

Aus dem Friedrich-Baur-Institut der Medizinischen Fakultät  
an der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
(Direktorin Prof. Dr. med. Marianne Dieterich)  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

# Zelluläre und molekulare Modelle von Desminopathien

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Irene Kammermeier

aus

Eggenfelden

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Maggie Walter, M.A

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Jochen Herms

Mitbetreuung durch die

Promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Armin Giese  
PD Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2015

## Inhaltsverzeichnis

<b>A Zusammenfassung .....</b>	<b>8</b>
<b>B Einleitung .....</b>	<b>11</b>
1 Myofibrilläre Myopathien .....	11
2 Klinische Heterogenität von MFM .....	12
2.1 Morphologische Merkmale.....	13
2.2 Molekulare Pathogenese .....	13
3 Desmin und Desminopathien .....	14
3.1 Aufbau und Funktion des Intermediärfilamentproteins Desmin.....	14
3.2 Klinik der Desminopathien .....	18
3.3 Pathogenese.....	22
4 Mausmyoblastenmodelle mit KI R350P Desmin und Desmin KO .....	25
4.1 Immortomaus .....	26
4.2 Desmin KO Maus.....	26
4.3 Desmin R350P KI Maus.....	27
5 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie .....	28
5.1 Anwendung bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	28
<b>C Ziele der Arbeit .....</b>	<b>30</b>
<b>D Material und Methoden.....</b>	<b>32</b>
1 Chemikalien .....	32
2 Molekulargenetische Methoden .....	32
2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion .....	32
2.1.1 Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion.....	32
2.1.2 PCR-Primer.....	32
2.1.3 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	33
2.1.4 Direkte Sequenz-Analyse .....	34
2.2 Plasmidklonierung.....	34
2.2.1 Klonierung von Desmin-GFP Plasmiden.....	34
2.2.2 Klonierung von Desmin-mKate2 Plasmiden .....	34
2.2.2.1 Der Expressionsvektor pmKate2-N.....	34
2.2.2.2 Amplifikation der humanen Desmin-cDNA .....	34
2.2.3 Klonierung von Desmin-PSmOrange Plasmiden.....	35
2.2.3.1 Der Expressionsvektor pPSmOrange-N1 .....	35
2.2.3.2 cDNA von Desmin-pEGFP-N1 als Insert.....	35
2.2.4 Ligation.....	35

2.2.5 Transformation in kompetente Bakterienzellen.....	35
2.2.6 Bakterienkultur .....	35
2.2.7 Isolierung der Plasmid DNA.....	36
<b>3 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie .....</b>	<b>37</b>
3.1 Messaufbau.....	37
3.2 Einstellung und Eichung.....	39
3.3 Analyseverfahren .....	39
3.3.1 Autokorrelation .....	39
3.3.2 FIDA .....	42
3.3.3 SIFT2D (Scanning for Intensely Fluorescent Targets) .....	43
3.4 Proteinextraktion für die konfokale Einzelmolekülspektroskopie .....	45
<b>4 Photokonvertierung von PSmOrange .....</b>	<b>46</b>
<b>5 Zellkultur.....</b>	<b>46</b>
5.1 Transfektion von HEK293 Zellen.....	47
5.2 Transfektion von SW-13 Zellen.....	47
5.3 Immun- und Fluoreszenzfärbung.....	47
<b>6 Western-Blot-Analyse.....</b>	<b>48</b>
6.1 Zellaufschluss.....	48
6.2 SDS-Gel/Western-Blot.....	49
6.3 Ponceau S-Färbung.....	49
6.4 Immunodetektion.....	49
6.5 Western-Blot Stripping und erneute Detektion (Reprobing) .....	50
<b>7 Mausmyoblastenmodell.....</b>	<b>50</b>
7.1 Versuchstiere .....	50
7.2 Tierhaltung.....	50
7.3 Zucht und Genotypisierung.....	51
7.3.1 Verpaarung.....	51
7.3.2 Genotypisierung.....	51
7.4 Desmin KO und R350P Desmin KI H-2K <sup>b</sup> -tsA58 Mausmyoblasten.....	53
7.4.1 Isolierung von primären Mausmyoblasten und Etablierung einer stabilen Zelllinie .....	53
7.4.2 Kultivierung konditionell immortalisierter Mausmyoblasten .....	54
<b>E Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
<b>1 Charakterisierung der fluoreszierenden Far-Red Proteine .....</b>	<b>55</b>
1.1 PSmOrange.....	55
1.2 mKate2.....	56

