubator inkubiert. Die Protein-Expression wird mit Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) induziert. Nach 4 Stunden bei 37°C wird zentrifugiert und die Zellen entnommen.

Nach bekannter Methode werden die Desmin enthaltenden *Inclusion bodies* extrahiert (Garboczi u. a., 1996). Die *Inclusion bodies* werden in ureahaltigem Puffer (8 M Urea, 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) gelöst und zentrifugiert (45 min, 4°C, 45.000 g). Der Überstand wird auf eine HiTrap DEAE Sepharose Säule (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) mittels eines Chromatographie-Systems (Pharmacia, Uppsala, S) aufgetragen.

Rekombinante Desmin-Moleküle werden durch einen linearen Salz-Gradienten (0 bis 0,35 mM NaCl) eluiert. Mit SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) und anschließender Coomassie Blue R250 Färbung wird die Reinheit des rekombinanten Desmin analysiert. Um das Desmin weiter zu reinigen werden die Fraktionen auf eine Ni^{2+} -NTA-Sepharose-Säule (Qiagen, Hilden, D) gegeben. Diese wird mit Wasch-Puffer (8 M Urea, 20 mM Tris-HCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) so lange gewaschen, bis die Absorbtion bei 280 nm auf einen konstanten Wert zurückgeht. Danach werden die rekombinanten Desmin-Moleküle mit imidazolhaltigem Puffer (8 M Urea, 20 mM Tris-HCl, 300 mM Imidazol, pH 6,9) eluiert.

Abschließend wird die Reinheit der rekombinanten Desmin-Moleküle erneut mittels SDS-PAGE analysiert. Die Homogenität zwischen Desmin-Mutanten und WT sind vergleichbar und haben eine Reinheit von mehr als 95% (s. Abb. 2.1).

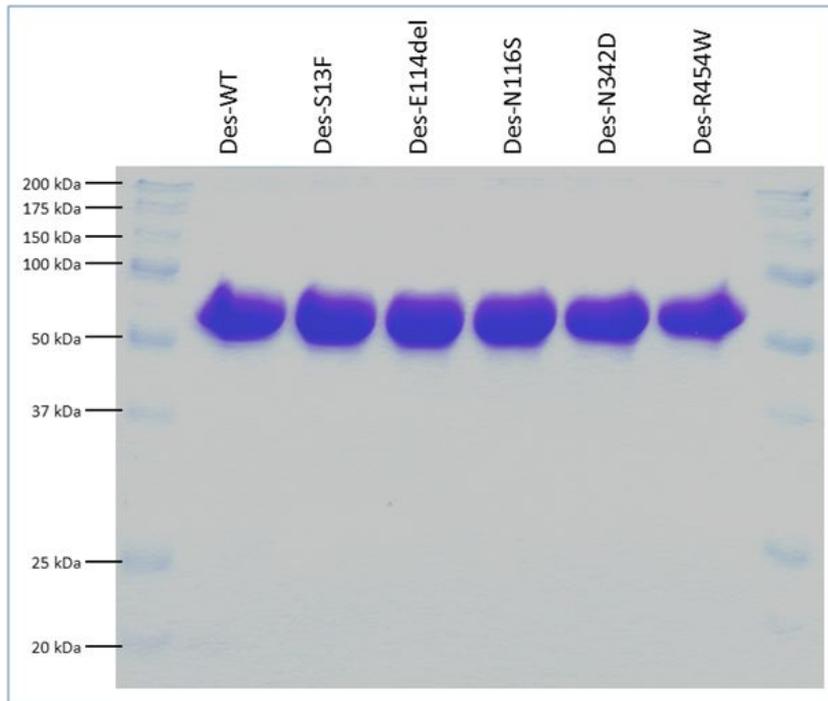


Abbildung 2.1: SDS-PAGE der gereinigten Desmin-Moleküle. Es wurden $10 \mu\text{g}$ Desmin auf das mit Coomassie Blau R250 eingefärbte Gel aufgetragen.

2.2 Desmin WT_P

Zusätzlich zu dem oben beschriebenen exprimierten Desmin wurde kommerziell erhältliches Desmin WT für ergänzende Untersuchungen verwendet. Das rekombinante Desmin von PROGEN Biotechnik (Heidelberg) soll im Folgenden mit WT_P bezeichnet werden, um es von dem „selbst“-exprimiertem WT zu unterscheiden. Das Desmin WT_P wird mit einer Konzentration von $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ in einem Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 9,5 M Urea, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 10 mM Methylammoniumchlorid) mit einer Reinheit von über 95% geliefert.

Bei der im letzten Abschnitt beschriebenen Desmin-Expression besitzen die Desmin-Moleküle, auf Grund der verwendeten Plasmide, einen His_6 -Tag am C-Terminus. Dieser ist nach Herstellerangaben bei WT_P nicht vorhanden. Des Weiteren sind die unterschiedlichen ureahaltigen-Puffer und die längere Lagerungszeit des WT_P zu beachten. Bei strukturellen Vergleichen werden daher nur die auf gleiche Weise exprimierten, also Desmin WT und Mutanten, betrachtet.

2.3 Faltung und Assemblierung

Die Desmin-Moleküle können über eine schrittweise Dialyse in DP-Puffer (5 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA and 10 mM NH₄Cl, pH 8,4) gefaltet werden. Die Proteinkonzentration wird mit einem BCA-Assay (Bicinchoninsäure) gemäß der Herstellerangaben (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit BSA (*bovines serum albumin*) als Proteinstandard und durch Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einem Photometer (NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ermittelt. Der Mittelwert beider Bestimmungsmethoden ergibt die Desminkonzentration.

Die Dialyse wurde über Nacht durchgeführt und am darauf folgenden Tag das Desmin mittels AFM untersucht.

Zur Assemblierung von Filamenten wurden 50 μ l DP-Puffer mit einer Desmin-Konzentration von 25 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und 50 μ l Assemblierungspuffer (100 mM NaCl, 45 mM Tris-HCl, pH 7,0) bei 37°C im Wasserbad eine Stunde inkubiert.

2.4 Reproduzierbarkeit der Messungen

Die rekombinante Expression von Desmin ist sehr zeitaufwendig, daher wurden die Desmin Mutanten jeweils nur einmal exprimiert, der Desmin WT insgesamt dreimal. Die dreimalige Expressionen des WT zeigte in den Messungen keine wesentlichen Unterschiede, daher wird hier vermutet, das eine nochmalige Expression der Mutanten zu keinen abweichenden Ergebnissen führen würde. Die Assemblierung der Mutanten mit Assemblierungspuffer wurden mindestens dreimal durchgeführt und waren reproduzierbar.

2.5 Puffer

Die Puffer wurden mit einem Liter angesetzt, um die Konzentration und den pH-Wert möglichst genau einzustellen. Anschließend wurden die Puffer steril filtriert und in kleinen Portionen eingefroren. Nach jedem Messtag wurden die Puffer gewechselt, um Verunreinigungen auszuschließen. Als weitere Kontrolle wurde Mica mit frisch angesetztem Puffer gespült und abgebildet.

DP-Puffer 5 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA und 10 mM NH₄Cl, pH 8,4

Assemblierungspuffer 100 mM NaCl, 45 mM Tris-HCl, pH 7,0

2.6 Rasterkraftmikroskopie

2.6.1 Mikroskop

Die Messungen wurden mit einem Multimode AFM mit Nanoscope IIIa oder V Controller (Bruker, Santa Barbara, USA) durchgeführt.

Wahlweise wurden Tap300Al-G (Budget Sensors, Sofia, Bulgarien) oder PPP-NCH-W (Nanosensors, Neuchatel, Schweiz) Cantilever benutzt. Tap300Al-G sind Silizium-Cantilever mit einer rückseitigen Aluminium-Beschichtung, sie besitzen eine nominale Federkonstante von 40 N/m und eine Resonanzfrequenz von 300 kHz (± 100 kHz). Die Silizium-Cantilever PPP-NCH-G sind unbeschichtet, sie besitzen eine nominale Federkonstante von 42 N/m und eine Resonanzfrequenz von 330 kHz (204 - 497 kHz). Beide Cantilever haben nach Herstellerangaben einen Tipradius von weniger als 10 nm.

Bei allen Messungen wurde der Tapping Modus eingesetzt. Je nach Größe des Scanbereichs wurde mit einer Zeilenfrequenz von 0,5 bis 2 Hz gescannt.

2.6.2 Substrate & Immobilisierung

Die verwendeten Substrate sind Muscovite Mica, APTES (3-Aminopropyltriethoxysilan) funktionalisiertes Mica und TSG (*Template-Striped Gold*).

Mica

Mica¹ (Plano, Wetzlar, Deutschland) ist ein nichtleitendes Schichtsilikat. Es hat eine starke zweidimensionale Bindung, ist aber nur schwach in der dritten Dimension gebunden. Daher kann Mica einfach mit einer scharfen Klinge oder einem Stück Klebefilm gespalten werden. So entsteht eine atomar ebene Oberfläche, die sich gut für das Abbilden von sehr flachen Proben eignet. Die Hauptbestandteile von Mica sind SiO₄-Tetraeder, diese bilden Phyllosilicate mit der Zusammensetzung Si₂O₅. Die Phyllosilicate werden durch Metallkationen stabilisiert. Das hier verwendete Muscovit Mica hat die chemische Formel KAl₂(OH)₂AlSi₃O₁₀.

Bei der Immobilisierung von Desmin auf Mica ist das Zeta-Potential von Mica zu beachten. Mica hat ein negatives Zeta-Potential, das unabhängig vom pH-Wert, aber

¹auch Glimmer

abhängig von spezifischen Ionen und der Ionenkonzentration ist (Lyons u. a., 1981; Nishimura u. a., 1992). Desmin wiederum hat einen theoretisch berechneten isoelektrischen Punkt von 5,16. Die Messungen wurden bei neutralem bis basischen pH-Wert durchgeführt. In diesem pH-Bereich sind die Aspartat- und Glutamat-Reste von Desmin negativ geladen, daher ist die Adsorption auf Mica sehr schwach.

Bei der Probenpräparation wird das Muscovite Mica mit Klebefilm frisch gespalten. Anschließend werden 10 μl Desmin-Lösung auf das Mica gegeben und unmittelbar mit deionisiertem Wasser gespült und vorsichtig mit Stickstoff getrocknet.

APTES-Mica

Bei dieser Präparation wird die Mica-Oberfläche kovalent mit APTES (Fluka, ChemikaBioChemika, Schweiz) modifiziert. Eine schematische Darstellung der Präparation ist in Abbildung 2.2 gezeigt.

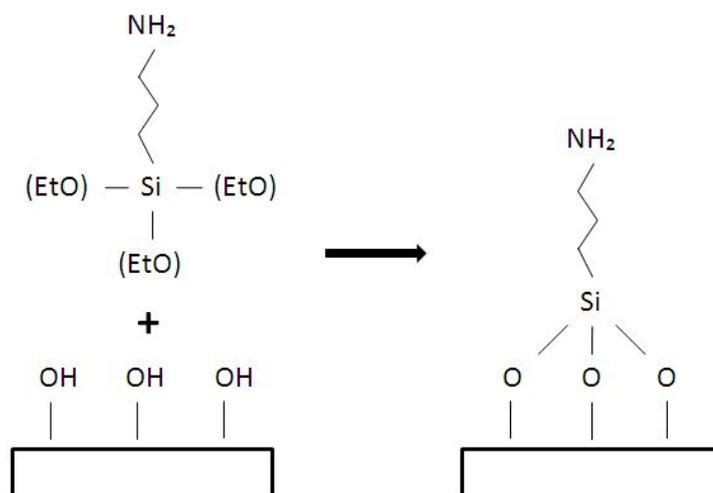


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Funktionalisierung von Mica mit APTES. Die Hydroxylgruppen links sind Teil der Mica-Oberfläche (vgl. Colton, 1998)

Die Amino-Gruppen von APTES sind kovalent auf Mica gebunden. Diese Gruppen sind über einen breiten pH-Bereich in wässriger Umgebung positiv geladen (Lyubchenko u. a., 1992). Das vorwiegend negativ geladene Desmin (neutral mit basischem pH-Bereich) bindet gut an die positiv geladene Oberfläche.

Im Folgenden wird die Funktionalisierung von Mica mit APTES beschrieben: Das Mica wird frisch gespalten. Anschließend wird es zusammen mit einem kleinen Gefäß mit 2 μl APTES in einem Exsikkator gelegt. Dieser wird etwa 20 Minuten evakuiert

und dann für eine halbe Stunde inkubiert, damit der Reaktionsprozess ablaufen kann. Anschließend wird vorsichtig belüftet.

Nach jeder Präparation wird ein Substrat mit AFM abgebildet, um es auf Verunreinigung und Rauheit zu überprüfen. Außerdem verändert sich die Oberflächenchemie der Substrate mit der Zeit an der Luft, daher wurden sie nur einen Tag benutzt.

Zur Immobilisierung von Desmin auf APTES-Mica werden $2\ \mu\text{l}$ der Desmin-Lösung auf das Substrat gegeben und zehn Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wird die Oberfläche mit deionisiertem Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet.

TSG

TSG ist ein Goldsubstrat mit großen extrem flachen Bereichen. Es kann eine durchschnittliche Rauheit von $\sim 2\ \text{\AA}$ für $2,25\ \mu\text{m}^2$ und $\sim 3\ \text{\AA}$ für $25\ \mu\text{m}^2$ erzielt werden (Hegner u. a., 1993).

Im Wesentlichen entspricht die Herstellung dem in Colton (1998) beschriebenen Verfahren und soll hier nur kurz zusammengefasst werden. Das Gold wird thermisch auf gespaltenes Mica aufgedampft, dadurch wächst das Gold epitaxial auf der Mica-Oberfläche. Mit Epoxy-Kleber werden kleine Deckgläser auf die Goldseite geklebt. So können die Substrate für einige Monate gelagert werden. Vor der Nutzung kann das Mica vom Gold abgelöst werden. Um zu beurteilen, ob auf dem Gold keine Micaschicht zurückgeblieben ist, kann die Leitfähigkeit mit einem Multimeter überprüft werden.

Da Gold elektrisch leitend ist, können geladene Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen auf diesem Substrat immobilisiert werden. Zusätzlich hat Gold eine hohe Bindungsaffinität zu Schwefel. Liegen Thiolgruppen frei zugänglich im Protein vor, wird eine kovalente Bindung ausgebildet.

Die Immobilisierung der Desmin-Proteine wurde wie beim Mica durchgeführt: $10\ \mu\text{l}$ der Desmin-Lösung wird auf das Gold gegeben, gespült und getrocknet.

2.6.3 Vergleich der Substrate

Die Substrate lassen sich nach folgenden Eigenschaften klassifizieren:

Rauheit Die Oberfläche sollte möglichst eben sein, damit die Struktur, die abgebildet werden soll, gut vom Untergrund unterscheidbar ist.

Substrat-Präparation Diese sollte möglichst einfach zu handhaben sein. Außerdem sollte die Präparation reproduzierbar sein, d.h. die Eigenschaften der Substrate sollen gleich bleiben.

Immobilisierung Das Protein muss auf dem Substrat immobilisiert werden können.

Die drei verschiedenen Substrate Mica, APTES-Mica und TSG entsprechen von ihrer Rauheit her prinzipiell den Anforderungen an eine möglichst flache Oberfläche. Dennoch gibt es Unterschiede in der Rauheit: Der Vergleich zwischen Abbildung 2.3(a) und 2.3(b) zeigt, dass das APTES-Mica flacher als das TSG-Substrat ist. Die gemessene Rauheit von APTES-Mica hat einen Effektivwert (RMS, *root mean square*) von 1,0 Å, die von TSG 1,8 Å. Frisch gespaltenes Mica ist vergleichbar zum APTES-Mica mit einem RMS unter 1 Å.

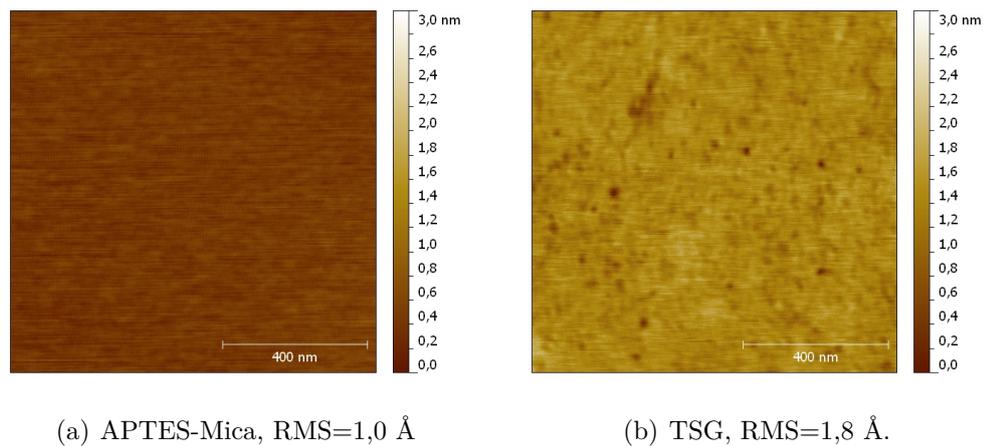


Abbildung 2.3: Vergleich von APTES-Mica und TSG.

TSG und APTES-Mica können je nach Güte der Präparation in der Rauheit schwanken. Die Präparation von Mica hat sich als am effektivsten erwiesen, da sie schnell geht und ein immer gleiches Ergebnis liefert.

2.6.4 Bearbeitung der Rohdaten

Die Rohdaten der AFM-Messungen wurden mit dem *Freeware*-Programm Gwyddion (Version 2.24) oder der Nanoscope Software (Version 5.30) bearbeitet und analysiert. Im Folgenden wird auf die wichtigsten Funktionen eingegangen.

Die *Flatten*-Funktion beseitigt unerwünschte Erscheinungen der einzelnen Scanlinien, wie Bögen und Neigungen. Außerdem werden alle Scanlinien auf eine Höhe gebracht.

Mit der *Plane-fit*-Funktion können Bögen über den gesamten Scanbereich entfernt werden, indem eine passende polynomische Ebene vom Bild subtrahiert wird. Bögen in den Rohdaten können z.B. durch den hier verwendeten *Tube*-Scanner entstehen, da bei diesem die x-,y-Koordinaten mit der z-Koordinate gekoppelt sind.

Mit der *Erase scanline*-Funktion können einzelne Scanlinien entfernt werden. Die Linie wird durch den Mittelwert der benachbarten Linien ersetzt.

Dies sind die wesentlichen Funktionen, die bei der Bearbeitung der Daten in dieser Arbeit benutzt wurden. Auf weitere Funktionen wie beispielsweise Frequenzfilterung wurde hier verzichtet.

3 Ergebnisse

3.1 Protein Lagerung

Proteine sind außerhalb ihrer nativen Umgebung oft instabil. Sie können ihre Struktur und damit auch ihre Funktion verlieren. Um herauszufinden, wie lange die rekombinanten Desmin-Moleküle im DP-Puffer gelagert werden können, wurden verschiedene Messungen durchgeführt .

Wird der Desmin WT über Nacht in DP-Puffer dialysiert und am Tag assembliert und gemessen, so bilden sich Filamente, die teilweise akkumuliert sind (s. Abb. 3.1). Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 3.2 den WT nach vier Tagen Lagerung im Kühlschrank bei etwa 1°C und anschließender Assemblierung. Hier finden sich keine einzelnen Filamente, nur filamentöse Aggregate verschiedener Größe.

In einem weiteren Versuch wurde die Desmin-Pufferlösung nach der Dialyse bei -26°C eingefroren. Nach einer Woche im Gefrierfach zeigte sich eine deutliche Ausflockung in der Desmin-Lösung. Der Überstand wurde wie gewohnt assembliert. Die anschließenden Messungen zeigten, dass die Konzentration der Filamente rapide abgenommen hatte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine längere Lagerung der Desmin-Moleküle im DP-Puffer nicht möglich ist. Eine Lagerung im Kühlschrank führt zu unerwünschter Aggregation, eine Lagerung im Gefrierfach zu vollständigem Ausfall der Moleküle.

Weiterhin zeigten vergleichbare Messreihen über ein bis zwei Tage, dass eine Lagerung auf Eis zu keinem Veränderungsprozeß führt. Eine kurzzeitige Lagerung ist daher möglich.

Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurden alle Messungen innerhalb eines Tages mit frisch dialysiertem Desmin durchgeführt.