1.3 Überprüfung von GFP in der Einzelmolekülspektroskopie .....	58
1.4 Verhalten von mKate2 in der Einzelmolekülspektroskopie .....	60
1.5 PSmOrange als alternatives Far-Red Fluorophor .....	62
1.5.1 Photokonvertierung von PSmOrange .....	62
1.5.2 Messung im Insight Reader .....	63
2 Überprüfung der Filamentbildung in SW-13-Zellen .....	65
3 Optimierung der Transfektionseffizienz .....	66
3.1 Optimale Jet PEI® Transfektion von HEK293-Zellen .....	67
3.2 Optimierung der X-tremeGENE 9® Transfektion von SW-13-Zellen .....	68
4 Desminexpression in HEK293- und SW-13-Zellen .....	69
4.1 Transfektion von HEK293- und SW-13-Zellen mit einzelnen Expressionskonstrukten .....	69
4.2 Proteinexpression von kotransfizierten HEK293-Zellen .....	72
5 Zweifarbige Interaktionsstudien von mutiertem Desmin mit Wildtyp Desmin .....	74
5.1 Koassemblierungsanalyse in der Einzelmolekülspektroskopie .....	75
5.2 Zweifarbige Assemblierungsinteraktion von Desmin und mutiertem Desmin in SW-13-Zellen .....	77
6 Zweifarb-Fluoreszenzmarker-Ansatz: Interaktionen von Desmin im Zeitverlauf .....	83
7 Immortalisierte Mausmyoblasten .....	88
<b>F Diskussion .....</b>	<b>90</b>
1 Einsatz von Far-Red anregbaren Fluorophoren in der SIFT Methode .....	90
1.1 PSmOrange .....	91
1.2 Fehlendes FRET-Potential von mKate2 .....	91
2 Verwendete Zellsysteme .....	92
3 Überprüfung der quantitativen Proteinexpression .....	93
4 Qualitative und quantitative Interaktionsanalysen .....	94
4.1 Konventionelle Mikroskopie .....	95
4.2 Quantitative SIFT Analyse .....	97
5 Möglicher Einsatz der immortalisierten Mausmyoblasten .....	98
<b>G Fazit und Ausblick .....</b>	<b>100</b>
<b>H Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
<b>I Anhang .....</b>	<b>115</b>
1 Abkürzungsverzeichnis .....	115
2 Antikörper .....	118
3 Stammbäume der transgenen Mäuse .....	119
3.1 Stammbaum Desmin Knockout Maus .....	119
3.2 Stammbaum Desmin Knockin .....	121
3.3 Stammbaum Immortomaus® .....	123

## Inhaltsverzeichnis

---

3.4 Verpaarung Immortomaus® x Desmin R350P Knockin.....	124
3.5 Verpaarung Immortomaus® x Desmin Knockout.....	125
Danksagung.....	126

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Proteinstruktur des humanen Desminmoleküls und molekulares Modell von dimeren rod Domänen.....	15
Abbildung 2 Schematisches Modell der cytoplasmatischen IF-Assemblierung.....	16
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Intermediärfilamentgerüsts im kardialen Muskel und die potentiellen Verbindungen mit unterschiedlichen Membrankompartimenten und Organellen.....	17
Abbildung 4 Erstbeschreibung der R350P Desminmutation bei Bär <i>et al.</i> , 2005.....	20
Abbildung 5 E413K Desminmutation erstmals beschrieben bei Pruszczuk <i>et al.</i> , 2007.....	21
Abbildung 6 Proteinaggregate und mitochondriale Veränderungen in Desminopathien.....	22
Abbildung 7 Immunfluoreszenzfärbung von Desmin (rot) und Syncoilin (grün) einer isolierten Muskelfaser bei einer Desminopathie.....	23
Abbildung 8 Viskometrische und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Koassemblierungen wt Desmin mit R350P Desmin.....	24
Abbildung 9 Filamentassemblierung von wt Desmin verglichen mit Desmin-K449T sowie Kopolymerisation von wt Desmin und Desmin-I451M.....	25
Abbildung 10 Marketing Schema der Desmin KO Maus.....	26
Abbildung 11 Targeting Schema der Desmin R350P KI Maus.....	27
Abbildung 12 Messaufbau des Insight Readers.....	38
Abbildung 13 Grundprinzip der Autokorrelations-Analyse.....	40
Abbildung 14 Autokorrelogramm und Residualkurve einer FCS Messung.....	41
Abbildung 15 Intensitätsverteilungshistogramm einer FIDA.....	43
Abbildung 16 Gescannte Messung verschiedener zweifarbiger Oligomerformen in einer Probe und anschließende SIFT 2D Analyse.....	45
Abbildung 17 Physikalische Parameter von mKate2 und PSmOrange für die Einzelmolekülspektroskopie.....	55
Abbildung 18 Möglicher Mechanismus der Photokonvertierung von PSmOrange zur Far-Red Form.....	56
Abbildung 19 Fluoreszenzspektren von GFP und mKate2.....	57
Abbildung 20 Dreidimensionales (3D) Modell von Vimentin und der Vimentinfilamentsynthese.....	57
Abbildung 21 Hypothetisches Modell verschiedener Assemblierungsstufen von farblich unterschiedlich markierten Desminmolekülen.....	58
Abbildung 22 Diffusionszeit und Partikelhelligkeit eines monomeren grün fluoreszierenden Proteins (GFP) im Vergleich zu wt Desmin-GFP.....	59
Abbildung 23 Korrelationsdiagramm von GFP über 1K FIDA Fit.....	59
Abbildung 24 Direkte Anregung von mKate2 ist bei 488 nm möglich.....	60
Abbildung 25 Fehlende Anregbarkeit von großen zweifarbigen Molekülkomplexen über FRET bei Kombination von GFP- und mKate2-Desminfusionsproteinen.....	61
Abbildung 26 Korrelationsdiagramm von mKate2 über 1K FIDA Fit.....	61
Abbildung 27 Fluoreszenzmaximum von orangem PSmOrange liegt nach Fluoreszenzanregung (548 nm) bei 560 nm.....	62

Abbildung 28 Fluoreszenzintensitätsspektrum des Far-Red Bereichs vor und nach der Photokonvertierung von PSmOrange mit unterschiedlicher Laserleistung.....	63
Abbildung 29 Charakterisierung von Far-Red PSmOrange im Insight Reader.....	64
Abbildung 30 Schematische Darstellung von Desminprotein gelabelt mit C-terminalen GFP bzw. mKate2.....	65
Abbildung 31 Immunfluoreszenz- und Fluoreszenzdarstellung von Desmin und den Desmin-mutanten.....	66
Abbildung 32 Effizienz der Kotransfektion in HEK293-Zellen 48 h nach Transfektion.....	67
Abbildung 33 Bestimmung der idealen Transfektionsrate mit verschiedenen Konzentrationen von X-tremeGENE 9® in SW-13-Zellen.....	68
Abbildung 34 Repräsentative Western-Blot-Analyse von HEK293-Zellen, die mit einzelnen Konstrukten transfiziert wurden.....	69
Abbildung 35 Relative Quantifizierung der Desminexpression in HEK-Zellen.....	70
Abbildung 36 Repräsentativer Western-Blot von transfizierten SW-13-Zellen.....	71
Abbildung 37 Quantifizierung der Desminexpression in SW-13-Zellen.....	71
Abbildung 38 Repräsentative Western-Blot-Analyse von Lysaten kotransfizierter HEK293-Zellen.....	72
Abbildung 39 Relative Proteinexpression von kotransfizierten HEK293-Zellen.....	73
Abbildung 40 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Interaktionsstudien.....	74
Abbildung 41 Schematische Darstellung und Beispiele von Scatter Plots repräsentativer 2D SIFT Analysen.....	75
Abbildung 42 Anteil von zweifarbigem Multimeren an der Gesamtzahl der detektierten zweifarbigem Partikel.....	76
Abbildung 43 SW-13 Zellen kotransfiziert mit wt Desmin-GFP und mutierten Desmin-mKate2 Varianten im Verhältnis 1:1.....	79
Abbildung 44 SW-13 Zellen kotransfiziert mit wt Desmin-mKate2 und mutierten Desmin-GFP Varianten im Verhältnis 1:1.....	80
Abbildung 45 Kotransfektion von SW-13- Zellen kotransfiziert mit Desminmutanten getaggt mit GFP bzw. mKate2 im Verhältnis 1:1.....	81
Abbildung 46 Kotransfizierte SW-13 Zellen im Verhältnis 1:1 mit getaggetem wt Desmin-GFP und mutiertem Desmin bzw. mit mutiertem Desmin-mKate2 und wtDesmin.....	82
Abbildung 47 Fluoreszenzmikroskopische Analyse im Zeitverlauf von kotransfiziertem wt Desmin-mKate2 und wt Desmin-GFP im Verhältnis 1:1 im SW-13-Zellkultursystem nach 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h transienter Transfektion.....	84
Abbildung 48 Fluoreszenzmikroskopische Analyse im Zeitverlauf von kotransfiziertem wt Desmin-GFP und R350P Desmin-mKate2 im Verhältnis 1:1 in einem SW-13-Zellkultursystem nach 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h transienter Transfektion.....	85
Abbildung 49 Fluoreszenzmikroskopische Analyse im Zeitverlauf von kotransfiziertem wt Desmin-GFP und E413K Desmin-mKate2 im Verhältnis 1:1 im SW-13-Zellkultursystem nach 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h transienter Transfektion.....	86
Abbildung 50 Fluoreszenzmikroskopische Analyse im Zeitverlauf von kotransfiziertem wt Desmin-GFP und R454W Desmin-mKate2 im Verhältnis 1:1 in einem SW-13-Zellkultursystem nach 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h transienter Transfektion.....	87
Abbildung 51 Genotyp und Bezeichnung der isolierten immortalisierten Mausmyoblasten.....	88

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 52 Immunfluoreszenzfärbung von immortalisierten Mausmyoblasten und Myotuben.	89
.....	.....
Abbildung 53 Vergleichendes Modell der Filament- und/oder Aggregatbildung bei homozygot und heterozygot transient transfizierten Desminmutanten in Kulturzellen.	96

## A Zusammenfassung

Das Intermediärfilamentprotein Desmin ist ein wichtiger Bestandteil des extrasarkomeren Cytoskeletts von Muskelzellen. Ähnlich zu anderen Intermediärfilament (IF)-Proteinen bildet es ein dreidimensionales Filamentnetzwerk aus, das für die Struktur und Funktionalität von Myofibrillen eine entscheidende Rolle spielt. Mutationen im Desmin-Gen führen u.a. zu Desminopathien, die zu den Myofibrillären Myopathien zählen. Die klinisch und genetisch heterogene Gruppe dieser chronisch-progredient verlaufenden Skelett- und Herzmuselerkrankungen zeigt Proteinaggregate im betroffenen Muskel als gemeinsames histopathologisches Merkmal, ähnlich wie bei anderen häufigen neurodegenerativen Erkrankungen. Desminmutantenverändernder Aufbau des Desmingerüsts führen je nach Mutation zu charakteristischen Desminaggregaten, die pathologisch relevant sind und eine Myofibrillendegeneration zur Folge haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei humanpathogene Desminpunktmutationen ausgewählt, die heterogene, klinische Symptome auslösen: Das Lebensalter bei Krankheitsmanifestation variierte zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Die Skelettmuskelschwäche zeigte sich individuell ausgeprägt und auch familienintern mit unterschiedlichem klinischen Bild und differenzierter Verlaufsform. Meistens traten die Skelettmuskelerkrankungen assoziiert mit kardialer und/oder pulmonaler Beteiligung auf, die lebensbedrohlich verlaufen konnten. Desminopathien werden hauptsächlich autosomal-dominant vererbt, sodass neben dem mutierten Desminallel ein funktionelles Wildtyp Allel vorliegt.