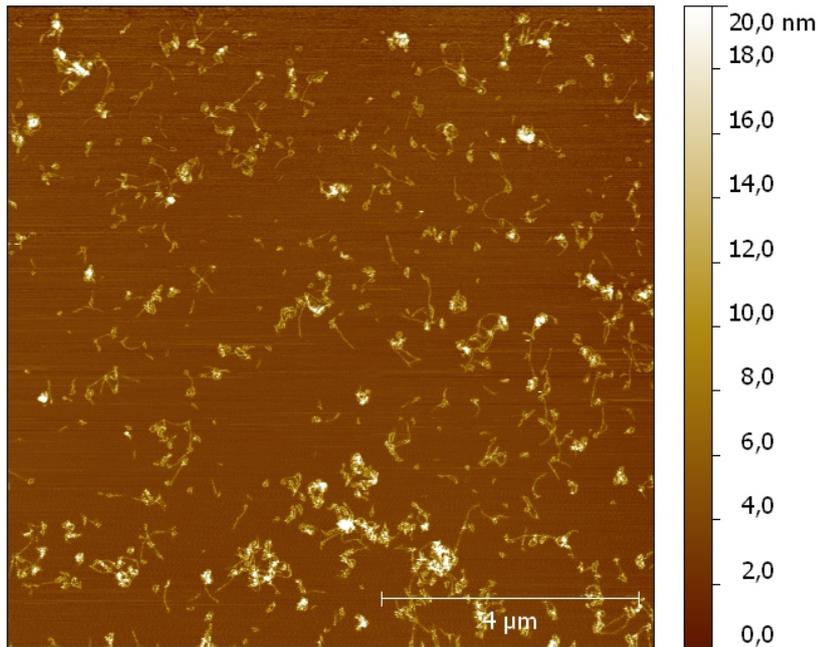


Abbildung 3.1: Desmin WT auf APTES-Mica, unmittelbar nach der Dialyse 1 h bei 37°C assembliert.

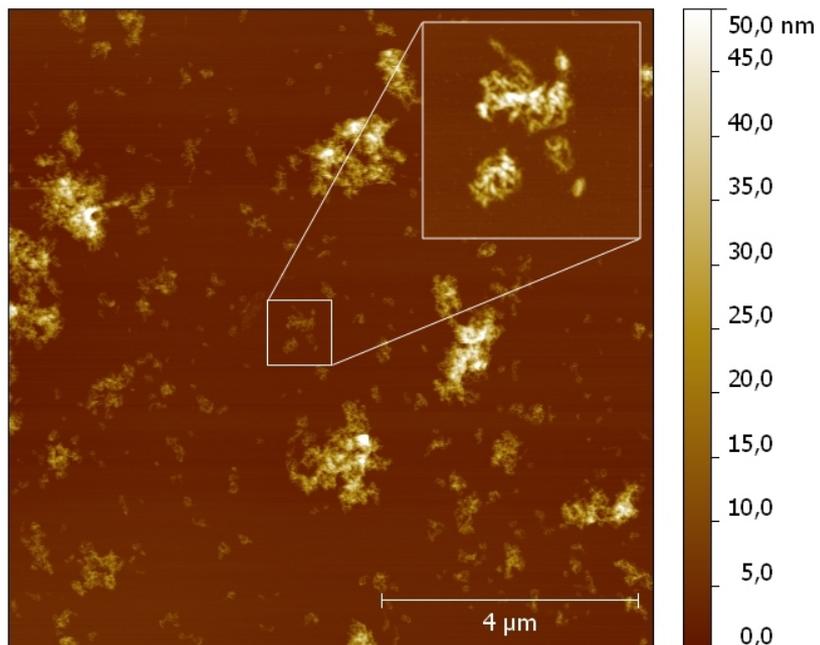


Abbildung 3.2: Desmin WT auf APTES-Mica nach Dialyse 4 Tage bei 1°C gelagert, dann bei 37°C 1 h inkubiert. Der Ausschnitt ist 1 μm · 1 μm, die Höhenskalierung beträgt 14 nm.

3.2 Verschiedene Substrate

Die Immobilisierung von Desmin hat auf allen drei Substraten funktioniert. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 3.3, 3.4 und 3.5.

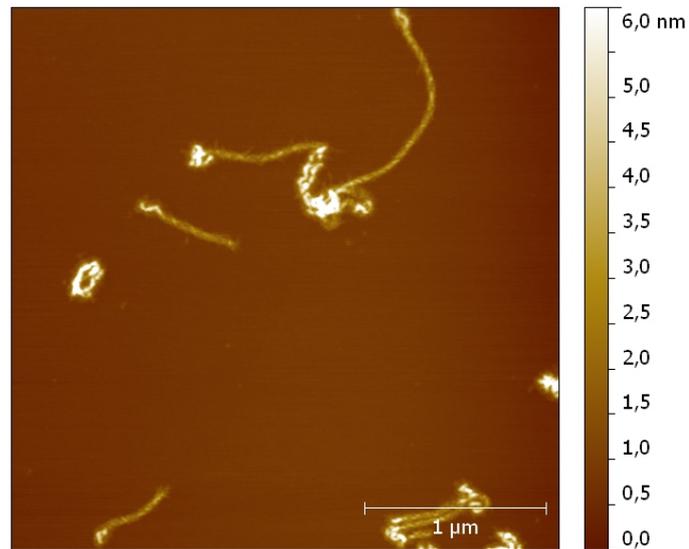


Abbildung 3.3: Desmin WT auf Mica.

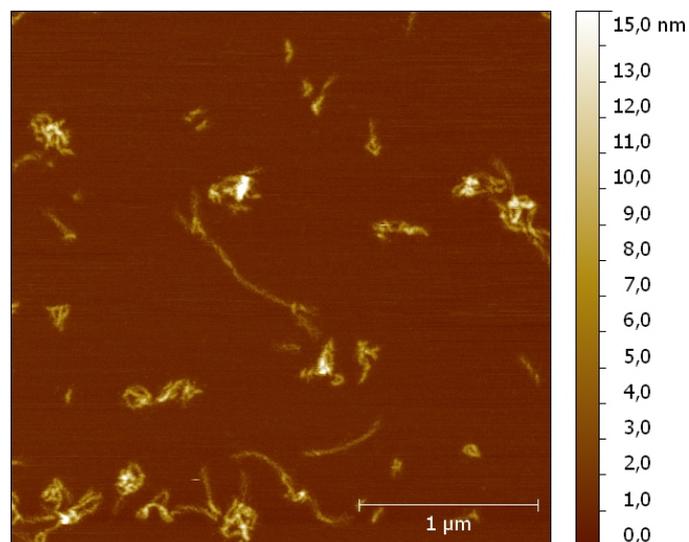


Abbildung 3.4: Desmin WT auf APTES-Mica

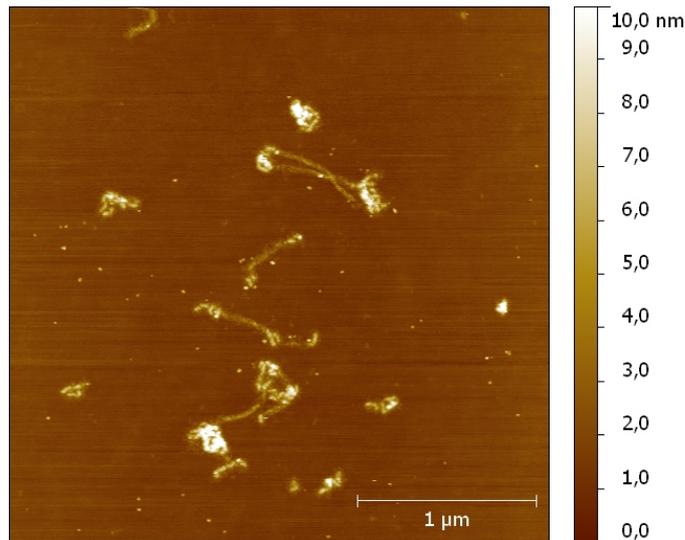


Abbildung 3.5: Desmin WT auf TSG.

Wie in Absatz 2.6.2 beschrieben, ist die Wechselwirkung zwischen APTES und Desmin stark, und zwar aufgrund der positiv geladenen Oberfläche und den negativ geladenen Proteinen. Frisch gespaltenes Mica hat ein negatives Zeta-Potential, daher ist zu erwarten, dass die Wechselwirkung mit den Proteinen geringer ausfällt. Bei gleicher Desminkonzentration ist die Oberfläche auf APTES-Mica dichter belegt als auf Mica (vgl. Abb. 3.1 S. 23 und 3.3.2 S. 38), dies bestätigt diese Vermutung.

Da die Immobilisierung auf allen Substraten erfolgreich war, fiel die Wahl für weitere Messungen auf frisch gespaltenes Mica. Es hat eindeutig die besten Eigenschaften in Präparation und Oberflächenbeschaffenheit.

3.3 Strukturuntersuchungen des Desmin Wildtyps und der Mutanten

Mithilfe der AFM Untersuchungen sollen strukturelle Unterschiede zwischen Desmin WT und Mutanten herausgearbeitet werden. Weitere Zielsetzung besteht darin, einen grundlegenden Einblick in die Assemblierung zu ausgebildeten Filamenten zu erlangen.

Im Assemblierungsprozess von Desmin wurden vor allem zwei Zeitpunkte beobachtet: Erstens der Zustand der Desmin-Moleküle im DP-Puffer. Wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, liegt das rekombinante Desmin zunächst denaturiert in einem ureahaltigem-Puffer vor und wird schrittweise in den DP-Puffer dialysiert. Dieser Zustand wird im

3 Ergebnisse

Folgenden einfachheitshalber „vor der Assemblierung“ bzw. „im DP-Puffer“ genannt. Zweitens „nach der Assemblierung“, d.h. nach Zugabe von Assemblierungspuffer wird das Desmin eine Stunde bei 37°C inkubiert und dann abgebildet.

Zunächst erfolgt eine Zuordnung der Begriffe, die zur Beschreibung der gefundenen Strukturen herangezogen werden:

Tetramer Sehr flache Fasern (s. Abb. 3.6(a)).

Protofilament Filamentstrukturen mit perlenkettenartiger Form und einem Saum aus flachen Fasern (s. Abb. 3.6(b)).¹

Filament Generell Filamente mit lockerer Struktur (s. Abb. 3.6(c)). Spezifische Strukturen werden später erörtert.

filamentöse Aggregate Eine Zusammenlagerung bzw. Aggregation von Filamenten (lat. aggregare: hinzunehmen, ansammeln).

Die eingeführten Begriffe Tetramer, Protofilament und Filament beinhalten bereits die Interpretation der gefundenen Strukturen, daher wird auf diese später genauer eingegangen.

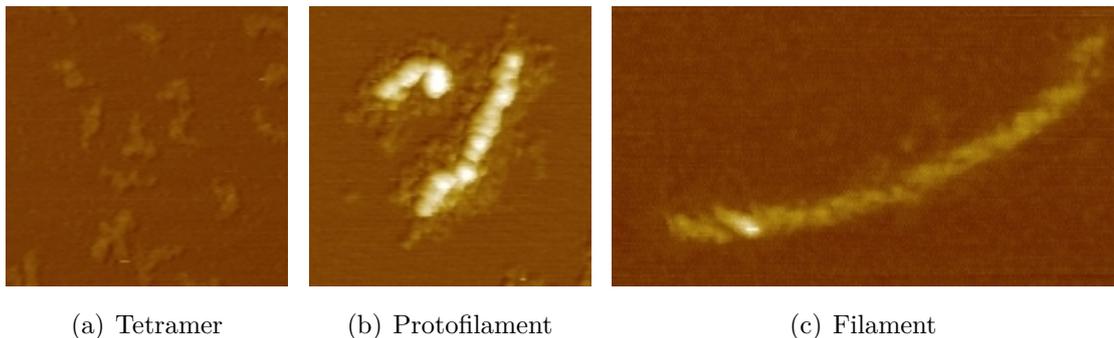


Abbildung 3.6: Beispielbilder zur Verdeutlichung der Struktur.

3.3.1 Strukturuntersuchungen des Desmin Wildtyps und der Mutanten vor der Assemblierung

Die Abbildung 3.7 auf Seite 29 zeigt die zwei charakteristischen Strukturen des Desmin **WT**. Einerseits flexible, sehr flache Fasern und andererseits kurze Filamente, die in ihrer

¹Der Ausdruck Protofilament in der Literatur verwendet, um z.B. eine bestimmte Assemblierungsstufe von Lamin zu beschreiben. In dieser Arbeit wird der Begriff Protofilament benutzt, um allgemein eine Vorstufe des ausgereiften Filaments zu beschreiben.

3.3 Strukturuntersuchungen des Desmin Wildtyps und der Mutanten

Dicke variieren, vergleichbar mit einer Perlenkette. Diese Filamente werden von flachen Fasern umsäumt. Die Filamente sind zwischen 60 und 200 nm lang und 5 nm hoch. Es gibt auch kleinere, eher globuläre Strukturen, die einer einzelnen Perle der Kette entsprechen. Sie haben einen Durchmesser von 35 nm. Da sich die perlenkettenartigen Filamente sowohl in der inneren Struktur als auch in der maximalen Länge von den später ausgereiften Filamenten unterscheiden, können sie an dieser Stelle als Protofilament interpretiert werden, dies ist eine Vorstufe bzw. Zwischenstufe in der Entwicklung zum Filament. Die flachen Fasern wiederum entsprechen in ihrer Struktur den beschriebenen Tetrameren. Sie haben eine mittlere Länge von 51 nm (± 12) und einen Durchmesser, der deutlich unter 1 nm liegt.

Auffallend ist, dass Desmin *WT_P* etwas anders aussieht (s. S. 35). Es zeigen sich ebenfalls die Tetramere, statt Protofilamenten gibt es globuläre Strukturen.

Desmin **N116S** unterscheidet sich kaum vom WT, außer dass die Fasern der Protofilamente nicht so ausgeprägt sind und sie möglicherweise mehr zur Akkumulation neigen (s. S. 30).

Bei Desmin **N342D** sind fast ausschließlich Tetramere vorhanden (s. S. 31). Auf diesen und anderen Scans sind vereinzelt unterschiedliche Aggregate zu sehen, Fasern, aber auch filamentöse Aggregate.

Desmin **E114del** (s. S. 32) und **S13F** (s. S. 34) unterscheiden sich deutlich von den anderen, da keine einzelnen Tetramere vorliegen sondern Protofilamente. Diese sind bei Desmin E114del im Vergleich zum WT länger und auch deutlich voneinander isoliert.

Bei Desmin **S358T** ist die Oberfläche dicht mit Tetrameren belegt, es zeigen sich ebenfalls Protofilamente (s. S. 33).

Die Beobachtungen zum WT und zu den Mutanten² sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst.

²Von Desmin **R454W** sind für diesen Untersuchungsschritt keine Daten vorhanden.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.1: Zusammenfassende Beobachtungen zu Desmin WT und Mutanten vor der Assemblierung (DP-Puffer); ✓: Merkmal vorhanden; -: Merkmal nicht vorhanden.

Beschreibung	WT	N116S	N342D	E114del	S358T	S13F
Tetramere	✓	✓	✓	-	✓	-
Protofilamente	✓	✓	-	✓	✓	✓
Div. Aggregate	-	-	✓	-	-	-

Desmin WT

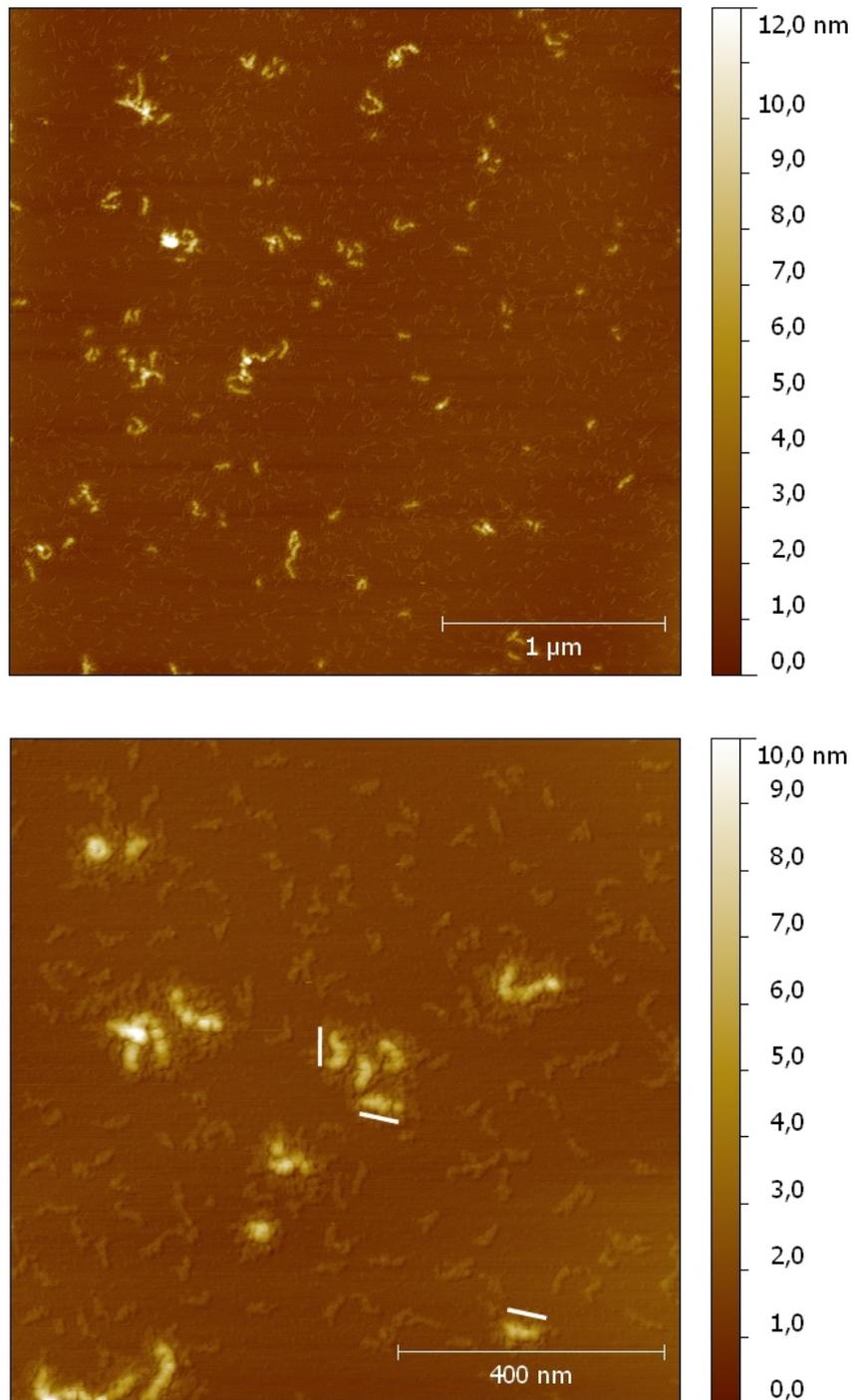


Abbildung 3.7: Desmin WT (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Tetramer und Protofilament; die Balken im unteren Bild sind 60 nm lang (ref. Kap.: 3.3.1).

Desmin N116S

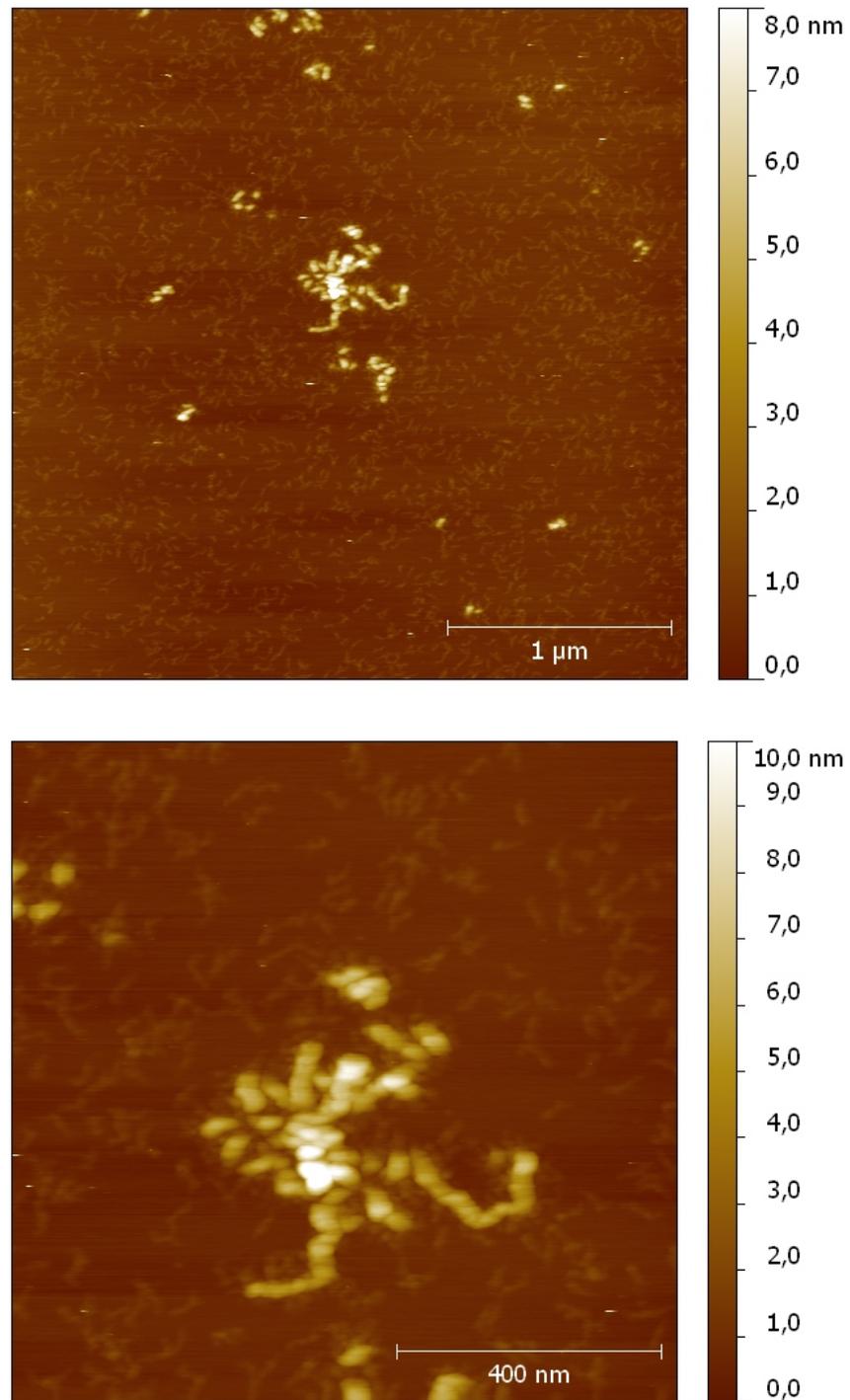


Abbildung 3.8: Desmin N116S (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Tetramer und Protofilament (ref. Kap.: 3.3.1).