Koassemblierungsmodelle stellen diese *in vivo* Situation am besten dar. Für die drei untersuchten pathogenen Desminpunktmutationen (p.R350P, p.E413K, p.R454W) wurde bei *in vitro* Untersuchungen ein dominant negativer Effekt auf die Filamentassemblierung von Wildtyp Desmin beobachtet. Diese funktionell beeinträchtigende Wirkung konnte schon bei weiteren pathogenen Desminmutationen belegt werden (Sjoberg, Saavedra-Matiz et al. 1999, Bar, Fischer et al. 2005, Bar, Mucke et al. 2006, Bar, Goudeau et al. 2007, Pruszczak, Kostera-Pruszczak et al. 2007, Bar, Schopferer et al. 2010, Levin, Bulst et al. 2010). Eine detaillierte Charakterisierung der Protein-Proteininteraktion zwischen mutiertem und Wildtyp Desminprotein fehlte bisher. In der vorliegenden Arbeit wird diese Fragestellung eingehend bearbeitet, basierend auf den Resultaten von Levin *et al.*, wobei einzelmolekülspektroskopisch charakteristische Unterschiede in der molekularen Zusammensetzung von Multimeren einzelner, ausgewählter Desminmutanten entdeckt wurden. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Zweifarb-Ansatzes, der die Interaktion von pathogenen Desminmutanten simultan mit funktionellem Wildtyp Desminprotein in zellulärem und molekularem Kontext parallel qualitativ und quantitativ charakterisieren kann. Weiterhin wurden immortalisierte myogene Zelllinien etabliert, die einen Desmin Knockout oder eine transgene Desmin-Variante (Desmin p.R350P Knockin) enthalten.

Die Charakterisierung der Desminfilamentassemblierung mit heterozygot vorliegenden, pathogenen Desminmutanten auf Einzelmolekülebene erfolgte durch konfokale Einzelmolekül-Spektroskopie am Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Reader, der vor allem zur Charakterisierung von pathogenen Proteinaggregaten bei neurodegenerativen Erkrankungen Anwendung fand. Es wurde ein zweifarbiger Ansatz etabliert, der die verschiedenen Desminmoleküle fluoreszenzmarkiert und eine Unterscheidung von funktionellem und mutiertem Protein zulässt. Das im Nah-Infrarotbereich anregbare Fluorophor mKate2 zeigte sich zunächst neben dem bewährten grün fluoreszierenden Protein GFP als geeignetes fluoreszentes Fusionsprotein-Tag. Parallel zur zweifarbigen Einzelmolekülanalyse wurde die Filamentbildung im konventionellen und im konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht.

In dieser Arbeit wurde versucht, die molekulare und zelluläre Untersuchung aus der gleichen Zelllinie zu gewinnen. Aufgrund geringer transienter Transfektionsraten war dieser Ansatz jedoch nicht durchführbar, sodass SW-13-Zellen nur für die mikroskopische Analyse verwendet wurden und HEK293-Zellen aufgrund der besseren Expressionsraten für die molekularen Interaktionsstudien Anwendung fanden.

Bei einem funktionellen Wildtyp Desminprotein bildete sich in den Zellen ein über das ganze Cytoplasma verteiltes Desmingerüst aus, das als Korrelat eines intakten Filamentgerüsts in Muskelzellen gewertet wurde, was eine strukturelle und funktionelle Anordnung der Myofibrillen zur Aufgabe hat. Die funktionelle Desminassemblierung wurde in der Anwesenheit von pathogenen Desminpunktmutanten gestört. Es entstanden charakteristische Desminaggregate, aber auch lichtmikroskopisch physiologische Intermediärfilamente, deren molekulare Zusammensetzung noch weitere Fragen offen ließ: (1) ob die gebildeten Aggregate ausschließlich aus mutierten Desminproteinen bestehen, (2) ob in noch vorhandene Intermediärfilamente neben Wildtyp auch mutiertes Protein integriert wird oder (3) ob nur ausschließlich Wildtyp Proteine Filamente bilden.

Die heterologen aber auch homologen Protein-Protein Interaktionen in lebenden Zellen wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der strahlenlosen Förster Resonanz-Energieübertragung (FRET) von GFP auf mKate2 beschrieben. Allerdings waren die FRET-Ergebnisse aus der Einzelmolekülanalyse nicht eindeutig, da die Quantenausbeute zu gering war, sodass die genaue Zusammensetzung der einzeln entstandenen Proteinaggregate nicht quantitativ analysiert werden konnte. Jedoch konnte das Interaktionspotential von mutierten mit funktionellen Molekülen errechnet werden. Reines Wildtyp Desmin zeigte den höchsten Wert an zweifarbig interagierenden großen Teilchen. Dieses Verhalten spricht für eine geordnete und physiologische Architektur der Desminassemblierung. Die untersuchten Mutanten p.R350P und p.E413K besaßen einen niedrigeren Wert an interagierenden großen Teilchen. Dieses Resultat lässt sich durch die in der Mikroskopie beobachteten Desminaggregate erklären, die zwar kolokalisiert mit Wildtyp Desmin zweifarbig vorlagen, aber molekular gesehen wenig mit Wildtyp Molekülen

interagieren bzw. koassemblieren. Die dritte pathogene Punktmutante p.R454W zeigte zellulär keine pathologischen Auffälligkeiten hinsichtlich der Filamentassemblierung, allerdings konnte auch hier in der Einzelmolekülspektroskopie eine Abweichung des Interaktionspotentials mit Wildtyp Desmin gezeigt werden. Eine Erklärung könnte ein geringerer Einfluss der Mutante durch ein vermindertes Expressionsniveau der R454W Mutante in den Zellen sein oder eine besseres residuiales Filamentbildungspotential.

Die parallel durchgeführten Analysen der Filamentbildung in SW-13-Zellen ergaben reproduzierbare zelluläre Muster an gebildeten Filamenten und Proteinaggregaten, die sich mit den Ergebnissen aus der Einzelmolekülanalyse deckten. Die Zeitverlaufsanalyse über vier Tage zeigte 48h nach transienter Kotransfektion von Wildtyp Desmin mit mutierten Desmin-Varianten ein vollständig entstandenes Desminnetzwerk, das aus kolokalisierten Proteinaggregaten und/oder Desminfilamenten bestand.

Die Generierung einer immortalisierten Myoblastenzelllinie erfolgte über die Isolierung von Myoblasten aus transgenen Mausmodellen mit entsprechenden Genom-Veränderungen. Dazu wurden Immortomäuse® mit einer Desmin Knockout Maus gekreuzt, um Desmin defiziente Myoblasten zu erhalten, die in Kultur konditionell immortalisiert sind. Die Mausmyoblasten enthielten neben dem immortalisierenden Gen *H-2K<sup>b</sup> -tsA58* (thermolabile mutierte Form von Simian Virus 40 (SV40) large T Antigen mit einem Interferon-induzierbaren murinen *H-2K<sup>b</sup>* Promotor) einen homozygoten Knockout von Desmin. Eine fehlende Desminexpression in den Myoblasten konnte durch Genotypisierung bestätigt werden.

Zwei weitere isolierte murine Myoblastenzelllinien enthielten eine in das Genom stabil integrierte humane R350P Desminmutation. Durch Verpaarung der Immortomäuse® mit der Des<sup>tgp.Arg350Pro</sup> Knockin Mauslinie entstanden Myoblasten sowohl mit homozygot, als auch heterozygot vorliegendem Knockin der Punktmutation. Auch hier konnte der myogene Charakter der isolierten Zellen aufgezeigt werden.

## B Einleitung

### 1 Myofibrilläre Myopathien

Myofibrilläre Myopathien (MFM) stellen eine Gruppe seltener, erblich bedingter Erkrankungen der Skelett- und Herzmuskelatur mit einem chronisch-progredienten Krankheitsverlauf dar. Histopathologische Kennzeichen sind Desmin-positive Proteinaggregate, Ablagerungen myofibrillärer Abbauprodukte sowie degenerative Veränderungen des Myofibrillengerüsts (Goebel and Bornemann 1993, Goebel 1997, Selcen, Ohno et al. 2004, Selcen 2011). MFM sind eine genetisch und klinisch heterogene Gruppe neuromuskulärer Erkrankungen, die durch Mutationen in folgenden Genen verursacht werden können, die myofibrilläre und extramyofibrilläre Proteine kodieren:

- Myotilin (Selcen and Engel 2004),
- Desmin (Goldfarb, Park et al. 1998, Goldfarb, Olive et al. 2008, Clemen, Herrmann et al. 2013),
- $\alpha$ B-Crystallin (Selcen and Engel 2003),
- BAG-3 (Selcen, Muntoni et al. 2009, Odgerel, Sarkozy et al. 2010),
- FHL1 (Schessl, Zou et al. 2008),
- Filamin-C (Kley, Hellenbroich et al. 2007),
- Plectin (Schroder, Kunz et al. 2002)
- Titin (Ohlsson, Hedberg et al. 2012, Pfeffer, Elliott et al. 2012), und
- ZASP (Selcen and Engel 2005, Griggs, Vihola et al. 2007).

Die Hälfte der MFM-Erkrankungen werden durch Mutationen in den oben genannten Genen erklärt. Die Erkrankungsursache der restlichen Betroffenen bleibt bislang noch ungelöst. Obwohl in den letzten Jahren neue Erkenntnisse über die Pathogenese von MFM gewonnen wurden, bleibt der genaue molekulare Pathomechanismus vom einzelnen Gendefekt bis zur myopathologischen Krankheitsmanifestation dennoch ungeklärt. Biochemische, molekular- und zellbiologische Methoden wie Next Generation Sequencing Technologie, Laser Mikrodissektion, proteomische Analysen, Tier- und Zellkulturmodelle sowie die Einzelmolekülmikroskopie ermöglichen es, neue, kausale MFM Gene zu identifizieren und den Pathomechanismus besser zu verstehen (Schroder and Schoser 2009, Olive, Kley et al. 2013). Erst kürzlich konnte eine Studie aus Großbritannien eine Foundermutation im Titin Gen (*TTN*) identifizieren, bei der mehrere Generationen mit hereditärer Myopathie mit früher, respiratorischer Insuffizienz (HMERF) betroffen sind. Die Autoren postulieren aufgrund der ähnlichen Pathogenese eine nosologische Klassifikation der HMERF Erkrankungen als MFM-Titinopathien, basierend auf einer *TTN*-Mutation (Pfeffer, Barresi et al. 2013).