Desmin N342D

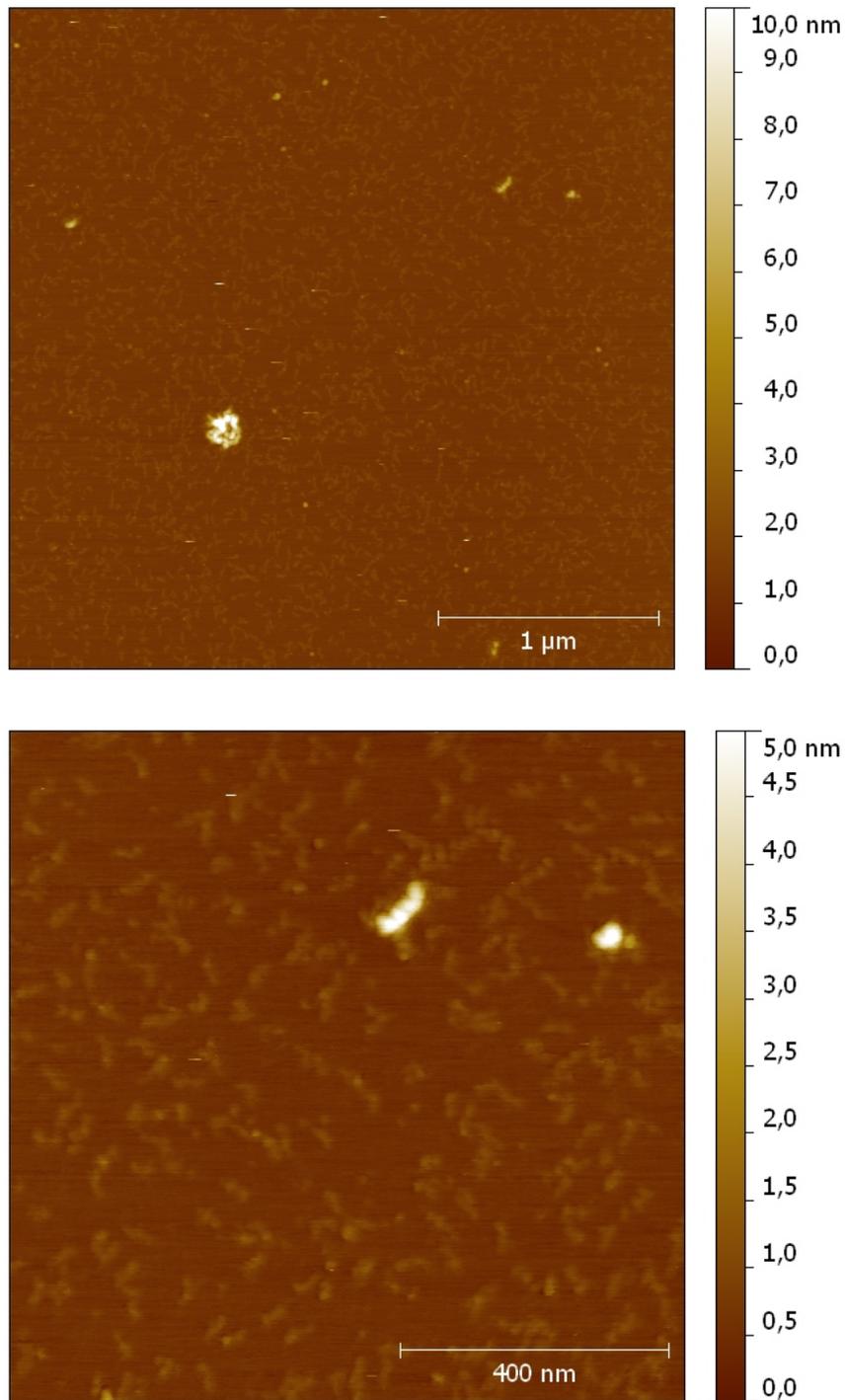


Abbildung 3.9: Desmin N342D (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Tetramer und diverse Aggregate (ref. Kap.: 3.3.1).

Desmin E114del

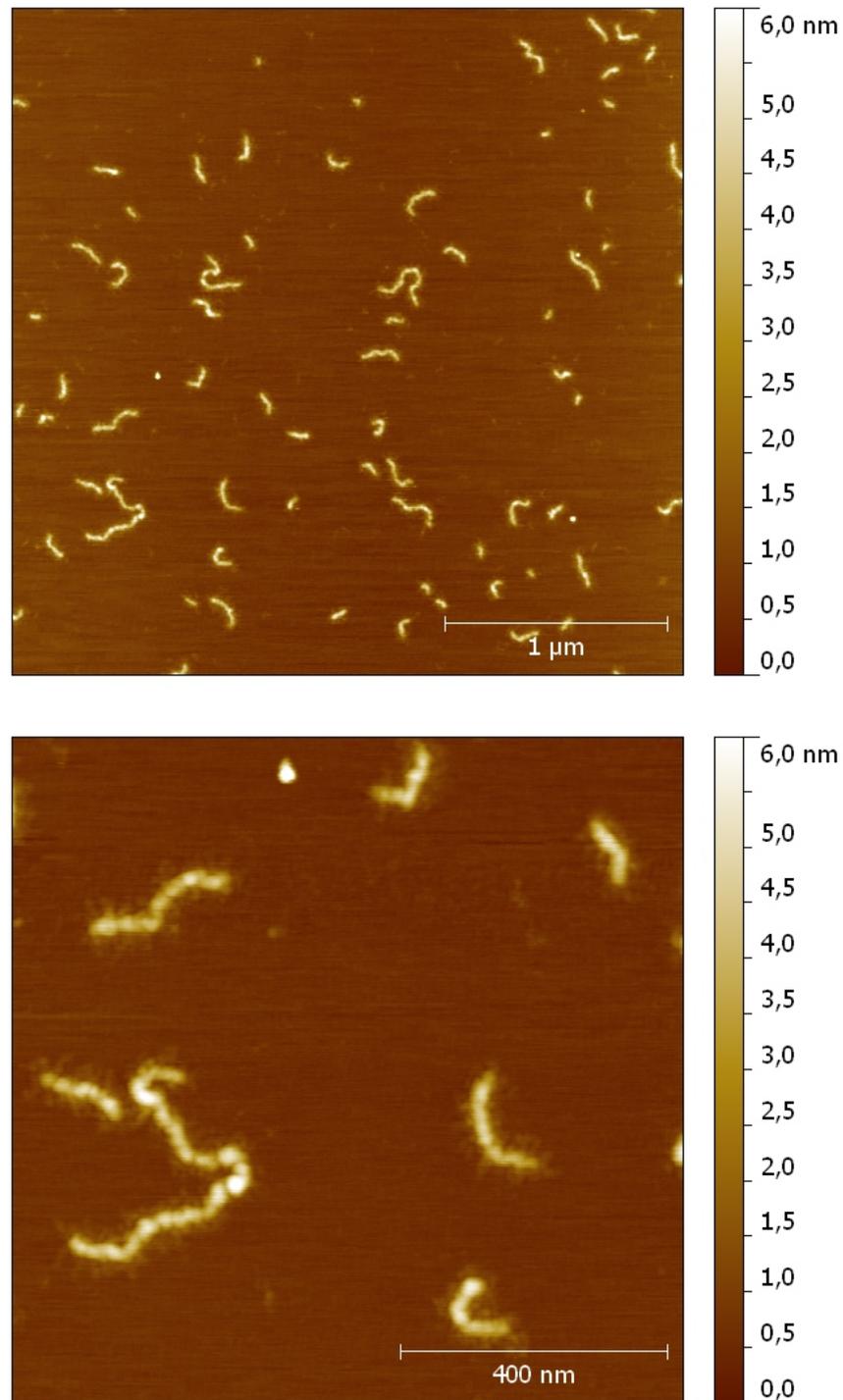


Abbildung 3.10: Desmin E114del (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Protofilament (ref. Kap.: 3.3.1).

Desmin S358T

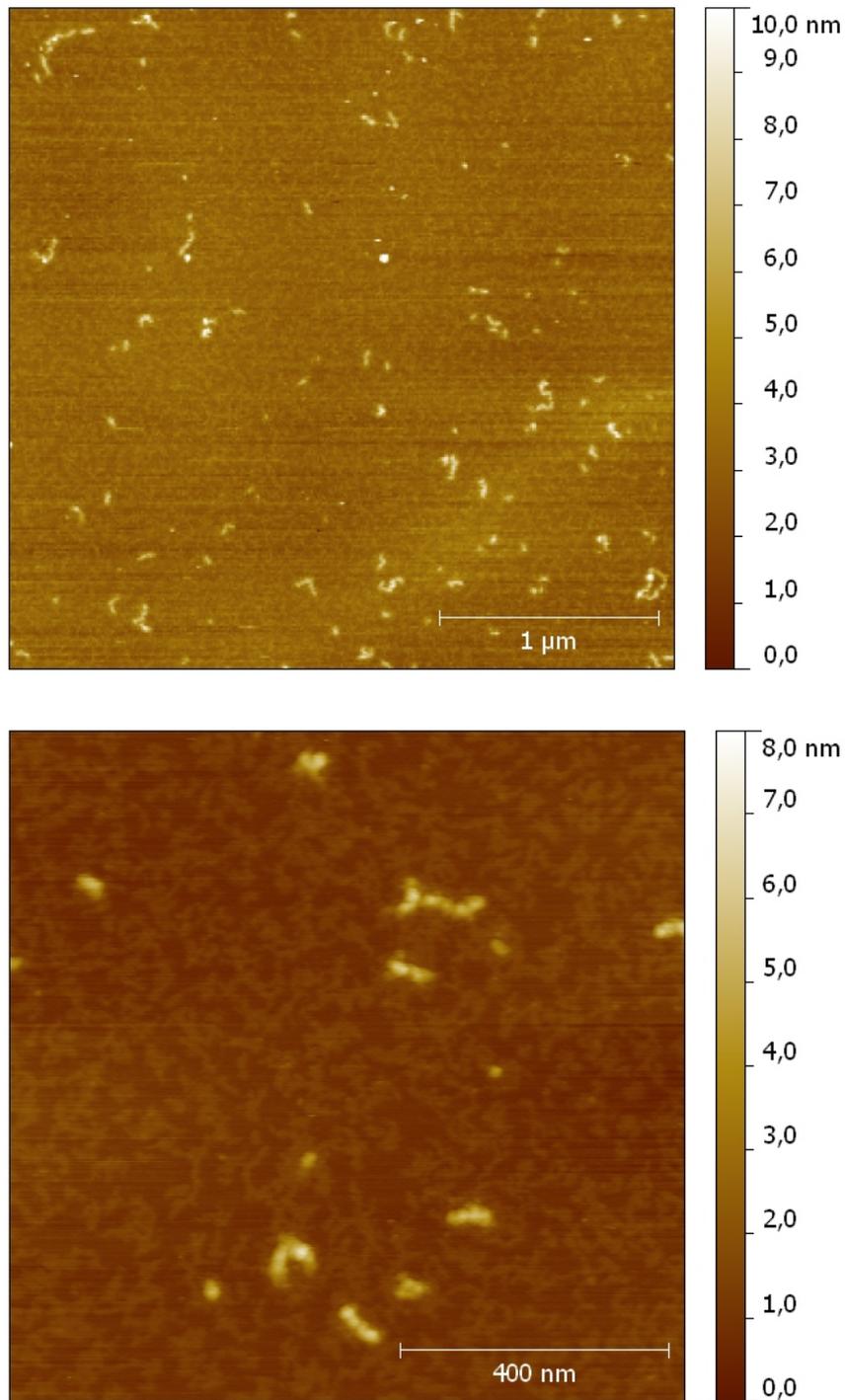


Abbildung 3.11: Desmin S358T (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Tetramer und Protofilament (ref. Kap.: 3.3.1).

Desmin S13F

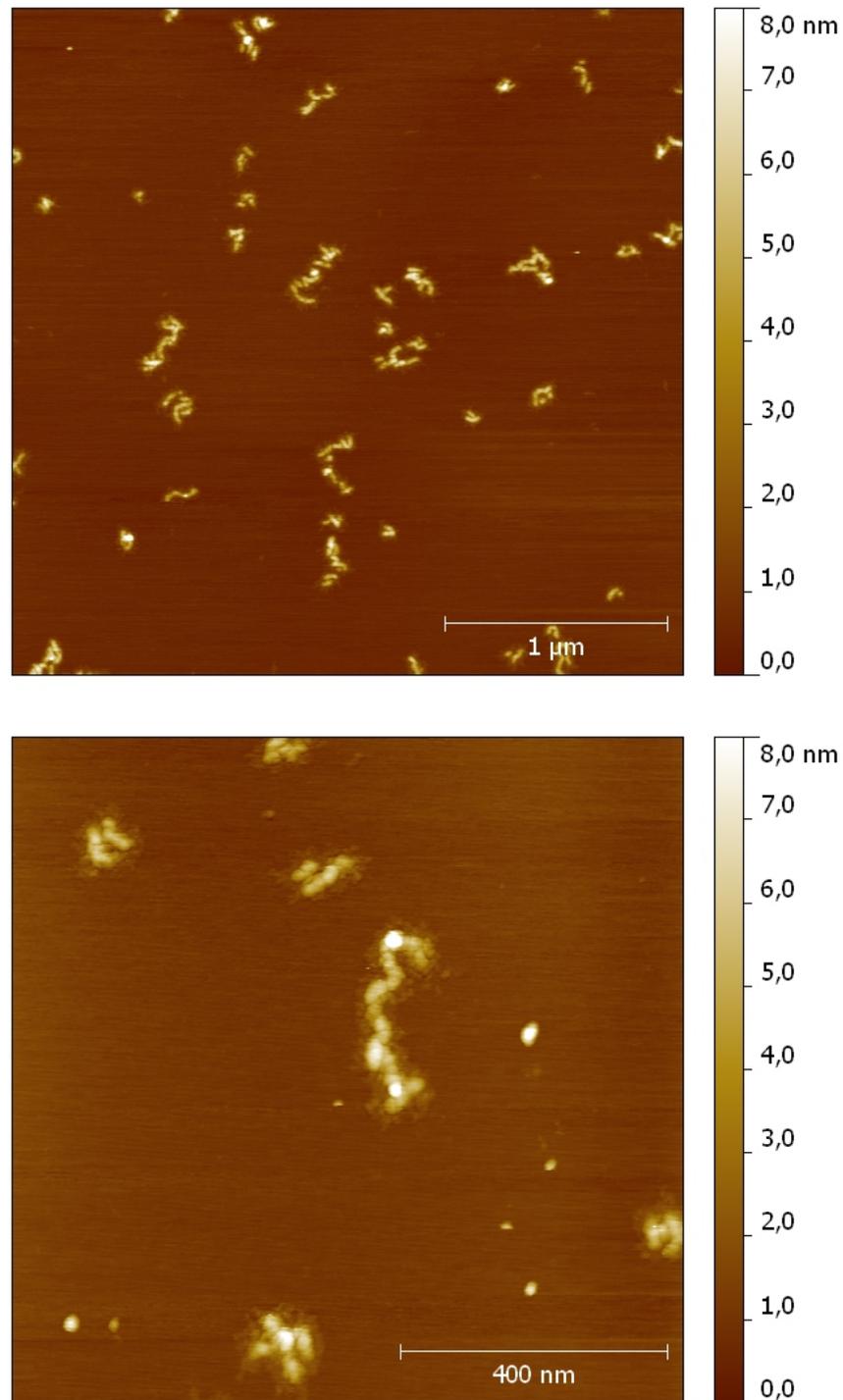


Abbildung 3.12: Desmin S13F (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Protofilament (ref. Kap.: 3.3.1).

Desmin WT_P

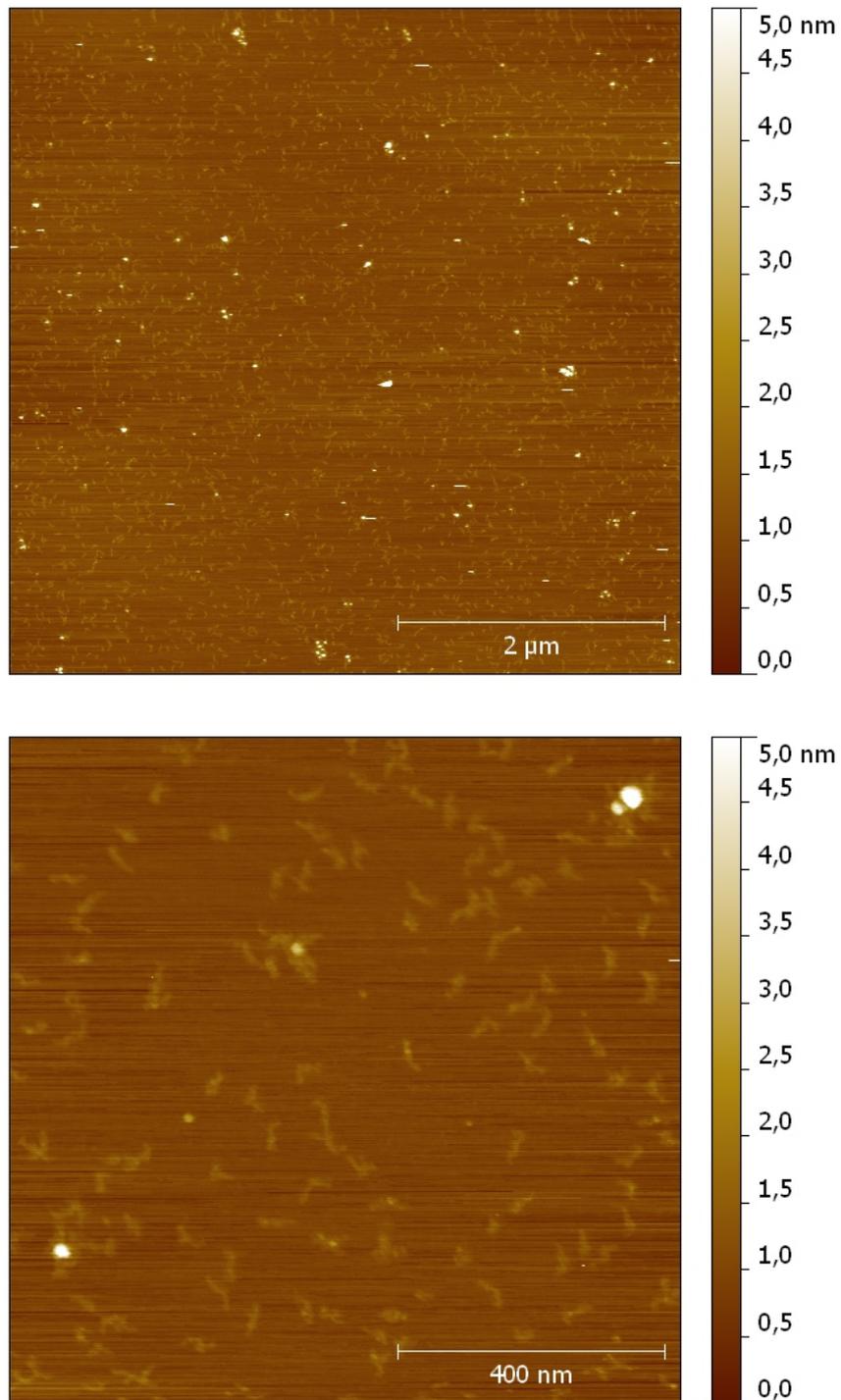


Abbildung 3.13: Desmin WT_P (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Tetramer und globuläre Struktur (ref. Kap.: 3.3.1).