Gewöhnlich werden MFM autosomal-dominant vererbt, selten X-chromosomal oder autosomal-rezessiv. Die heute als sporadisch klassifizierten Fälle können häufig entweder durch in der Keimbahn hervorgerufene Neu-Mutationen oder durch die unerkannte Erkrankung der Vorfahren erklärt werden (Selcen 2011).

## 2 Klinische Heterogenität von MFM

Die klinischen Phänotypen Myofibrillärer Myopathien zeigen ein heterogenes Bild bezüglich der langsam progredienten Muskelschwäche (Selcen, Ohno et al. 2004). Klinische Unterschiede im Verlauf und im Schweregrad ergeben sich auch bei verwandten betroffenen Patienten innerhalb einer Familie. Der Beginn der Krankheitssymptome ist meist im Erwachsenenalter zu beobachten. Selten manifestieren sich Myofibrilläre Myopathien schon in der Kindheit oder im Jugendalter, dabei eher in Zusammenhang mit Mutationen in Genen, die für BAG3, FHL1, Plectin und Desmin kodieren (Shimizu, Takizawa et al. 1999, Pinol-Ripoll, Shatunov et al. 2009, Selcen, Muntoni et al. 2009, Shalaby, Hayashi et al. 2009). Die klinische Symptomatik von MFM reicht von einer Skelettmuskelschwäche an den unteren Extremitäten bis zu anderen phänotypischen Muskelschwächen und -atrophien wie einer distalen Myopathie, einer Gliedergürtel-Muskeldystrophie, einem scapuloperonealen Syndrom, einer Beteiligung isolierter Muskelgruppen sowie generalisierten Myopathien. In späteren Krankheitsstadien sind allgemeine Muskelschwäche und -Schwund von Hals und Rumpf zu beobachten (Schroder and Schoser 2009). Unterschiedliche kardiale oder respiratorische Muskelbeteiligungen sind ein bekanntes, klinisches Erscheinungsbild bei manchen Untergruppen der MFM. Als lebensbedrohlich oder lebensbegrenzend gelten dabei deklarative, restriktive oder hypertrophe Kardiomyopathien mit z.T. AV-Blockierungen mit einhergehenden Arrhythmien (Ferrer and Olive 2008). Faziale Muskelschwäche, Schluckstörungen oder Sprechstörungen werden den Desminopathien,  $\alpha$ B-Crystallinopathien und Myotilinopathien zugeordnet. Respiratorische Insuffizienz ist häufig bei Patienten mit Filamin C-, FHL1- und BAG3-Mutationen und in geringerem Ausmaß bei Patienten mit Mutationen im Desmin-,  $\alpha$ B-Crystallin- oder Myotillineng zu finden. Des Weiteren werden Symptome beobachtet, bei denen nicht die Herz- oder Skelettmuskulatur betroffen ist. Dazu zählen beispielsweise angeborene Hauterkrankungen in Verbindung mit Muskeldystrophien bei Plectinopathien (EBS-MD, Epidermolysis bullosa simplex Muskeldystrophie) oder prämatur auftretende Katarakte bei  $\alpha$ B-Crystallinopathien (Vicart, Caron et al. 1998, Shimizu, Takizawa et al. 1999). Rigid spine Syndrom und Skoliose sind klassische Merkmale bei MFM-Patienten mit *BAG3*- oder *FHL1*-Mutationen. Polyneuropathien werden als elektrophysiologische Hinweise auf Mutationen im *ZASP*- oder *FLNC*-Gen angesehen (Schroder and Schoser 2009). Der heutige Stand der Wissenschaft ermöglicht noch keine kausale Therapie bei Myofibrillären Myopathien (Goebel, Fardeau et al. 2008).

## 2.1 Morphologische Merkmale

Im Gegensatz zum heterogenen klinischen Bild und der genetischen Vielfältigkeit von Myofibrillären Myopathien zeigen die einzelnen Untergruppen in der Histopathologie Gemeinsamkeiten auf. Myofibrillendegeneration, Faserspaltung, pathologische Faserkalibervariationen, internalisierte Myonuklei, Veränderungen der Z-Scheiben- und Sarkomerstruktur, ein vermehrter Anteil an Fett- und Bindegewebe und die Akkumulation myofibrillärer Degradationsprodukte sind die wichtigsten gemeinsamen Kennzeichen. Die pathologischen Veränderungen in Muskelbiopsien werden durch eine Trichromfärbung von Muskelgewebeschnitten am besten sichtbar gemacht und zeigen anormale Fasern neben amorphen, granulären oder hyalinen Einschlüssen in unterschiedlicher Größe, Form und Farbreaktion mit Trichrom, je nach basophilem oder eosinophilem Charakter des Einschlussmaterials. Weitere Merkmale von betroffenem Muskelgewebe, die durch Färbungen mit NADH-TR, SDH und COX sichtbar gemacht werden können, sind abnormale Aktivitäten oxidativer Enzyme, sowie das Vorhandensein von Vakuolen, die entweder umrandet („rimmed“) oder nicht umrandet („non-rimmed“) sind und membranartiges Material einschließen (Schroder and Schoser 2009, Selcen 2011).

## 2.2 Molekulare Pathogenese

Die Degeneration der Myofibrillen und die damit einhergehende Degeneration der Z-Scheiben sowie die Ablagerung von intrazellulären, abgebauten filamentösen Material sind distinkte pathologische Veränderungen bei Myofibrillären Myopathien. Solche Akkumulationen von myofibrillären Abbauprodukten und Proteinansammlungen werden als Proteinaggregate bezeichnet. Deshalb zählen die MFM zu den Proteinaggregat-Myopathien (Goebel and Muller 2006). Durch diesen Terminus entstehen Parallelen zu neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankung, bei denen die Anhäufung fehlerhafter Proteine eine wichtige pathogenetische Rolle einnimmt (Olive 2009). Mithilfe der Immunhistochemie und der ergänzenden proteomischen Analyse wurden als Bestandteile dieser Aggregate u. a. Z-Scheiben und Z-Scheiben-assoziierte Proteine (Claeys, van der Ven et al. 2009), Cytoskelettproteine (Vrabie, Goldfarb et al. 2005), Intermediärfilamentproteine (Goebel and Bornemann 1993, Nakano, Engel et al. 1996), Proteine des Ubiquitin-Proteasomensystems (Janue, Olive et al. 2007), Chaperone (Ferrer, Carmona et al. 2005), Kinasen (Nakano, Engel et al. 1997), nukleäre Proteine (Vrabie, Goldfarb et al. 2005) und  $\beta$ -Amyloidvorstufen (De Bleecker, Engel et al. 1996) gefunden. Normalerweise behalten neu synthetisierte Proteine ihre dreidimensionale Struktur permanent, wenn sie korrekt gefaltet sind. Eine Fehlfaltung funktioneller Proteine kann durch Einflussfaktoren wie genetische Veränderungen, posttranskriptionale Modifikationen oder oxidativen bzw. nitrosativen Stress induziert werden. Die inkorrekt gefalteten Proteine werden einer Proteinqualitätskontrolle intrazellulär hergestellter Proteine unterzogen: Kann die

Proteinkorrektur nicht durch Chaperone vermittelt werden, erfolgt die Aktivierung von Ubiquitin-Proteasom-System und Autophagie (induziert durch HSP70 oder Makroautophagie). Gelingen diesen Abbausystemen keine Reparatur, akkumulieren sich die inkorrekt gefalteten Proteine intrazellulär zu Proteinaggregaten (Olive 2009).

Der molekulare Pathomechanismus wird auch in der Degeneration der Myofibrillen sichtbar. So konnte eine anormale Expression verschiedener Z-Scheiben-assoziierter Proteine in Muskelzellen von MFM Patienten nachgewiesen werden, wie z. B. von Myotilin, Desmin, Plectin oder  $\alpha$ B-Crystallin (Selcen, Ohno et al. 2004).

Die biophysikalischen und biomechanischen Eigenschaften der kodierten Proteine werden durch humanpathogene Genmutationen beeinflusst. Bei einer MFM-assoziierten Mutation im Filamin C-Gen kann die Dimerisierung des Actin-Crosslinkerprotein Filamin C *in vitro* fehlschlagen und die Aggregatbildung begünstigt werden (Lowe, Kley et al. 2007). Biomechanische *in vitro* Untersuchungen („strain stiffening“) von primären humanen Patienten-Myoblasten mit Desminmutanten konnten eine erhöhte mechanische Zellsteifigkeit gegenüber Kontroll-Skelettmuskelzellen mit Hilfe eines Zellstretchers nachweisen, was konsekutiv mechanischen Zellstress und zunehmende mechanische Angreifbarkeit und Muskelzellschädigung auslöst (Bonakdar, Luczak et al. 2012). *In vitro* Assemblierungsstudien von Desmin mit Mutationen in der rod Domäne zeigen, dass zum einen kein Filamentnetzwerk *de novo* gebildet werden kann und zum anderen, dass gebildete, abnormale Filamentstrukturen einen Kollaps der bereits bestehenden Filamente auslösen und zu Desmin-positiven Proteinablagerungen bzw. zu Proteinaggregaten führen (Bar, Fischer et al. 2005, Bar, Mucke et al. 2005, Bar, Kostareva et al. 2006, Bar, Goudeau et al. 2007).

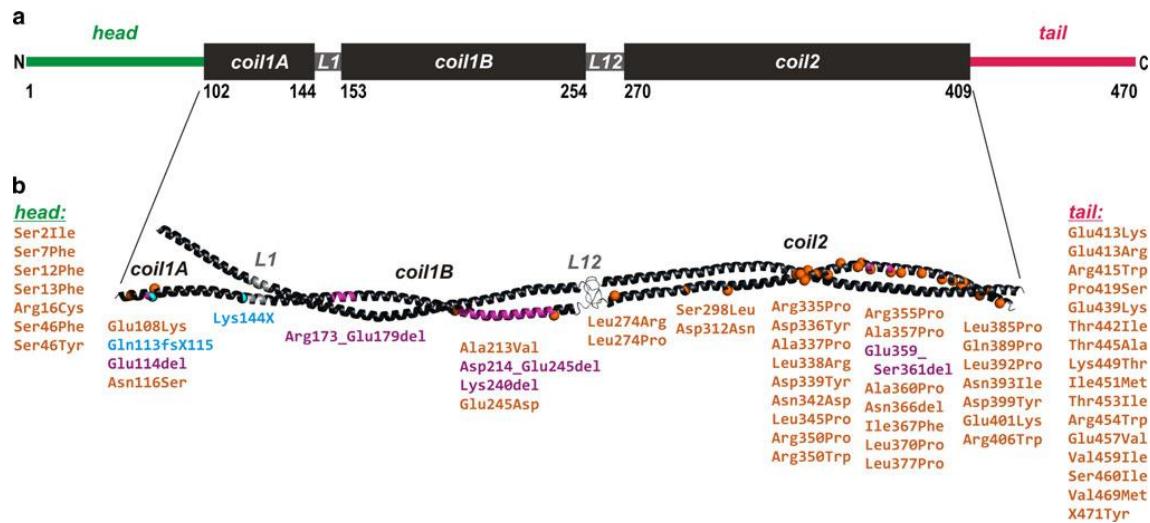
### 3 Desmin und Desminopathien

Desminopathien sind die am häufigsten vorkommende und am besten untersuchte Untergruppe der Myofibrillären Myopathien. Die krankheitsverursachenden Mutationen im Desmin-Gen können über das ganze Gen verteilt vorliegen. Um die humanen Myofibrillären Myopathien zu verstehen, ist das Verständnis der Struktur- und Funktionsweise von Desmin eine Grundvoraussetzung.