3.3.2 Strukturuntersuchungen des Desmin Wildtyps und der Mutanten nach der Assemblierung

Desmin **WT** (s. S. 38 ff) assembliert zu Filamenten unterschiedlicher Länge (etwa 0,1 bis 1,2 μm). Die sichtbare Biegung der Filamente deutet auf Flexibilität hin. Am Filamentende bilden sich oftmals Knäuele, hier kann nicht unterschieden werden, ob es sich um Anlagerung von kleineren Strukturen oder um ein einzelnes, gewundenes Filament handelt. Die Filamente akkumulieren so stark miteinander, dass sich filamentöse Aggregate bilden. Die Oberflächenstruktur der Filamente erscheint heterogen. In Abbildung 3.3.2 (unten) besitzt das Filament eine rechtsgängige Windung. Diese Helixstruktur wurde mehrfach in variabler Ausprägung beobachtet. Zudem gibt es Filamente mit einer sehr lockeren faserigen Struktur (s. Abb. 3.15 (oben)) und Filamente mit eher granularer Oberfläche (s. Abb. 3.15 (unten)). Des Weiteren gibt es kurze Filamente mit kompaktem Kern umringt von Fransen (s. Abb. 3.16), diese sind den Protofilamenten ähnlich, die im DP-Puffer vorliegen (vgl. Abschn. 3.3.1). Freie, einzelne Tetramere, wie sie im DP-Puffer vorlagen, sind hier nur vereinzelt bis gar nicht zu finden.

In Abbildung 3.17 ist beispielhaft ein Profilschnitt durch ein Filament zu sehen. Innerhalb eines Filaments schwankt der Durchmesser extrem, daher wurden die Profilschnitte entlang des Filaments gelegt. Um die Höhe bestimmen zu können, wurde ergänzend ein Profilschnitt durch den Untergrund gemacht. Der Durchmesser entlang des Filaments schwankt zwischen 1 nm und 3 nm, der mittlere Filamentdurchmesser beträgt 2 nm.

Desmin **R454W** zeigt im Vergleich zum WT keine offensichtlichen Unterschiede (s. S. 41). Es gibt ebenso Filamente unterschiedlicher Länge, mit Rechtshändigkeit und filamentöse Aggregate.

Die nachfolgenden Mutanten bilden keine Filamente. Trotzdem lassen sich noch einige Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Zustand der Mutanten vor und nach der Inkubation im Assemblierungspuffer feststellen.

Der Übersichtsscan von Desmin **N116S** zeigt vorwiegend filamentöse Aggregate (s. Abb. 3.3.2, S. 42). Abbildung 3.3.2 (rechts) zeigt ein filamentöses Aggregat und (links) ein Protofilament. Vereinzelt sind Tetramere vorhanden, aber deutlich weniger als vor der Assemblierung (vgl. Abb. 3.8, S. 30).

Beim Desmin **N342D** ist die Abweichung von der WT-Struktur am gravierendsten (s. S. 43). Es existieren keine Filamente, nur einige wenige filamentöse Aggregate. Eine Besonderheit ist in sehr kleinen Strukturen zu sehen, die die gesamte Oberfläche bedecken. In der Vergrößerung in Abbildung 3.3.2 (links) zeigen sich hauptsächlich globuläre

3.3 Strukturuntersuchungen des Desmin Wildtyps und der Mutanten

Strukturen, einige könnten aber auch Fasern und damit Tetramere sein.

Das auffälligste Merkmal des Desmin **E114del** ist das homogene Erscheinungsbild (s. S. 44). Es gibt ausschließlich Protofilamente. Im Unterschied zu Desmin N116S sind diese Filamente weder akkumuliert noch gibt es filamentöse Aggregate. Im Vergleich zum Zustand vor der Assemblierung erscheint die Struktur identisch (vgl. S. 32).

Desmin **S358T** formt ebenfalls Protofilamente (s. S. 45). Die Oberfläche ist dicht belegt mit Tetrameren, wie es auch im DP-Puffer der Fall war. Die Protofilamente scheinen in der Tendenz etwas länger und akkumulierter zu sein. Im DP-Puffer lagen sie zumeist isoliert, hier bilden sie eher filamentöse Aggregate.

Vergleichbar mit Desmin S358T ist Desmin **S13F** (s. S. 46). Die Protofilamente sind tendenziell akkumulierter als im DP-Puffer (vgl. S. 34). Ebenso wie im DP-Puffer, liegen keine Tetramere vor.

Alle Beobachtungen zum Desmin WT und den Mutanten sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Zusammenfassende Beobachtungen zum Desmin WT und den Mutanten. Das Desmin wurde 1 h bei 37°C im Assemblierungspuffer inkubiert. Klammern: eingeschränktes Merkmal (siehe Text); ✓: Merkmal vorhanden; -: Merkmal nicht vorhanden.

Beschreibung	WT	R454W	N116S	N342D	E114del	S358T	S13F
Tetramere	-	-	(✓)	(✓)	-	✓	-
Protofilamente	(✓)	-	✓	-	✓	✓	✓
Filamente	✓	✓	-	-	-	-	-
Filamentöse Aggregate	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓
Div. Aggregate	-	-	-	✓	-	-	-

Der Desmin WT_P bildet lockere Filamente (s. S. 47 f). Im Vergleich zu den Desmin WT-Filamenten auf Seite 38 ff. erscheint der WT_P etwas linearer und weniger akkumuliert. Die Struktur der Filamente ist sehr faserig, aber vergleichbar mit dem anderen WT. Auffälligster Unterschied sind globuläre Strukturen, die innerhalb des Filaments hervorstechen. Ferner liegen einige freie Tetramere vor, Protofilamente konnten nicht gefunden werden.

Desmin WT

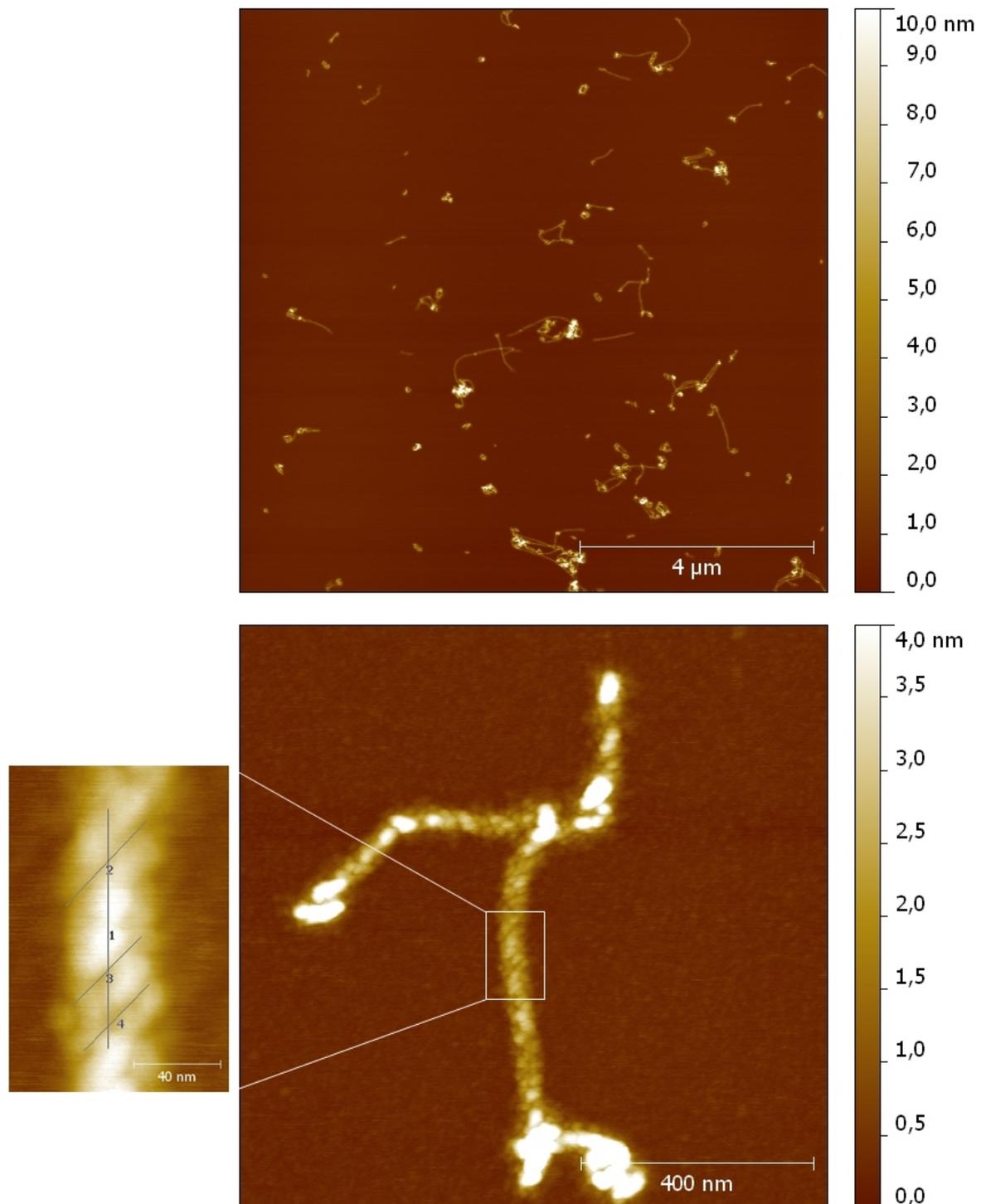


Abbildung 3.14: Desmin WT (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; oben: 10 μm Scan, Strukturen: Filamente und filamentöse Aggregate; unten: 1 μm Scan, Struktur: Filament; Ausschnitt links: 100 · 150 nm, der Winkel der Drehung zur Filamentachse beträgt etwa 44° (ref. Kap.: 3.3.2).

3.3 Strukturuntersuchungen des Desmin Wildtyps und der Mutanten

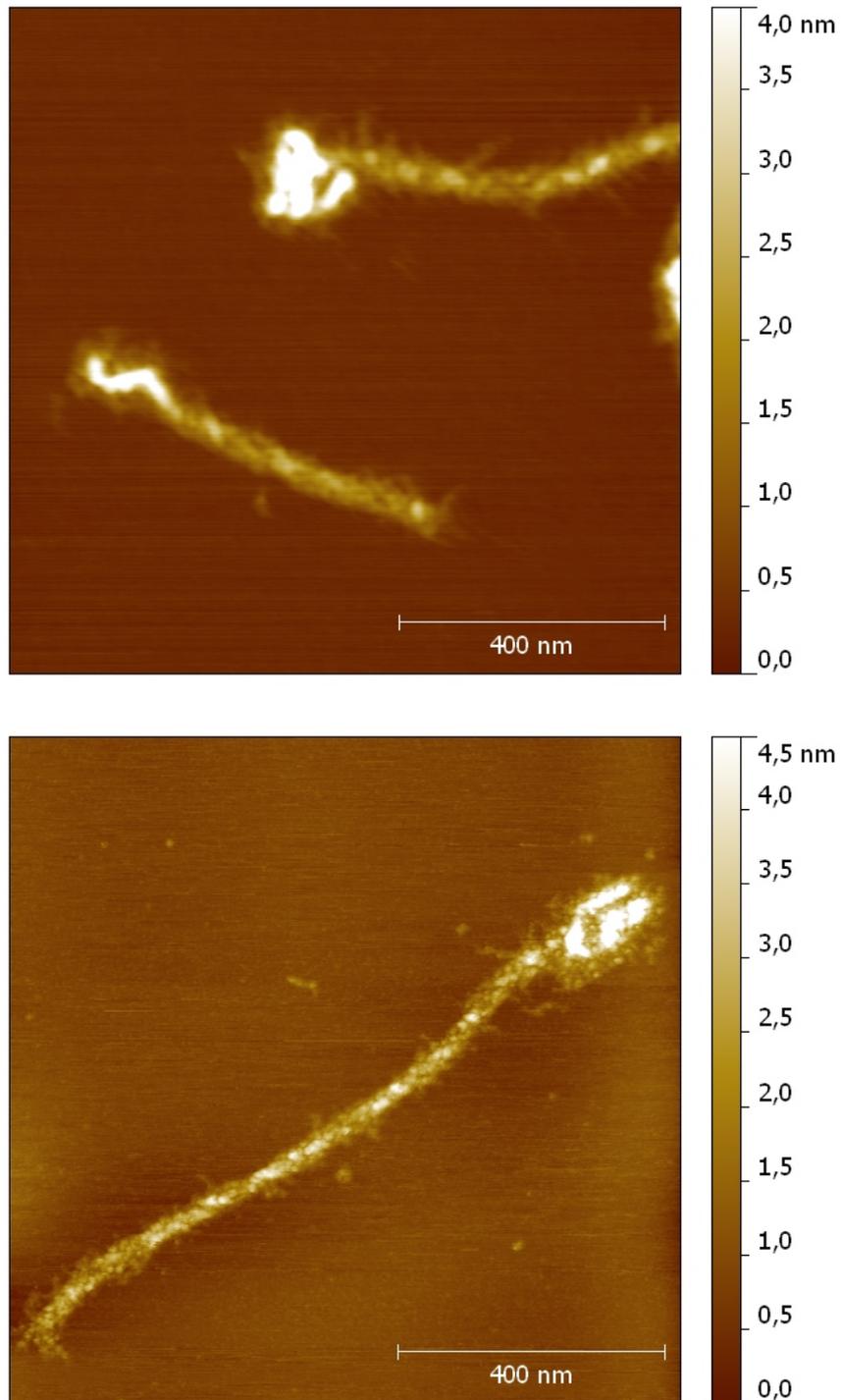


Abbildung 3.15: Desmin WT (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica (ref. Kap.: 3.3.2).

3 Ergebnisse

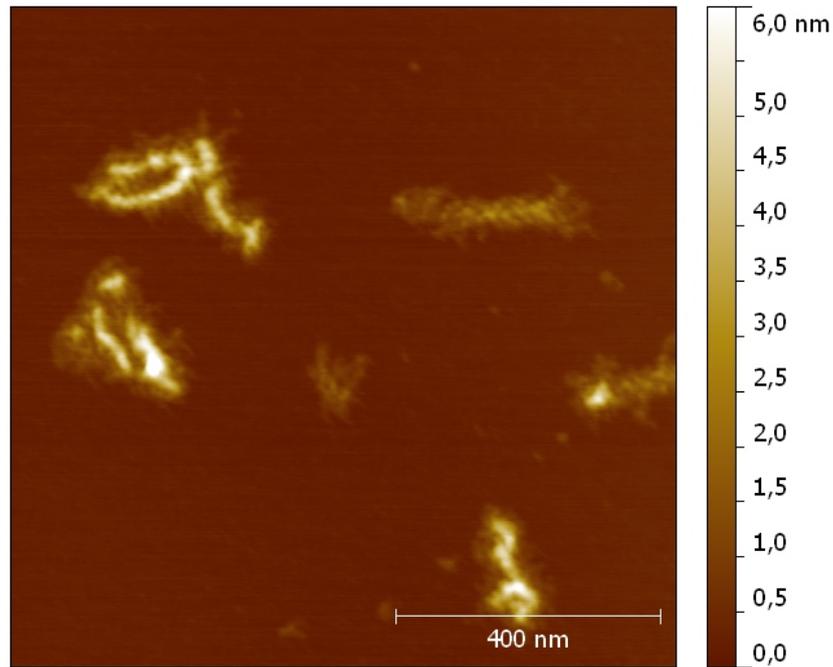


Abbildung 3.16: Desmin WT (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Filament und Protofilament-ähnlich (ref. Kap.: 3.3.2).

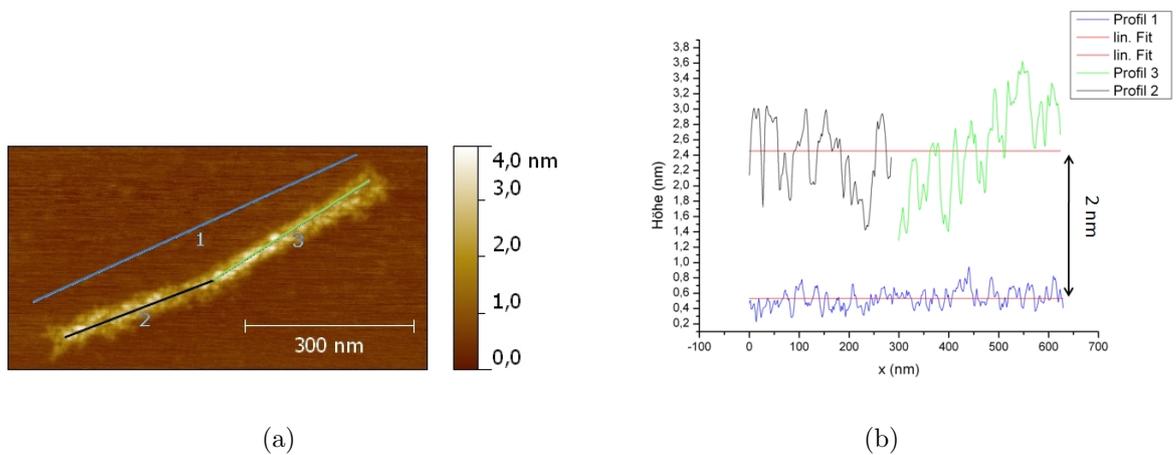


Abbildung 3.17: (a): Desmin WT mit Profilschnitten; Profilschnitte in (a) entsprechen den Graphen gleicher Farbe in (b); (b): in rot lineare Fits durch den Untergrund und das Filament, die Distanz 2 nm entspricht der mittleren Höhe des Filaments. Der Filamentdurchmesser schwankt deutlich und liegt zwischen 1 nm und 3 nm.

Desmin R454W

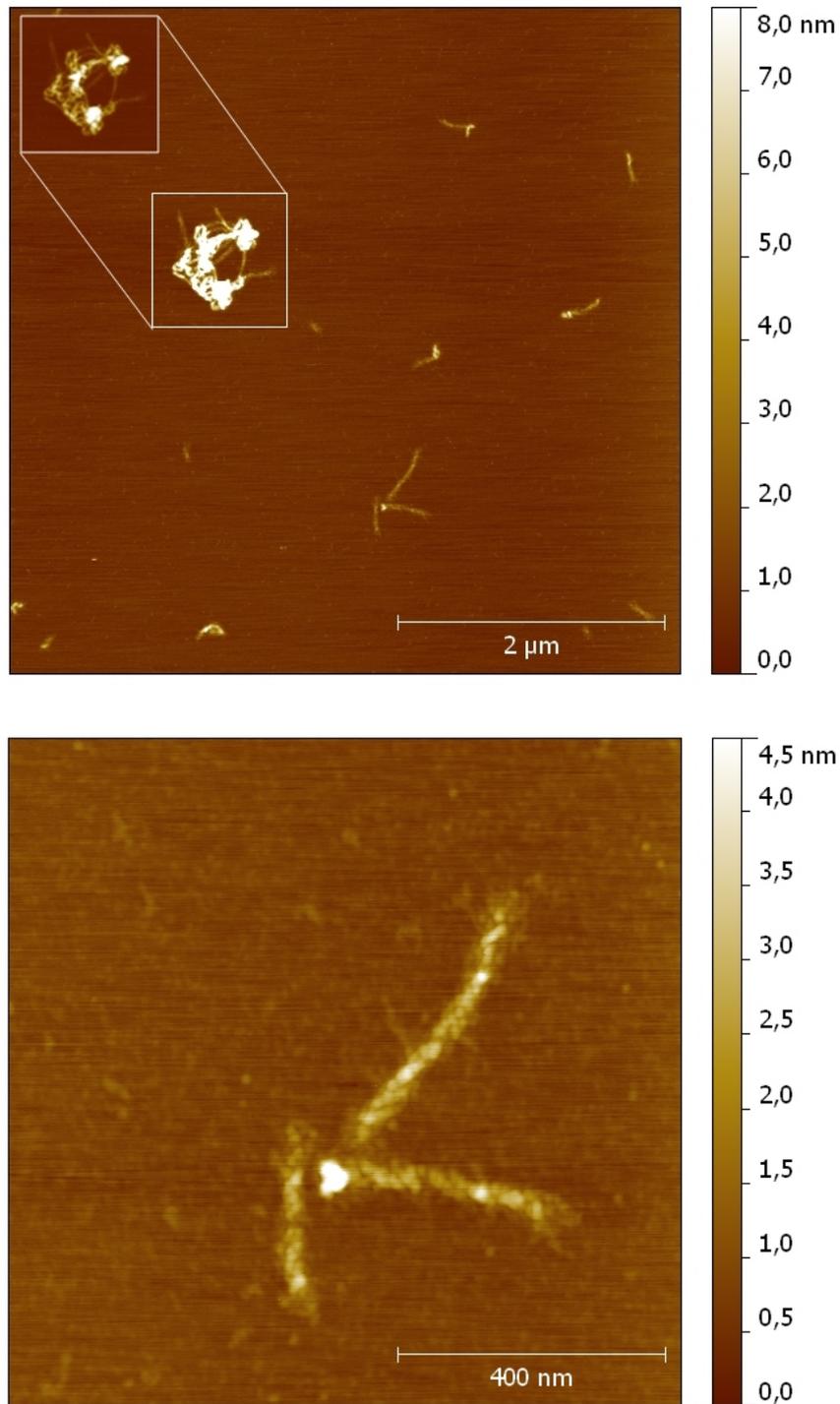


Abbildung 3.18: Desmin R454W (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Filamente und filamentöses Aggregat; oben: 5 μm Scan, Ausschnitt: 22 nm Höhenskalierung; unten: 1 μm Scan (ref. Kap.: 3.3.2).

Desmin N116S

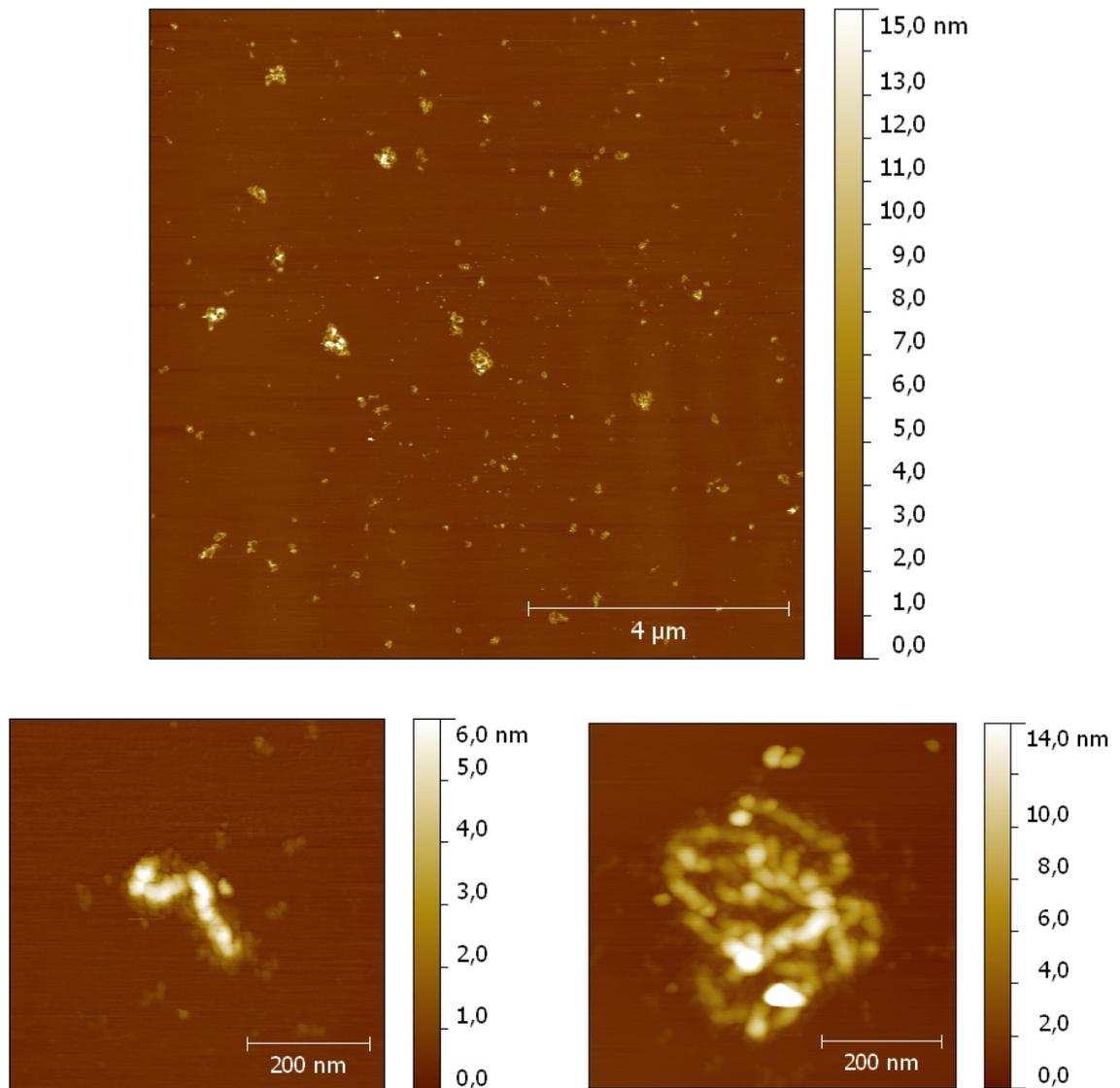


Abbildung 3.19: Desmin N116S (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: filamentöse Aggregate und Protofilamente; unten links: Protofilament; unten rechts: filamentöses Aggregat (ref. Kap.: 3.3.2).

Desmin N342D

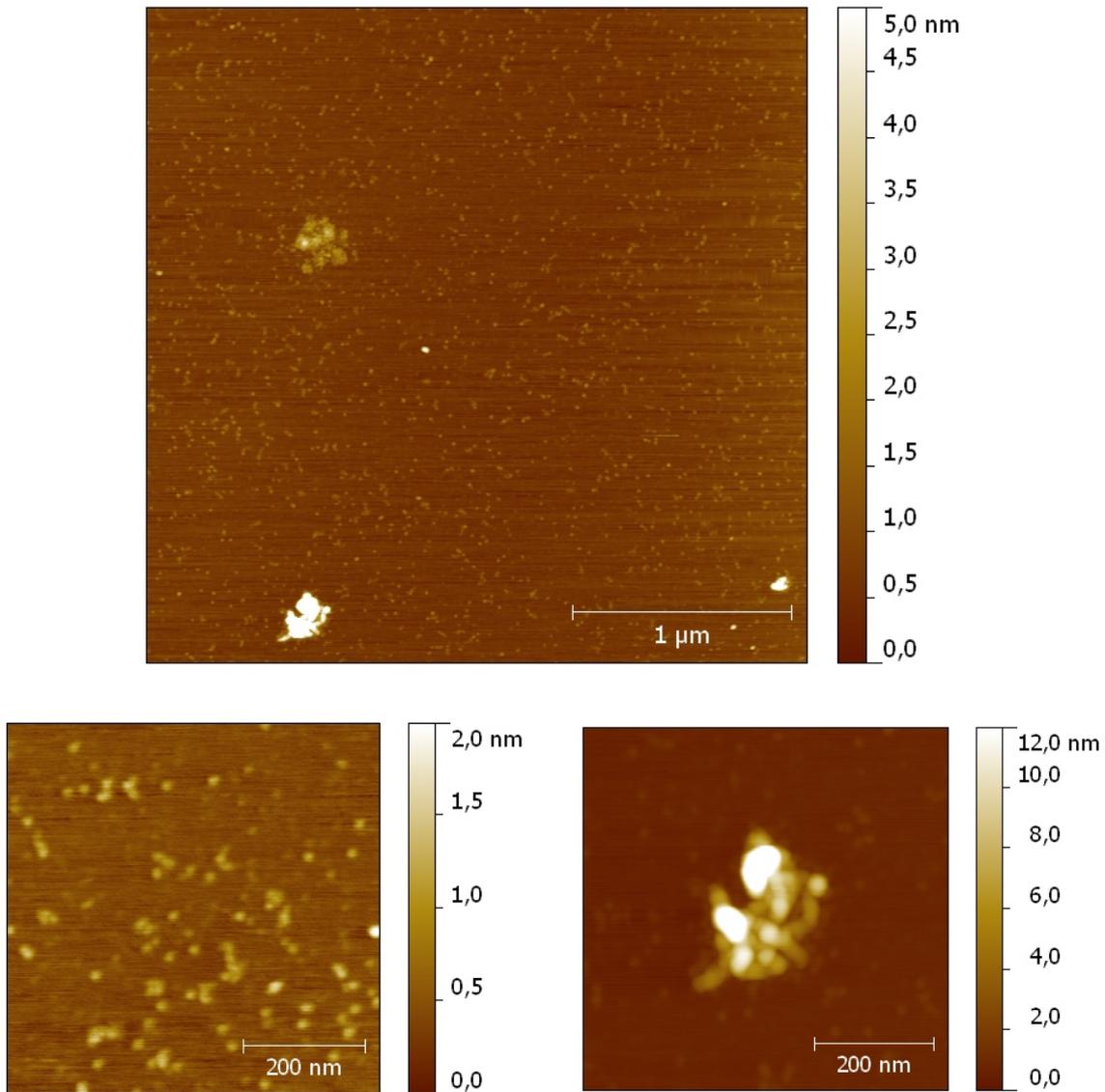


Abbildung 3.20: Desmin N342D (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; unten links: globuläre, Tetramer-ähnliche Struktur; unten rechts: filamentöses Aggregat (ref. Kap.: 3.3.2).

Desmin E114del

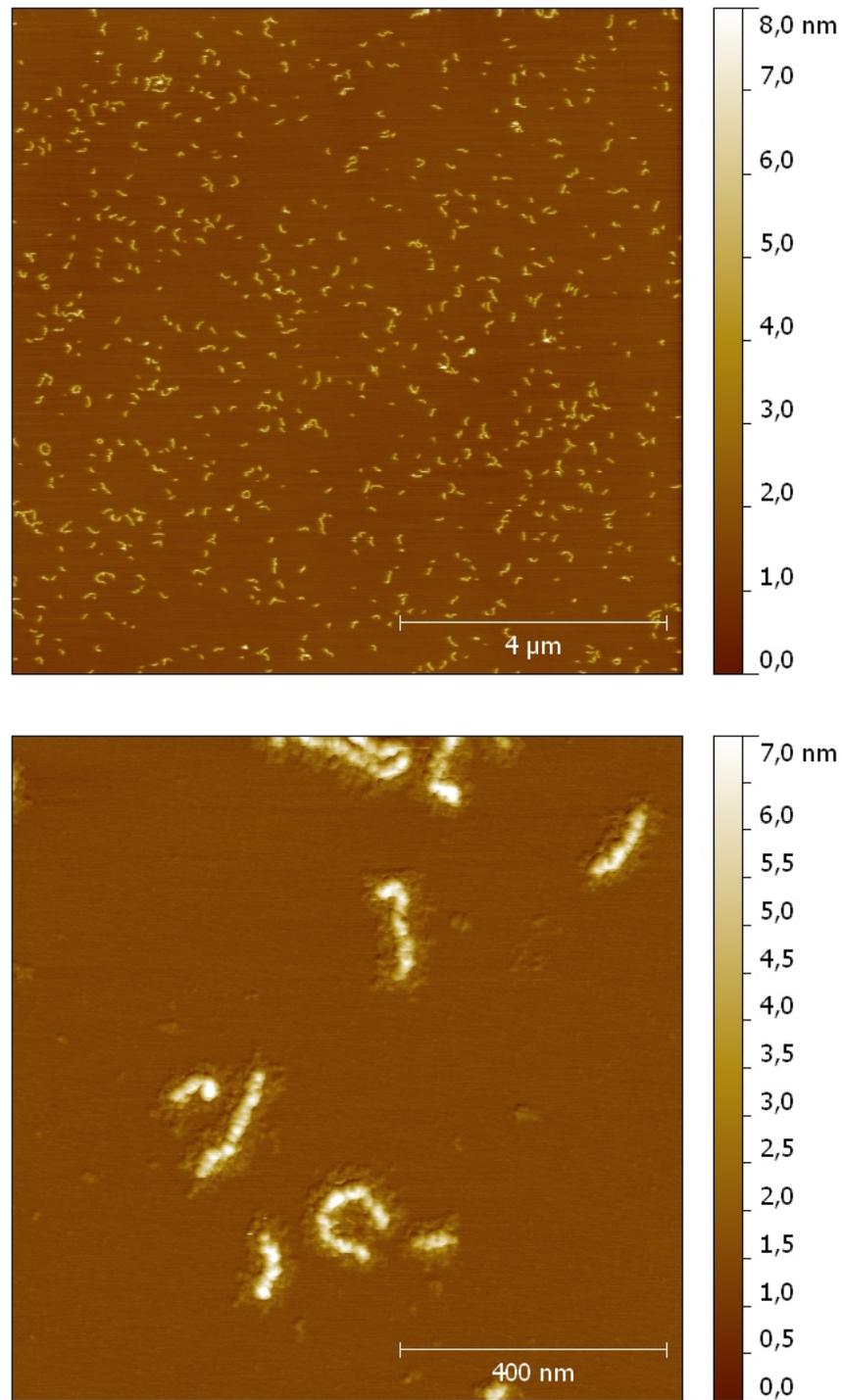


Abbildung 3.21: Desmin E114del (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Protofilamente (ref. Kap.: 3.3.2).

Desmin S358T

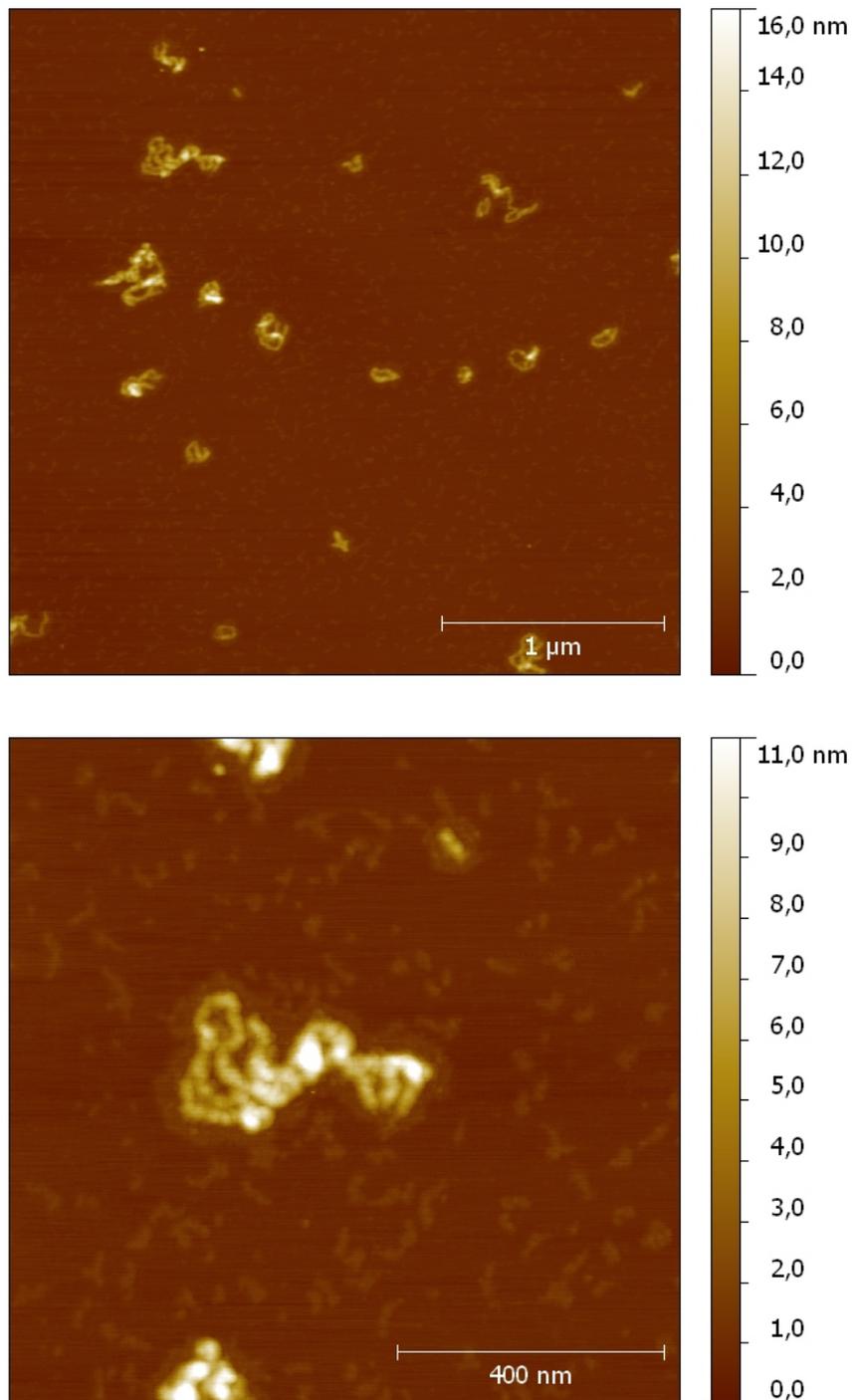


Abbildung 3.22: Desmin S358T (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Tetramere, Protofilamente und filamentöse Aggregate (ref. Kap.: 3.3.2).

Desmin S13F

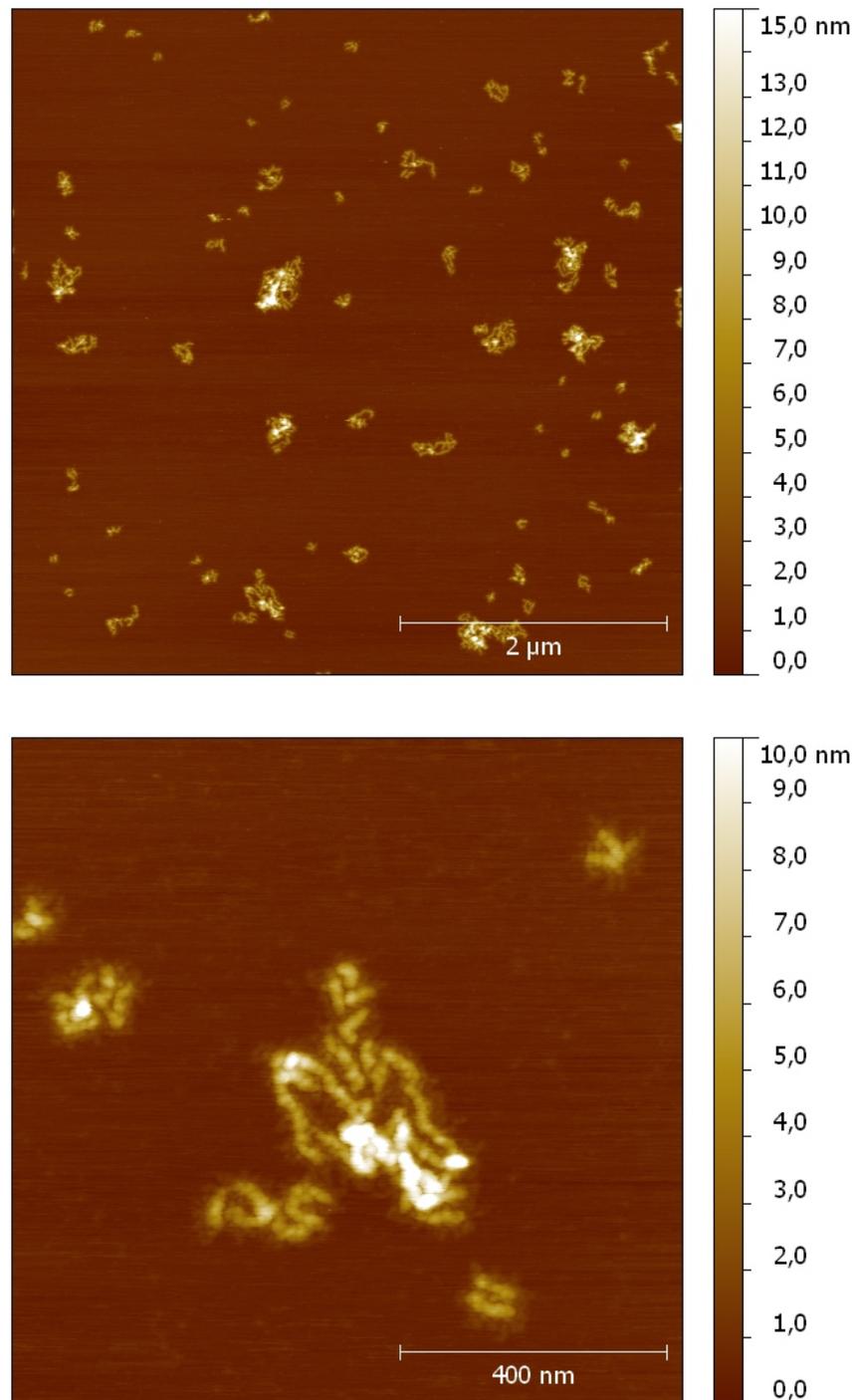


Abbildung 3.23: Desmin S13F (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Protofilamente und filamentöse Aggregate (ref. Kap.: 3.3.2).

Desmin WT_P

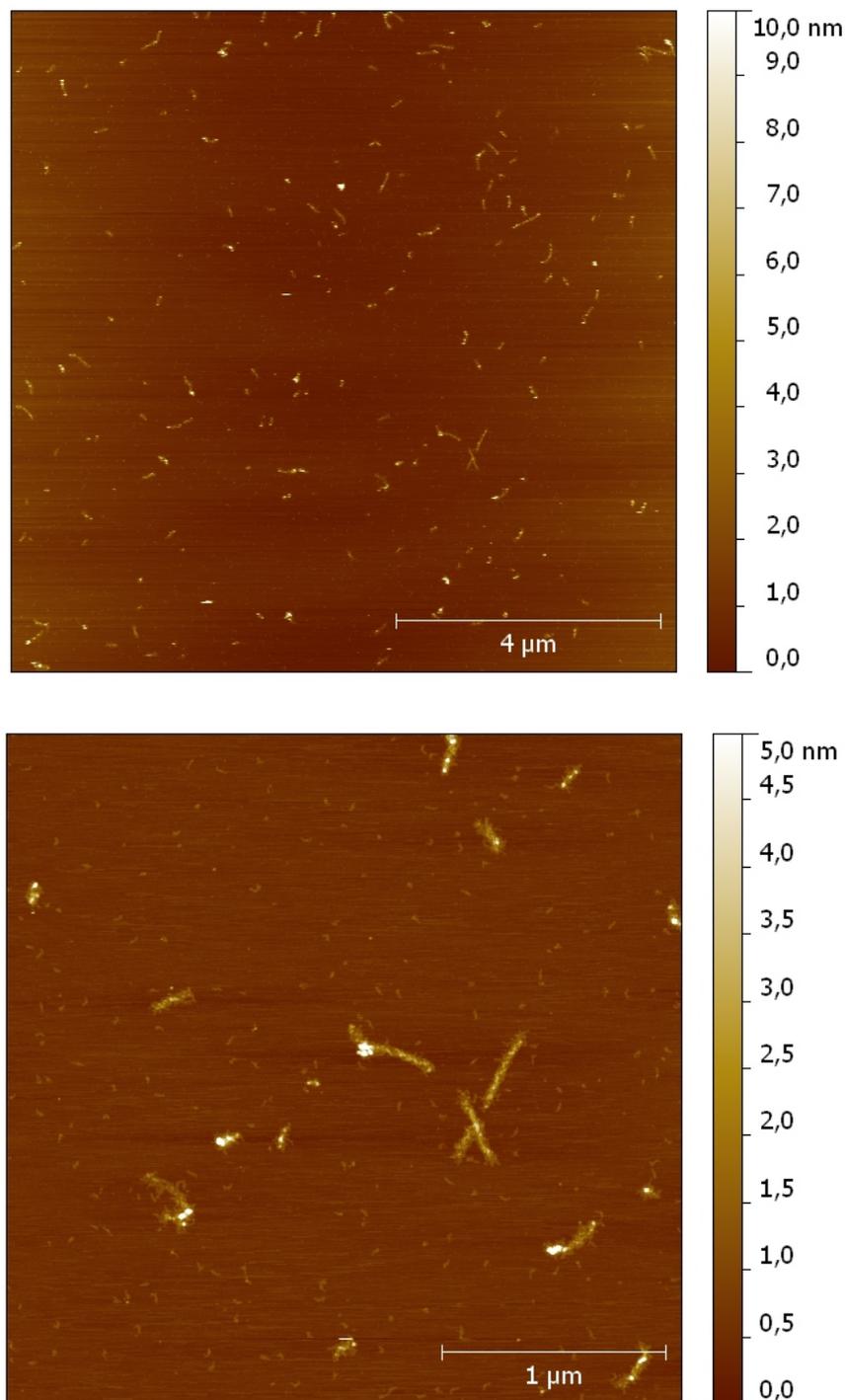


Abbildung 3.24: Desmin WT_P (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Tetramere und Filamente (ref. Kap.: 3.3.2).

3 Ergebnisse

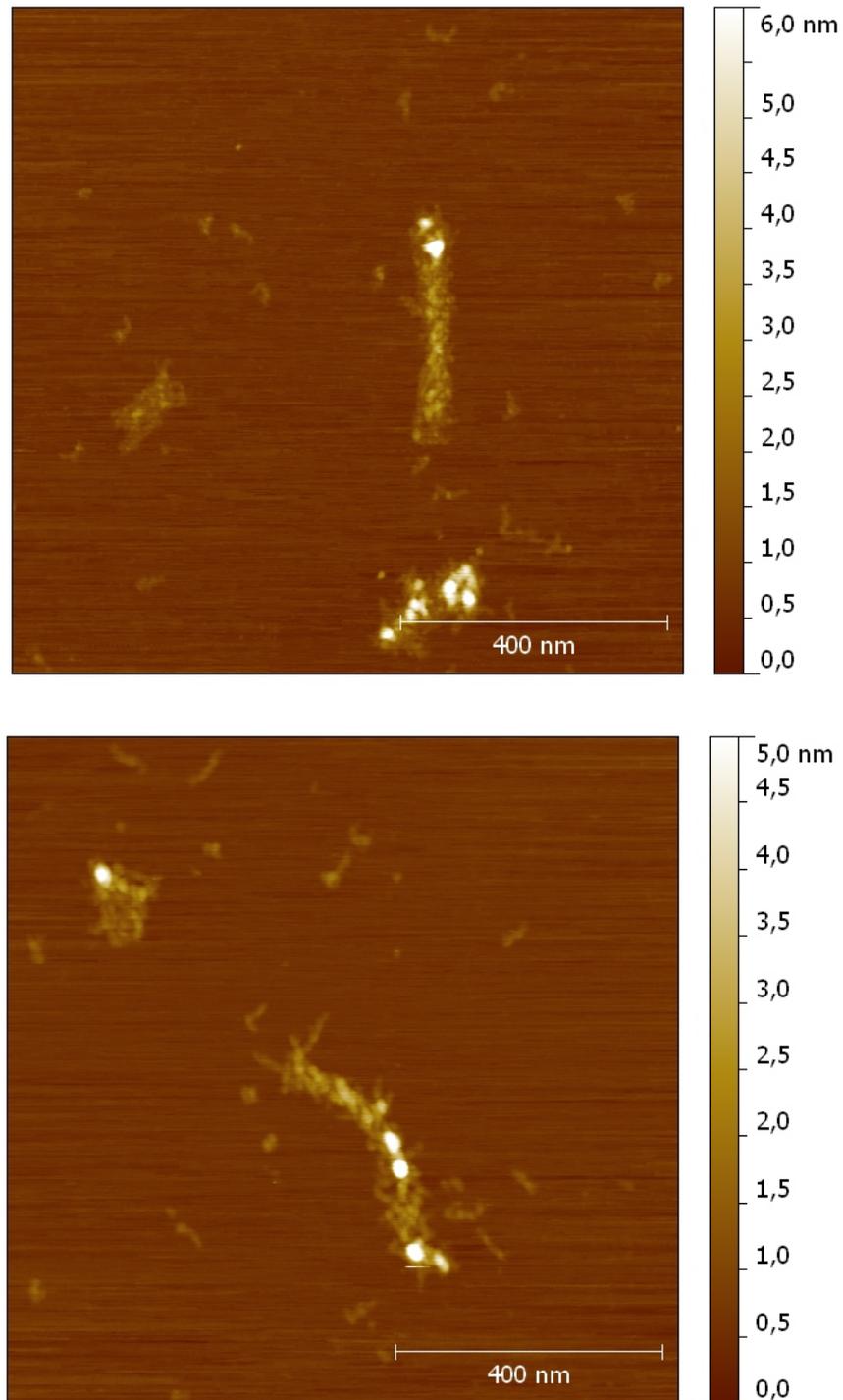


Abbildung 3.25: Desmin WT_P (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; (ref. Kap.: 3.3.2).

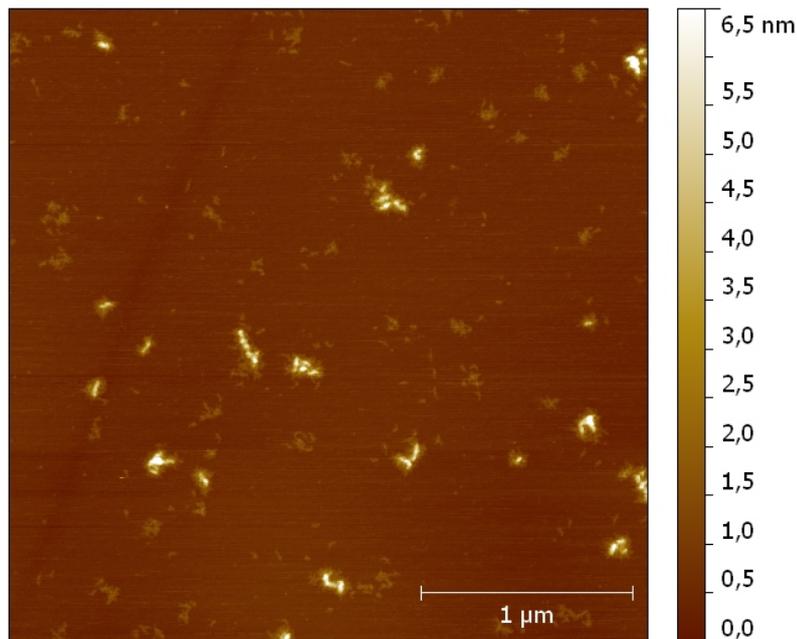


Abbildung 3.26: Desmin WT wenige Sekunden nach Zugabe von Assemblierungspuffer.

3.4 Einfluss der Assemblierungszeit

3.4.1 Desmin WT

Der Desmin WT wurde in verschiedenen Assemblierungsphasen beobachtet, um einen besseren Einblick in den Assemblierungsprozeß zu erhalten.

Die Strukturen, wie sie im DP-Puffer vorliegen, wurden bereits in Kapitel 3.3.1 (S. 29) gezeigt. Vorwiegend wurden gleichmäßig verteilte Tetramere, aber auch Protofilamente beobachtet.

Wird der Desmin-Lösung Assemblierungspuffer zugegeben und nach wenigen Sekunden auf der Micaoberfläche immobilisiert, akkumulieren die Tetramere (s. Abb. 3.26). Zehn Minuten nach Zugabe von Assemblierungspuffer und anschließender Immobilisierung, können fast keine Tetramere mehr beobachtet werden. Es liegen vorwiegend die Protofilamente vor (s. Abb. 3.27).

Nach einer Stunde Assemblierungszeit bei 37°C haben sich lange, lockere Filamente gebildet (vgl. Kap. 3.3.2, S. 38 ff). Im letzten Schritt wurde diese Desmin-Lösung vier Tage im Kühlschrank bei etwa 1°C gelagert und anschließend nochmals untersucht. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 3.28 auf Seite 51. Die Assemblierung scheint innerhalb der vier Tage noch weiter vorangeschritten zu sein. Es haben sich große Agglomerate aus

3 Ergebnisse

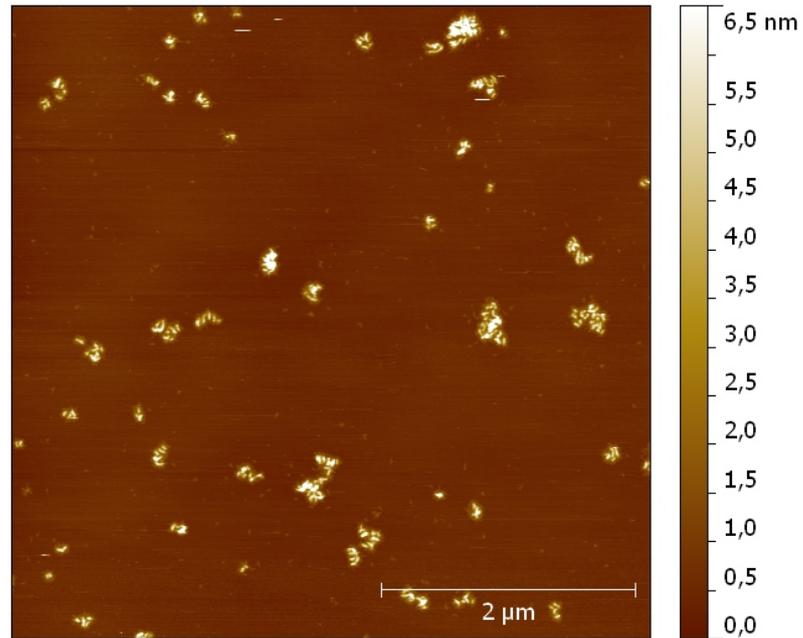


Abbildung 3.27: Desmin WT 10 Minuten bei RT nach Zugabe von Assemblierungspuffer.

langen Filamenten gebildet, eine innere Struktur der Filamente ist nicht erkennbar.

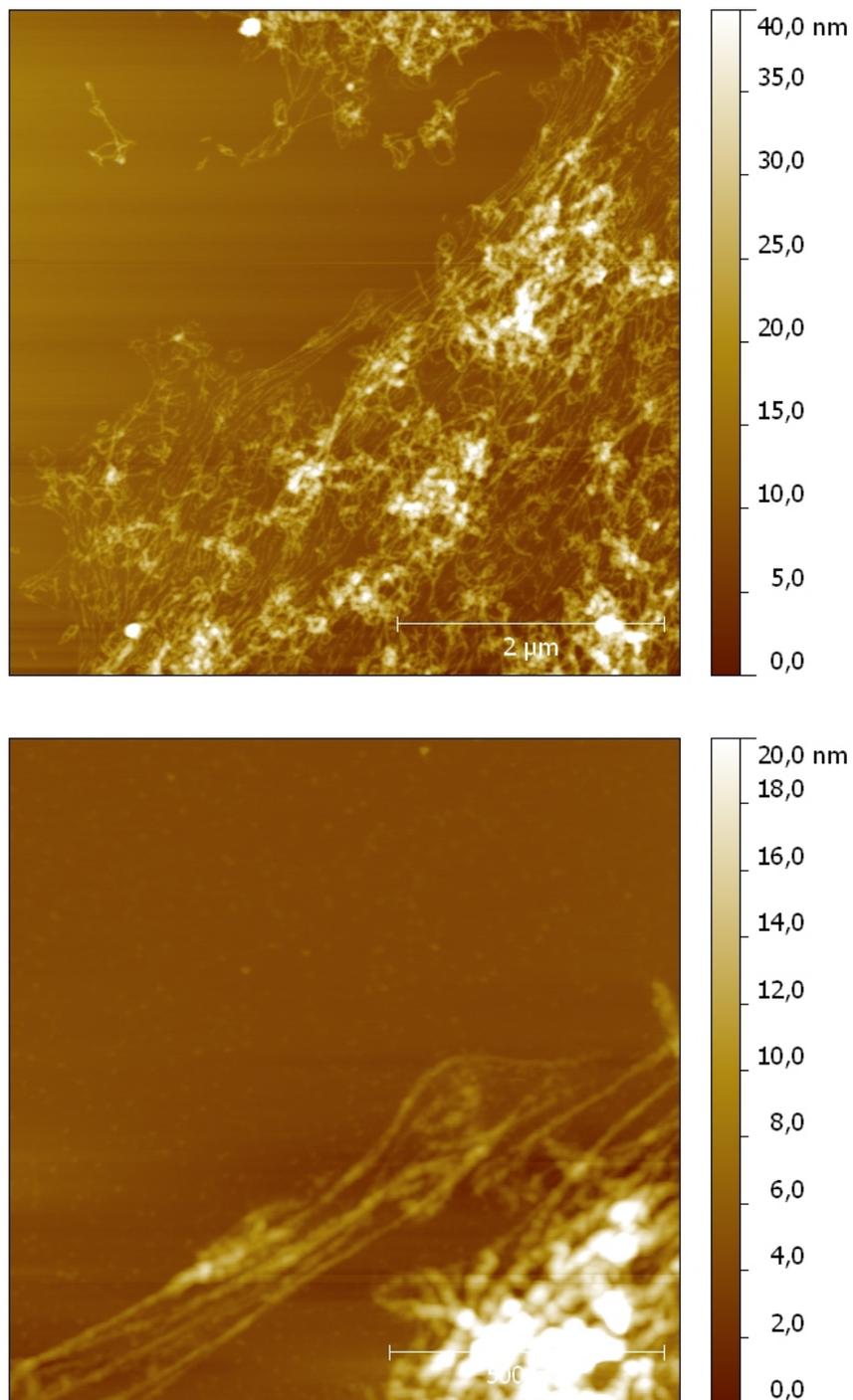


Abbildung 3.28: Desmin WT 1 h bei 37°C und 4 Tage bei 1°C im Assemblierungspuffer inkubiert, dann auf APTES-Mica abgebildet.

3.4.2 Desmin S13F

Die Mutante S13F wurde ebenfalls, wie der WT, vier Tage im Assemblierungspuffer bei 1°C inkubiert und anschließend untersucht (s. Abb. 3.29). Bei S13F ist kein Unterschied zwischen einer Stunde (vgl. S. 46) und vier Tagen Inkubationszeit erkennbar.

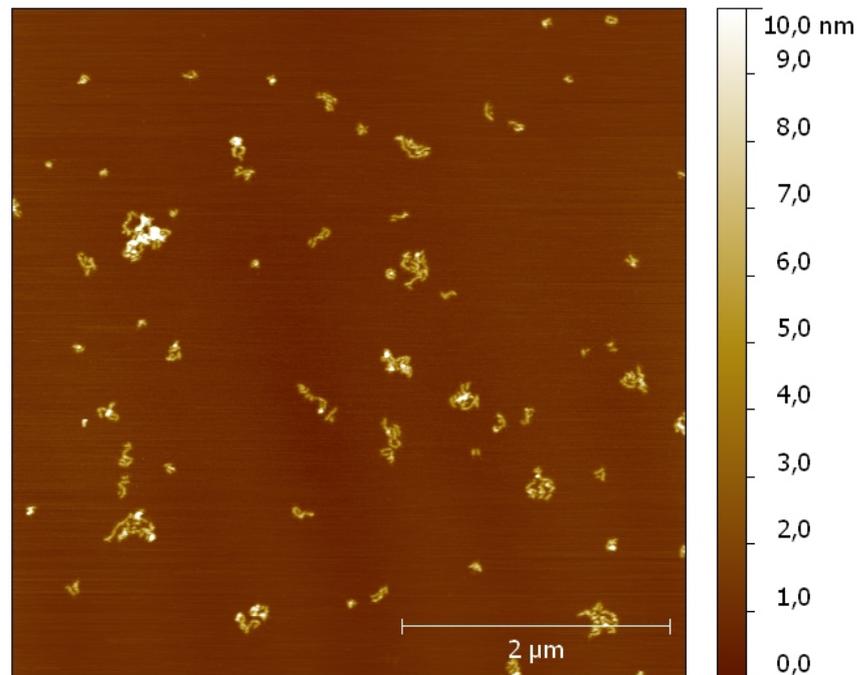


Abbildung 3.29: Desmin S13F 1 h bei 37°C und 4 Tage bei 1°C im Assemblierungspuffer inkubiert, dann auf Mica abgebildet.

3.5 Desmin transfizierte Zellen

Zeitgleich zu dieser Arbeit wurden von Herrn Andreas Brodehl (Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen) Zelltransfektionsstudien durchgeführt.

Die Desmin WT und Desmin R454W transfizierten Zellen zeigten cytoplasmatische filamentöse Netzwerke. Eine Transfektion mit Desmin S13F und Desmin S358T führte ebenfalls zu filamentösen Netzwerken mit variabler Gestalt. Bei Desmin N342D, N116S und E114del wurden cytoplasmatische Aggregate mit einer breiten Größenverteilung beobachtet (s. Abb. 3.30).

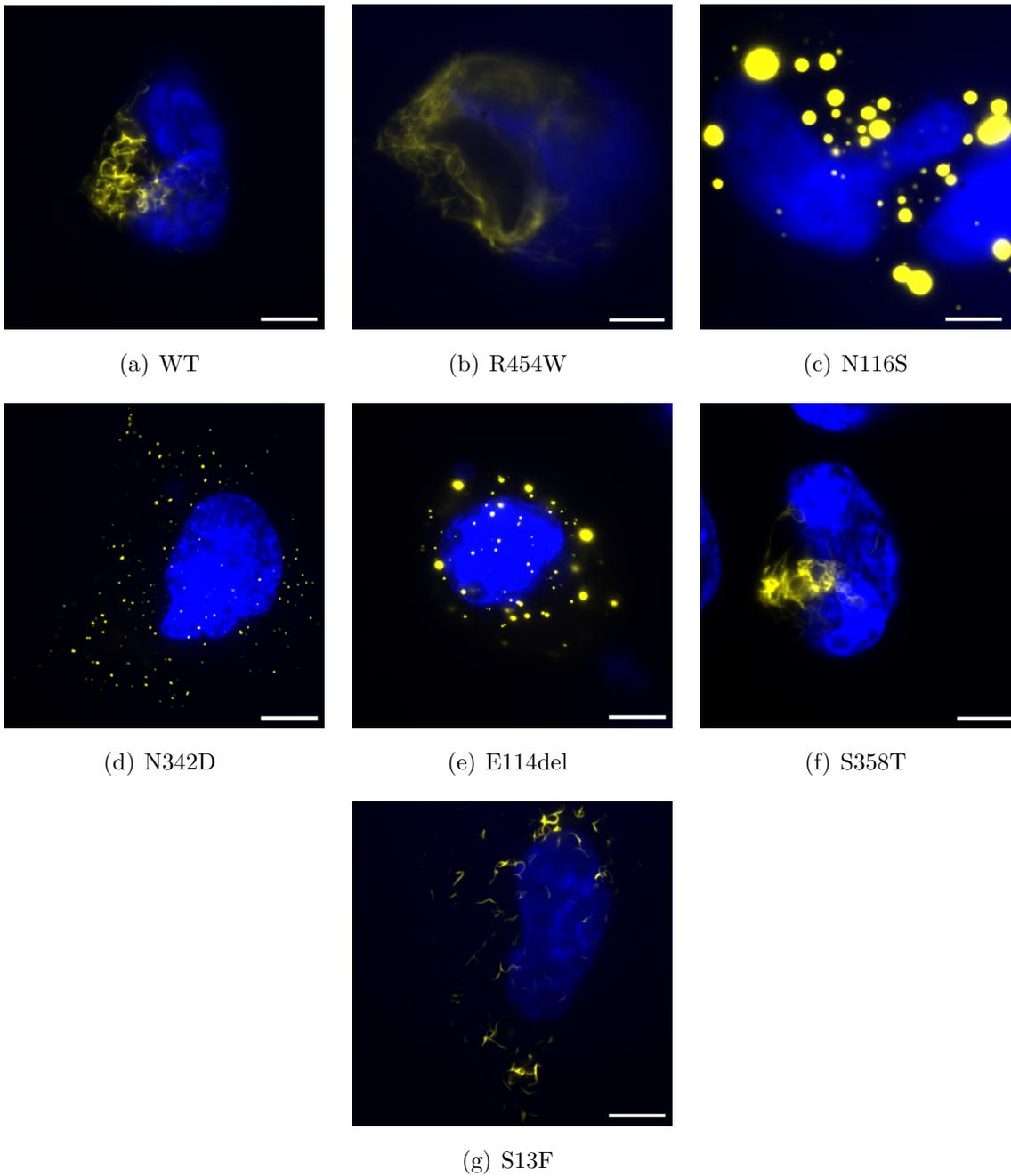


Abbildung 3.30: Fluoreszenzaufnahmen von SW-13-Zellen. Desmin wurde mit eYFP (*enhanced yellow fluorescence protein*) gelabelt und der Zellkern mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) eingefärbt; (a), (b), (f) und (g): cytoplasmatische filamentöse Netzwerke; (c), (d) und (e): cytoplasmatische Aggregate.

4 Diskussion

4.1 Desmin Assemblierung

Die Untersuchungen vom Desmin im DP-Puffer geben einen Einblick in ein frühes Assemblierungsstadium. Der von Herrmann und Aebi sowie Kirmse beschriebene Tetramer-Status konnte in dieser Arbeit nur zum Teil bestätigt werden. Es ist zu beobachten, dass der Desmin WT Fasern mit einer durchschnittlichen Länge von 51 nm (± 12) und einem Durchmesser deutlich unter 1 nm entwickelt. Diese Länge lässt vermuten, dass es sich um Tetramere handelt, da sich diese aus zwei antiparallel versetzten Dimeren (~ 45 nm) zusammensetzen. Aufgrund der leichten Variationen in den Faserlängen könnte es sich ebenfalls um eine Mischung aus Dimeren, Tetrameren und/oder Oligomeren handeln.

In diesem frühen Assemblierungsstatus liegt eine weitere Struktur vor: Perlenkettenartige Filamente mit einem Saum aus Fasern. Sie haben eine Dicke von etwa 5 nm und eine Länge von 60 bis 200 nm. Bei den 60 nm langen Filamenten könnte es sich um ULFs handeln, die längeren Filamente könnten aus mehreren longitudinal verbundenen ULFs bestehen. Daher sind sie als Vorstufe zum Filament zu verstehen und werden deshalb in dieser Arbeit als Protofilament bezeichnet.

Im nächsten Assemblierungsschritt akkumulieren die Tetramere bei Zugabe von Assemblierungspuffer. Nach zehn Minuten Assemblierungszeit liegen vorwiegend Protofilamente vor. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Tetramere zunächst zu Protofilamenten assemblieren. Durch die Zugabe von Salz kann die elektrostatische Abstoßung zwischen den Tetrameren abgeschirmt (Gegenionen) und somit die Löslichkeit im Puffer verringert werden. Wie weit der Assemblierungsprozess während der Dialyse voranschreitet könnte demzufolge empfindlich von der Ionenstärke im Puffer abhängen und somit das leicht unterschiedliche Erscheinungsbild zum Desmin WT_P und anderen, wo vorwiegend Tetramere nach der Dialyse vorliegen, erklären.

Nach einer Stunde Assemblierungszeit bei 37°C haben sich ausgedehnte Filamente (bis etwa 1,2 μm) gebildet. Die Struktur dieser Filamente unterscheidet sich gravierend von der Struktur der Protofilamente. Der auffälligste Unterschied besteht im geringeren

Durchmesser der Filamente im Vergleich zum Protofilament. Diese „radiale Kompaktierung“ mit fortschreitender Assemblierung wurde ebenfalls von Harald Herrmann u. a. sowie Stromer u. a. beobachtet, somit erfolgt eine Bestätigung des allgemein akzeptierten Assemblierungsmodells. Ferner konnte eine Rechtshändigkeit und ein variabler Durchmesser entlang des Filaments beobachtet werden. Auch diese wurden bereits von N. Mücke u. a. bei Desmin sowie von Herrmann und Aebi bei Vimentin festgestellt. Die veränderte Struktur und die radiale Kompaktierung während der Assemblierung von Protofilament (~5 nm) zu Filament (~2 nm) deuten darauf hin, dass sich die Tetramere innerhalb des Filaments deutlich neu ordnen.

Der Durchmesser von IF liegt in der Literatur bei ~10 nm. Dieser unterscheidet sich wesentlich von dem in dieser Arbeit gefundenen. Da die meisten Messungen mit EM (~9-15 nm) und in seltenen Fällen mit AFM in Flüssigkeit (~4.5 nm (Kreplak u. a., 2008)) durchgeführt wurden, ist die Differenz auf die Probenpräparation zurückzuführen.

Nach vier Tagen Assemblierungszeit haben sich große, filamentöse Aggregate/Netzwerke gebildet. Zwar können keine einzelnen Filamente ausgemacht werden, doch die Assemblierung zu längeren Filamenten scheint weiter vorangeschritten zu sein.

4.2 Vergleich Desmin WT und Mutanten

Die einzige Mutante, die WT-typische Filamente formt, ist Desmin **R454W**. Die Beobachtung von Bär u. a., dass Desmin R454W nicht so lange Filamente bilden kann wie der WT, konnte nicht nachvollzogen werden. Die Filamentlängen von Desmin R454W nach einer Stunde Assemblierung sind vergleichbar mit denen des Desmin WT. Das die Mutation R454W keinen Einfluss auf die *in vitro* Assemblierung hat, passt mit den Untersuchungen von Kaufmann u. a. zusammen. Diese stellten kein verändertes Assemblierungsverhalten bei modifiziertem Desmin, welchem die letzten 27 AS der *Tail*-Domäne fehlen, fest. Dies lässt vermuten, dass sie für die *in vitro* Assemblierung nicht notwendig sind. Das beobachtete Ergebnis stimmt ebenfalls mit den Zelltransfektionsstudien überein, die keine Unterschiede zum WT zeigen.

Desmin **N116S** weist im DP-Puffer keinen Unterschied zum WT auf. Es existieren sowohl Tetramere als auch Protofilamente. Nach einer Stunde Assemblierung liegen Protofilamente vor, die größtenteils zu filamentösen Aggregaten akkumuliert sind. Da keine ausgedehnten Filamente vorliegen, scheint die Assemblierung durch die Mutation gestört zu sein. Ferner liegen nur vereinzelt Tetramere vor, dies lässt vermuten, dass die Assemblierung nach der Bildung von ULFs bzw. Protofilamenten beeinträchtigt ist. Dieses Er-

gebnis wird durch Zelltransfektionsstudien gestützt, in denen ausschließlich aggregiertes Desmin beobachtet wurde.

Vor der Assemblierung liegen bei Desmin **N342D** Tetramere und Aggregate vor. Nach einer Stunde Assemblierung sind Aggregate und kleine Strukturen zu beobachten. Die Größe der Strukturen ähnelt der von Tetrameren, die Struktur selbst ist jedoch eher globulär. Eine Assemblierung zu Protofilamenten oder Filamenten erfolgt nicht. Auf Grund der globulären Strukturen wird vermutet, dass die Assemblierung in einem sehr frühen Stadium gestört ist. Ferner zeigen die Zelltransfektionsstudien cytoplasmatische Aggregation von Desmin N342D, dies bestätigt die Ergebnisse.

Desmin **E114del** und Desmin **S13F** bilden ähnliche Strukturen. Sowohl vor als auch nach der Assemblierung liegen ausschließlich Protofilamente vor. Bei beiden ist die Assemblierung zu ausgedehnten Filamenten beeinträchtigt. Besonders deutlich wird dies bei der längeren Assemblierungszeit von Desmin S13F: Nach vier Tagen Inkubation im Assemblierungspuffer liegen unverändert ausschließlich Protofilamente vor. Die Zelltransfektionsstudien bestätigen, dass Desmin E114del keine Filamente ausbildet. Konträr bildet Desmin S13F in der Zelle cytoplasmatische Filamente. Dieser Unterschied zwischen *in vitro* und *in vivo* deutet darauf hin, dass eine direkte Übertragung der *in vitro* Beobachtungen auf die Verhältnisse in der Zelle nicht möglich ist und nur eine Kombination aus mehreren Untersuchungsmethoden Aufschluss über die tatsächlichen Verhältnisse geben kann. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz ist die Existenz von Kofaktoren, die in der Zelle die Assemblierung stabilisieren, beispielsweise Hitzeschockproteine.

Bei der Variation **S358T** scheint die Assemblierung insgesamt gestört zu sein. Desmin S358T bildet zwar Protofilamente, aber es liegen nach einer Stunde Assemblierungszeit immer noch sehr viele Tetramere vor. Die Zellen, die mit dieser Variante transfiziert wurden, bilden ein filamentöses Netzwerk. Ähnlich zu Desmin S13F weichen *in vitro* und *in vivo* Assemblierung voneinander ab.

4.3 Zusammenfassung & Ausblick

Es konnte erfolgreich eine Methode etabliert werden, die es erlaubt, in kurzer Zeit reproduzierbare Daten von Desmin WT und Mutanten zu erfassen. Mittels AFM wurde die Struktur von Desmin-Proteinen hochaufgelöst untersucht. Auf Basis des allgemein anerkannten Assemblierungsmodells konnten die gefundenen Strukturen zugeordnet und benannt werden. Somit war es möglich, die Assemblierungsphase zu bestimmen, bei der

die Assemblierung zum Filament durch die Mutation beeinflusst wird.

Mit Hilfe des AFM wurde der Aufbau der Strukturen im Detail erfasst. So ließ sich eine Rechtshändigkeit der ausgebildeten Filamente und die perlekettenartige Form der Protofilamente beobachten. Ferner wurden sehr kleine Strukturen, wie Tetramere (< 1 nm), aufgelöst.

Die *in vitro* Untersuchungen mittels AFM zeigen, dass die Desmin-Mutanten N116S, N342D, E114del, S13F und die Variante S358T keine ausgedehnten Filamente bilden. Im Vergleich mit den *in vivo* Zelltransfektionsstudien wird deutlich, dass die Mutante S13F und Variation S358T einen untergeordneten Einfluss auf die Filament-Assemblierung innerhalb der Zelle haben.

Die Mutation N342D aggregiert sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Bei heterozygoten Zelltransfektionsstudien, d.h. die Zellen exprimieren Desmin WT und N342D, bilden sich die normalen cytoplasmatischen Netzwerke. *Dual-color-PALM* (*dual color photoactivation localization microscopy*) Untersuchungen zeigen, dass sich die Netzwerke aus beiden Typen zusammensetzen (Brodehl u. a.). Da alle untersuchten Mutationen heterozygot auftreten, liegt diese näher an den natürlichen Bedingungen, wie sie im lebenden Organismus vorzufinden sind. Es wäre interessant, ergänzend die Mischform *in vitro* zu untersuchen.

Die Desmin Mutante R454W weicht sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht vom WT-Phänotyp ab. Um zu bestimmen, in wie weit sich die Filamente in ihrer Elastizität vom WT unterscheiden, könnte der nächste Schritt darin bestehen, diese kraftspektroskopisch zu untersuchen. Kreplak u. a. untersuchte bereits Desmin mittels AFM. Das Filament wurde mit Hilfe des AFM-Tips bis zum Zerreißen gedehnt, dabei konnten die lateralen Kräfte, die am Tip anliegen, gemessen werden.

Ein weiteres spannendes Thema ist die Erforschung der Assemblierung von Intermediärfilamenten. Die Methodik, die in dieser Arbeit verwendet wurde, könnte sich dafür eignen, die Assemblierung zu verschiedenen Zeitpunkten zu verfolgen. Durch die Immobilisierung auf dem Substrat und anschließendem Spülen und trocknen wird der Assemblierungsprozess sofort gestoppt. Auf diese Weise könnte sich eine Zeitauflösung von unter zehn Sekunden realisieren lassen. Ein anderer Ansatz wäre es, die Messungen am AFM in Puffer durchzuführen. Mit dem entsprechenden Aufbau könnte die Probe zusätzlich temperiert werden. So ließe sich eventuell die Assemblierung direkt auf der Probenoberfläche verfolgen. Die Zeitauflösung wäre dann von der Scangeschwindigkeit abhängig.

Publikationen

Artikel

- Klauke, B.; Kossmann, S.; Gaertner, A.; Brand, K.; Stork, I.; Brodehl, A.; **Dieding, M.**; Walhorn, V.; Anselmetti, D.; Gerdes, D.; Bohms, B.; Schulz, U.; Knyphausen, E. z.; Vorgerd, M.; Gummert, J.; Milting, H.: De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.
In: *Human Molecular Genetics* 19 (2010), Nr. 23, S. 4595–4607. – ISSN 0964-6906
- Brodehl, A.; Hedde, P.N.; **Dieding, M.**; Walhorn, V.; Gayda, S.; Heilemann, M.; Klauke, B.; Anselmetti, D.; Nienhaus, G. U.; Gummert, J.; Milting, H.: Molecular insights into filament assembly defects of ARVC-related desmin mutations.
Eingereicht bei: *Circulation Research* (08.06.2011)

Posterbeiträge

- **Dieding, M.**; Walhorn, V.; Brodehl, A.; Milting, H.; Anselmetti, D.: Investigation of self-assembled desmin filament network by atomic force microscopy.
Bei: 75. Jahrestagung der DPG und DPG Frühjahrstagung (Dresden, 14.-18. März 2011)
- Brodehl, A.; **Dieding, M.**; Hedde, P.N.; Walhorn, V.; Gayda, S.; Heilemann, M.; Nienhaus, G.U.; Anselmetti, D.; Klauke, B.; Gummert, J.; Milting, H.; Impact of different ARVC-related desmin mutations on filament assembly using atomic force microscopy, dual color photoactivation localization microscopy, and FRET imaging.
Bei: 7th European Conference on Intermediate Filaments in Health and Disease, (Mykonos, Griechenland, 16.-19. Juni 2011)

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Domänen in der Sekundärstruktur von IF.	2
1.2	Darstellung der <i>coiled-coil</i> -Struktur in Dimeren (vgl. Cooper, 2000).	2
1.3	Schematische Darstellung der Assoziation zu Filamenten (Assemblierungsgruppe 2). Zwei antiparallel versetzte Dimere bilden das Tetramer. Die laterale Vereinigung von mehreren Tetrameren ergeben ein ULF. Die ULFs fügen sich longitudinal zu Filamenten.	3
1.4	Schematisches Modell zur Darstellung der Lokalisation von Desmin in einer Muskelzelle. Desmin-Filamente verbinden die Z-Scheiben benachbarter Myofibrillen, Mitochondrien und den Zellkern miteinander. Des Weiteren binden sie an Desmosomen (bei Herzmuskelzellen), welche die einzelnen Muskelzellen verbinden. Auf diese Weise sorgt Desmin für die interzelluläre mechanische Integrität (Mit freundlicher Genehmigung aus: Bär u. a. (2004)).	4
1.5	ARVC ist durch den pathologischen Ersatz von Kardiomyocyten durch fibrotisches Gewebe (weiße Stellen innerhalb der Ventrikelwand) charakterisiert (Abb. bereitgestellt von: E. & H. Klessmann Institut).	5
1.6	Schematischer Aufbau von Desmosomen. Abkürzungen: Dsc2, Desmocollin-2; Dsg2, Desmoglein-2; Dsp, Desmoplakin; Pkg, Plakoglobin; Pkp2, Plakophilin-2; PM, Plasmamembran (vgl. Awad u. a., 2008).	6
1.7	Schematische Darstellung der Aminosäurenkette (470 AS) von Desmin und die Positionen der untersuchten Mutationen.	7
1.8	Prinzipieller Aufbau eines AFM.	10
1.9	Das Lennard-Jones-Potential beschreibt die Wechselwirkung zwischen Tip und Probe.	12
1.10	Phase (grün) und Amplitude (rot) eines harmonischen Oszillators in Abhängigkeit der Anregungsfrequenz.	13

2.1	SDS-PAGE der gereinigten Desmin-Moleküle. Es wurden 10 μg Desmin auf das mit Coomassie Blau R250 eingefärbte Gel aufgetragen.	15
2.2	Schematische Darstellung der Funktionalisierung von Mica mit APTES. Die Hydroxylgruppen links sind Teil der Mica-Oberfläche (vgl. Colton, 1998)	18
2.3	Vergleich von APTES-Mica und TSG.	20
3.1	Desmin WT auf APTES-Mica, unmittelbar nach der Dialyse 1 h bei 37°C assembliert.	23
3.2	Desmin WT auf APTES-Mica nach Dialyse 4 Tage bei 1°C gelagert, dann bei 37°C 1 h inkubiert. Der Ausschnitt ist 1 μm · 1 μm , die Höhengskalierung beträgt 14 nm.	23
3.3	Desmin WT auf Mica.	24
3.4	Desmin WT auf APTES-Mica	24
3.5	Desmin WT auf TSG.	25
3.6	Beispielbilder zur Verdeutlichung der Struktur.	26
3.7	Desmin WT (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Tetramer und Protofilament; die Balken im unteren Bild sind 60 nm lang (ref. Kap.: 3.3.1).	29
3.8	Desmin N116S (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Tetramer und Protofilament (ref. Kap.: 3.3.1).	30
3.9	Desmin N342D (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Tetramer und diverse Aggregate (ref. Kap.: 3.3.1).	31
3.10	Desmin E114del (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Protofilament (ref. Kap.: 3.3.1).	32
3.11	Desmin S358T (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Tetramer und Protofilament (ref. Kap.: 3.3.1).	33
3.12	Desmin S13F (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Protofilament (ref. Kap.: 3.3.1).	34
3.13	Desmin WT_P (vor der Assemblierung) auf Mica; Strukturen: Tetramer und globuläre Struktur (ref. Kap.: 3.3.1).	35
3.14	Desmin WT (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; oben: 10 μm Scan, Strukturen: Filamente und filamentöse Aggregate; unten: 1 μm Scan, Struktur: Filament; Ausschnitt links: 100 · 150 nm, der Winkel der Drehung zur Filamentachse beträgt etwa 44° (ref. Kap.: 3.3.2).	38
3.15	Desmin WT (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica (ref. Kap.: 3.3.2).	39

3.16 Desmin WT (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Filament und Protofilament-ähnlich (ref. Kap.: 3.3.2).	40
3.17 (a): Desmin WT mit Profilschnitten; Profilschnitte in (a) entsprechen den Graphen gleicher Farbe in (b); (b): in rot lineare Fits durch den Untergrund und das Filament, die Distanz 2 nm entspricht der mittleren Höhe des Filaments. Der Filamentdurchmesser schwankt deutlich und liegt zwischen 1 nm und 3 nm.	40
3.18 Desmin R454W (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Filamente und filamentöses Aggregat; oben: 5 μm Scan, Ausschnitt: 22 nm Höhenskalierung; unten: 1 μm Scan (ref. Kap.: 3.3.2).	41
3.19 Desmin N116S (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: filamentöse Aggregate und Protofilamente; unten links: Protofilament; unten rechts: filamentöses Aggregat (ref. Kap.: 3.3.2).	42
3.20 Desmin N342D (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; unten links: globuläre, Tetramer-ähnliche Struktur; unten rechts: filamentöses Aggregat (ref. Kap.: 3.3.2).	43
3.21 Desmin E114del (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Protofilamente (ref. Kap.: 3.3.2).	44
3.22 Desmin S358T (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Tetramere, Protofilamente und filamentöse Aggregate (ref. Kap.: 3.3.2).	45
3.23 Desmin S13F (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Protofilamente und filamentöse Aggregate (ref. Kap.: 3.3.2).	46
3.24 Desmin WT_P (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; Strukturen: Tetramere und Filamente (ref. Kap.: 3.3.2).	47
3.25 Desmin WT_P (1 h bei 37°C assembliert) auf Mica; (ref. Kap.: 3.3.2).	48
3.26 Desmin WT wenige Sekunden nach Zugabe von Assemblierungspuffer.	49
3.27 Desmin WT 10 Minuten bei RT nach Zugabe von Assemblierungspuffer.	50
3.28 Desmin WT 1 h bei 37°C und 4 Tage bei 1°C im Assemblierungspuffer inkubiert, dann auf APTES-Mica abgebildet.	51
3.29 Desmin S13F 1 h bei 37°C und 4 Tage bei 1°C im Assemblierungspuffer inkubiert, dann auf Mica abgebildet.	52

3.30 Fluoreszenzaufnahmen von SW-13-Zellen. Desmin wurde mit eYFP (*enhanced yellow fluorescence protein*) gelabelt und der Zellkern mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) eingefärbt; (a), (b), (f) und (g): cytoplasmatische filamentöse Netzwerke; (c), (d) und (e): cytoplasmatische Aggregate. 53

Literaturverzeichnis

[ARVD.COM 08.03.2011] ARVD.COM: *ARVD.COM*. 08.03.2011. – URL http://www.arvd.com/diagnosis_crit.html. – Zugriffsdatum: 12.05.2011

[Awad u. a. 2008] AWAD, Mark M. ; CALKINS, Hugh ; JUDGE, Daniel P.: Mechanisms of Disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. In: *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 5 (2008), Nr. 5, S. 258–267

[Bär u. a. 2007] BÄR, Harald ; GOUDEAU, Bertrand ; WÄLDE, Sarah ; CASTERAS-SIMON, Monique ; MÜCKE, Norbert ; SHATUNOV, Alexey ; GOLDBERG, Y. P. ; CLARKE, Charles ; HOLTON, Janice L. ; EYMARD, Bruno ; KATUS, Hugo A. ; FARDEAU, Michel ; GOLDFARB, Lev ; VICART, Patrick ; HERRMANN, Harald: Conspicuous involvement of desmin tail mutations in diverse cardiac and skeletal myopathies. In: *Human Mutation* 28 (2007), Nr. 4, S. 374–386

[Bär u. a. 2004] BÄR, Harald ; STRELKOV, Sergei V. ; SJÖBERG, Gunnar ; AEBI, Ueli ; HERRMANN, Harald: The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? In: *Journal of Structural Biology* 148 (2004), Nr. 2, S. 137–152

[Bassuk 1997] BASSUK, J. A.: Human alpha B-Crystallin. SMALL HEAT SHOCK PROTEIN AND MOLECULAR CHAPERONE. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 4, S. 2578–2582

[Bhushan 2007] BHUSHAN, Bharat: *Springer Handbook of Nanotechnology*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2007. – ISBN 978-3-540-29855-7

[Binnig und Quate 1986] BINNIG, G. ; QUATE, C. F.: Atomic Force Microscope. In: *Physical Review Letters* 56 (1986), Nr. 9, S. 930–933

- [Binnig u. a. 1982] BINNIG, G. ; ROHRER, H. ; GERBER, Ch ; WEIBEL, E.: Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. In: *Physical Review Letters* 49 (1982), Nr. 1, S. 57–61
- [den Boef 1991] BOEF, A. J. den: The influence of lateral forces in scanning force microscopy. In: *Review of Scientific Instruments* 62 (1991), Nr. 1, S. 88
- [Brennich u. a. 2011] BRENNICH, Martha E. ; NOLTING, Jens-Friedrich ; DAMMANN, Christian ; NODING, Bernd ; BAUCH, Susanne ; HERRMANN, Harald ; PFOHL, Thomas ; KOSTER, Sarah: Dynamics of intermediate filament assembly followed in micro-flow by small angle X-ray scattering. In: *Lab Chip* 11 (2011), S. 708–716
- [Brodehl u. a.] BRODEHL, A. ; HEDDE, P.N ; DIEDING, M. ; WALHORN, V. ; GAYDA, S. ; HEILEMANN, M. ; KLAUKE, B. ; ANSELMETTI, D. ; NIENHAUS, G. U. ; GUMMERT, J. ; MILTING, H.: Molecular insights into filament assembly defects of ARVC-related desmin mutations. In: *eingereicht bei: Circulation Research*
- [Colton 1998] COLTON, Richard J.: *Procedures in scanning probe microscopies*. Chichester ;, New York : Wiley, 1998. – ISBN 9780471959120
- [Cooper 2000] COOPER, Geoffrey M.: *The cell: A molecular approach*. 2nd. Washington, D.C, Sunderland, Mass : ASM Press and Sinauer Associates, 2000. – ISBN 9780878931064
- [Cox u. a. 2010] COX, M. G. P. J. ; SMAGT, J. J. van der ; NOORMAN, M. ; WIESFELD, A. C. ; VOLDERS, P. G. A. ; LANGEN, I. M. van ; AT SMA, D. E. ; DOOIJES, D. ; HOUWELING, A. C. ; LOH, P. ; JORDAENS, L. ; ARENS, Y. ; CRAMER, M. J. ; DOEVENDANS, P. A. ; TINTELEN, J. P. van ; WILDE, A. A. M. ; HAUER, R. N. W.: Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Diagnostic Task Force Criteria: Impact of New Task Force Criteria. In: *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 3 (2010), Nr. 2, S. 126–133
- [Dalakas u. a. 2003] DALAKAS, Marinos C. ; DAGVADORJ, Ayush ; GOUDEAU, Bertrand ; PARK, Kye-Yoon ; TAKEDA, Kazuyo ; SIMON-CASTERAS, Monique ; VASCONCELOS, Olavo ; SAMBUUGHIN, Nyamkhishig ; SHATUNOV, Alexey ; NAGLE, James W. ; SIVAKUMAR, Kumaraswamy ; VICART, Patrick ; GOLDFARB, Lev G.: Progressive skeletal myopathy, a phenotypic variant of desmin myopathy associated with desmin mutations. In: *Neuromuscular Disorders* 13 (2003), Nr. 3, S. 252–258

- [Daniel Rugar und Paul Hansma 1990] DANIEL RUGAR ; PAUL HANSMA: Atomic Force Microscopy. In: *Physics Today* 43 (1990), Nr. 10, S. 23–30
- [Fardeau u. a. 2000] FARDEAU, M. ; VICART, P. ; CARON, A. ; CHATEAU, D. ; CHEVALLAY, M. ; COLLIN, H. ; CHAPON, F. ; DUBOC, D. ; EYMARD, B. ; TOME, F. M. ; DUPRET, J. M. ; PAULIN, D. ; GUICHENEY, P.: [Familial myopathy with desmin storage seen as a granulo-filamentar, electron-dense material with mutation of the alphaB-cristallin gene]: Myopathie familiale avec surcharge en desmine, sous forme de materiel granulo-filamentaire dense en microscopie electronique, avec mutation dans le gene de l'alphaB-cristalline. In: *Revue neurologique* 156 (2000), Nr. 5, S. 497–504
- [Fuchs und Weber 1994] FUCHS, E. ; WEBER, K.: Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function and Disease. In: *Annual Review of Biochemistry* 63 (1994), Nr. 1, S. 345–382
- [Garboczi u. a. 1996] GARBOCZI, D. N. ; UTZ, U. ; GHOSH, P. ; SETH, A. ; KIM, J. ; VANTIENHOVEN, E. A. ; BIDDISON, W. E. ; WILEY, D. C.: Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR- alphabeta with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. In: *The Journal of Immunology* 157 (1996), Nr. 12, S. 5403–5410
- [Geisler u. a. 1982] GEISLER, Norbert ; PLESSMANN, Uwe ; WEBER, Klaus: Related amino acid sequences in neurofilaments and non-neuronal intermediate filaments. In: *Nature* 296 (1982), Nr. 5856, S. 448–450
- [Goebel 1995] GOEBEL, Hans H.: Desmin-related neuromuscular disorders. In: *Muscle & Nerve* 18 (1995), Nr. 11, S. 1306–1320
- [Goldfarb 2004] GOLDFARB, L. G.: Desmin myopathy. In: *Brain* 127 (2004), Nr. 4, S. 723–734
- [Goldfarb u. a. 1998] GOLDFARB, Lev G. ; PARK, Kye-Yoon ; CERVENÁKOVÁ, Larisa ; GOROKHOVA, Svetlana ; LEE, Hee-Suk ; VASCONCELOS, Olavo ; NAGLE, James W. ; SEMINO-MORA, Christina ; SIVAKUMAR, Kumaraswamy ; DALAKAS, Marinos C.: Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. In: *Nature Genetics* 19 (1998), Nr. 4, S. 402–403
- [Goldfarb and Dalakas 2009] GOLDFARB AND DALAKAS: Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. In: *The Journal of Clinical Investigation* 119 (2009), Nr. 7, S. 1806–1813

- [Harald Herrmann u. a. 1999] HARALD HERRMANN ; MARKUS HÄNER ; MONIKA BRETTEL ; NAM-ON KU ; UELI AEBI: Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. In: *Journal of Molecular Biology* 286 (1999), Nr. 5, S. 1403–1420
- [Hegner u. a. 1993] HEGNER, Martin ; WAGNER, Peter ; SEMENZA, Giorgio: Ultralarge atomically flat template-stripped Au surfaces for scanning probe microscopy. In: *Surface Science* 291 (1993), Nr. 1-2, S. 39–46
- [Herrmann und Aebi 2004] HERRMANN, Harald ; AEBI, Ueli: INTERMEDIATE FILAMENTS: Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration Into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds. In: *Annual Review of Biochemistry* 73 (2004), Nr. 1, S. 749–789
- [Herrmann u. a. 2007] HERRMANN, Harald ; BAR, Harald ; KREPLAK, Laurent ; STRELKOV, Sergei V. ; AEBI, Ueli: Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007), Nr. 7, S. 562–573
- [Hynes und Destree 1978] HYNES, Richard O. ; DESTREE, Antonia T.: 10 nm filaments in normal and transformed cells. In: *Cell* 13 (1978), Nr. 1, S. 151–163
- [Ishikawa 1968] ISHIKAWA, H.: Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. In: *The Journal of Cell Biology* 38 (1968), Nr. 3, S. 538–555
- [Kaufmann u. a. 1985] KAUFMANN, Eckhard ; WEBER, Klaus ; GEISLER, Norbert: Intermediate filament forming ability of desmin derivatives lacking either the amino-terminal 67 or the carboxy-terminal 27 residues. In: *Journal of Molecular Biology* 185 (1985), Nr. 4, S. 733–742
- [Kirmse u. a. 2007] KIRMSE, R. ; PORTET, S. ; MUCKE, N. ; AEBI, U. ; HERRMANN, H. ; LANGOWSKI, J.: A Quantitative Kinetic Model for the in Vitro Assembly of Intermediate Filaments from Tetrameric Vimentin. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (2007), Nr. 25, S. 18563–18572
- [Kirmse 2007] KIRMSE, Robert: *Studium der Wachstumskinetik von Intermediärfilamenten mit Hilfe von Vimentin: Inaugural-Dissertation.* 2007
- [Kirmse u. a. 2010] KIRMSE, Robert ; QIN, Zhao ; WEINERT, Carl M. ; HOENGER, Andrea ; BUEHLER, Markus J. ; KREPLAK, Laurent ; UVERSKY, Vladimir N.: Plasticity of Intermediate Filament Subunits. In: *PLoS ONE* 5 (2010), Nr. 8, S. e12115

- [Kitamura u. a. 1989] KITAMURA, S. ; ANDO, S. ; SHIBATA, M. ; TANABE, K. ; SATO, C. ; INAGAKI, M.: Protein kinase C phosphorylation of desmin at four serine residues within the non-alpha-helical head domain. In: *Journal of Biological Chemistry* 264 (1989), Nr. 10, S. 5674–5678
- [Klauke u. a. 2010] KLAUKE, B. ; KOSSMANN, S. ; GAERTNER, A. ; BRAND, K. ; STORK, I. ; BRODEHL, A. ; DIEDING, M. ; WALHORN, V. ; ANSELMETTI, D. ; GERDES, D. ; BOHMS, B. ; SCHULZ, U. ; KNYPHAUSEN, E. z. ; VORGERD, M. ; GUMMERT, J. ; MILTING, H.: De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. In: *Human Molecular Genetics* 19 (2010), Nr. 23, S. 4595–4607
- [Kreplak u. a. 2008] KREPLAK, Laurent ; HERRMANN, Harald ; AEBI, Ueli: Tensile Properties of Single Desmin Intermediate Filaments. In: *Biophysical journal* 94 (2008), Nr. 7, S. 2790–2799
- [Lodish und Lange 2001] LODISH, Harvey ; LANGE, Christina: *Molekulare Zellbiologie*. 4. Heidelberg [u.a.] : Spektrum, Akad. Verl., 2001. – ISBN 9783827410771
- [Lyons u. a. 1981] LYONS, J. S. ; FURLONG, D. N. ; HEALY, T. W.: The electrical double-layer properties of the mica (muscovite)-aqueous electrolyte interface. In: *Australian Journal of Chemistry* 34 (1981), Nr. 6, S. 1177
- [Lyubchenko u. a. 1992] LYUBCHENKO, Y. L. ; GALL, A. A. ; SHLYAKHTENKO, L. S. ; HARRINGTON, R. E. ; JACOBS, B. L. ; ODEN, P. I. ; LINDSAY, S. M.: Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA. In: *Journal of biomolecular structure & dynamics* 10 (1992), Nr. 3, S. 589–606
- [Maron und Pelliccia 2006] MARON, B. J. ; PELLICCIA, A.: The Heart of Trained Athletes: Cardiac Remodeling and the Risks of Sports, Including Sudden Death. In: *Circulation* 114 (2006), Nr. 15, S. 1633–1644
- [Munoz-Marmol 1998] MUNOZ-MARMOL, A. M.: A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (1998), Nr. 19, S. 11312–11317
- [N. Mücke u. a. 2005] N. MÜCKE ; R. KIRMSE ; T. WEDIG ; LETERRIER, J. F. ; L. KREPLAK: Investigation of the morphology of intermediate filaments adsorbed to different solid supports. In: *Journal of Structural Biology* 150 (2005), Nr. 3, S. 268–276

- [Nishimura u. a. 1992] NISHIMURA, S. ; TATEYAMA, H. ; TSUNEMATSU, K. ; JINNAI, K.: Zeta potential measurement of muscovite mica basal plane-aqueous solution interface by means of plane interface technique. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 152 (1992), Nr. 2, S. 359–367
- [O’Shea u. a. 1992] O’SHEA, S. J. ; WELLAND, M. E. ; RAYMENT, T.: Atomic force microscope study of boundary layer lubrication. In: *Applied Physics Letters* 61 (1992), Nr. 18, S. 2240
- [Otten u. a. 2010] OTTEN, Ellen ; ASIMAKI, Angeliki ; MAASS, Alexander ; LANGEN, Irene M. van ; WAL, Allard van der ; JONGE, Nicolaas d. ; BERG, Maarten P. van den ; SAFFITZ, Jeffrey E. ; WILDE, Arthur A. ; JONGBLOED, Jan D.: Desmin mutations as a cause of right ventricular heart failure affect the intercalated disks. In: *Heart Rhythm* 7 (2010), Nr. 8, S. 1058–1064
- [Perng u. a. 1999] PERNG, M. D. ; CAIRNS, L. ; IJSSEL, P. van den ; PRESCOTT, A. ; AM HUTCHESON ; QUINLAN, R. A.: Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. In: *J Cell Sci* 112 (1999), Nr. 13, S. 2099–2112
- [Pica u. a. 2008] PICA, Emmanuel C. ; KATHIRVEL, Paramasivam ; PRAMONO, Zacharias A. D. ; LAI, Poh-San ; YEE, Woon-Chee: Characterization of a novel S13F desmin mutation associated with desmin myopathy and heart block in a Chinese family. In: *Neuromuscular Disorders* 18 (2008), Nr. 2, S. 178–182
- [Radmacher u. a. 1992] RADMACHER, M. ; TILLAMNN, R. ; FRITZ, M. ; GAUB, H.: From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. In: *Science* 257 (1992), Nr. 5078, S. 1900–1905
- [Sharma u. a. 2009] SHARMA, Sarika ; MÜCKE, Norbert ; KATUS, Hugo A. ; HERRMANN, Harald ; BÄR, Harald: Disease mutations in the „head“ domain of the extrasarcomeric protein desmin distinctly alter its assembly and network-forming properties. In: *Journal of Molecular Medicine* 87 (2009), Nr. 12, S. 1207–1219
- [Sokolova u. a. 2006] SOKOLOVA, A. V. ; KREPLAK, L. ; WEDIG, T. ; MUCKE, N. ; SVERGUN, D. I. ; HERRMANN, H. ; AEBI, U. ; STRELKOV, S. V.: Monitoring intermediate filament assembly by small-angle x-ray scattering reveals the molecular architecture of assembly intermediates. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006), Nr. 44, S. 16206–16211

- [Stromer u. a. 1987] STROMER, M. H. ; RITTER, M. A. ; PANG, Y. Y. ; ROBSON, R. M.: Effect of cations and temperature on kinetics of desmin assembly. In: *Biochem. J* 246 (1987), Nr. 1, S. 75–81
- [Szeverenyi u. a. 2008] SZEVERENYI, Ildiko ; CASSIDY, Andrew J. ; CHUNG, Cheuk W. ; LEE, Bennett T. ; COMMON, John E. ; OGG, Stephen C. ; CHEN, Huijia ; SIM, Shu Y. ; GOH, Walter L. ; NG, Kee W. ; SIMPSON, John A. ; CHEE, Li L. ; ENG, Goi H. ; LI, Bin ; LUNNY, Declan P. ; CHUON, Danny ; VENKATESH, Aparna ; KHOO, Kian H. ; MCLEAN, W.H I. ; LIM, Yun P. ; LANE, E. B.: The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. In: *Human Mutation* 29 (2008), Nr. 3, S. 351–360
- [van Tintelen u. a. 2009] TINTELEN, J. P. van ; GELDER, Isabelle C. van ; ASIMAKI, Angeliki ; SUURMEIJER, Albert J. ; WIESFELD, Ans C. ; JONGBLOED, Jan D. ; WIJNGAARD, Arthur van den ; KUKS, Jan B. ; SPAENDONCK-ZWARTS, Karin Y. van ; NOTERMANS, Nicolette: Severe cardiac phenotype with right ventricular predominance in a large cohort of patients with a single missense mutation in the DES gene. In: *Heart Rhythm* 6 (2009), Nr. 11, S. 1574–1583
- [Vernengo u. a. 2010] VERNENGO, Luis ; CHOURBAGI, Oussama ; PANUNCIO, Ana ; LI-LIENBAUM, Alain ; BATONNET-PICHON, Sabrina ; BRUSTON, Francine ; RODRIGUES-LIMA, Fernando ; MESA, Rosario ; PIZZAROSSA, Carlos ; DEMAY, Laurence ; RICHARD, Pascale ; VICART, Patrick ; RODRIGUEZ, Maria-Mirta: Desmin myopathy with severe cardiomyopathy in a Uruguayan family due to a codon deletion in a new location within the desmin 1A rod domain. In: *Neuromuscular Disorders* 20 (2010), Nr. 3, S. 178–187
- [Vicart u. a. 1998] VICART, Patrick ; CARON, Anne ; GUICHENEY, Pascale ; LI, Zhenlin ; PRÉVOST, Marie-Christine ; FAURE, Armelle ; CHATEAU, Danielle ; CHAPON, Françoise ; TOMÉ, Fernando ; DUPRET, Jean-Marie ; PAULIN, Denise ; FARDEAU, Michel: A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. In: *Nature Genetics* 20 (1998), Nr. 1, S. 92–95

Anhang

Inhalt der beigefügten CD:

- Diplomarbeit im PDF-Format mit Hyperlinks
- AFM-Bilder im JPG-Format
- AFM-Rohdaten