#### 3.1 Aufbau und Funktion des Intermediärfilamentproteins Desmin

Desmin ist ein muskelspezifisches Intermediärfilamentprotein vom Typ III im Cytoskelett. Das dafür codierende humane Desmin-Gen (*DES*) liegt als single-copy-Gen auf dem Chromosom 2q35 vor und besitzt eine Länge von ca. 8,3kb (Li, Lilienbaum et al. 1989). Das Desminprotein wird durch neun Exons codiert und besteht aus 470 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von

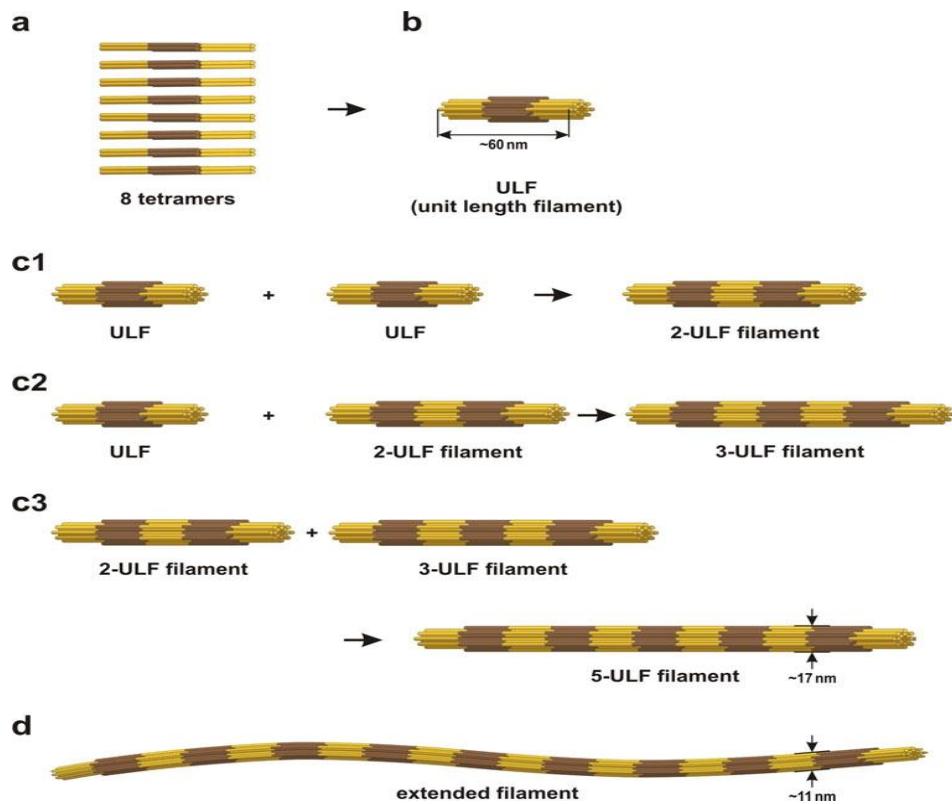
53,5 kDa. Wie alle anderen Typ III IF-Proteine (Intermediärfilamentproteine) hat Desmin eine dreigeteilte Proteinstruktur: Die ca. 45 nm lange zentrale  $\alpha$ -helikal gewundene „rod“ Domäne wird von nicht  $\alpha$ -helikalen flexiblen N-terminalen („head“) und C-terminalen („tail“) Domänen flankiert. Die zentrale „rod“ Domäne besteht aus drei konstant vorhandenen  $\alpha$ -Helices (coil1A, 1B und 2), die durch Linkerpolypeptide (L1 und L12) miteinander verbunden sind (Chernyatina, Nicolet et al. 2012) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1 Proteinstruktur des humanen Desminmoleküls und molekulares Modell von dimeren rod Domänen.**

**a** Die schwarzen Segmente stellen die  $\alpha$ -helikalen coil Abschnitte im Proteinmolekül dar. Die Linkerpolypeptidketten sind grau dargestellt mit  $\alpha$ -helikaler (L1) und unbekannter Sekundärstruktur (L12). Die nicht-helikalen amino-(„head“) und carboxy-(„tail“) terminalen Domänen sind bunt dargestellt. Zahlen stehen für die finale Aminosäureposition. **b** Molekulares Modell einer dimeren Desmin coiled-coil rod Domäne, die aufgrund der strukturellen Homologie zur entsprechenden Vimentin-Domäne korrespondierend dargestellt ist (Chernyatina, Nicolet et al. 2012). Die bis dahin bekannten pathogenen Mutationen sind farbcodiert und nach ihrer Lage im Protein aufgezeigt. Missense Mutation (orange), Deletion (lila) und Trunkierung (türkis) (Clemen, Herrmann et al. 2013).

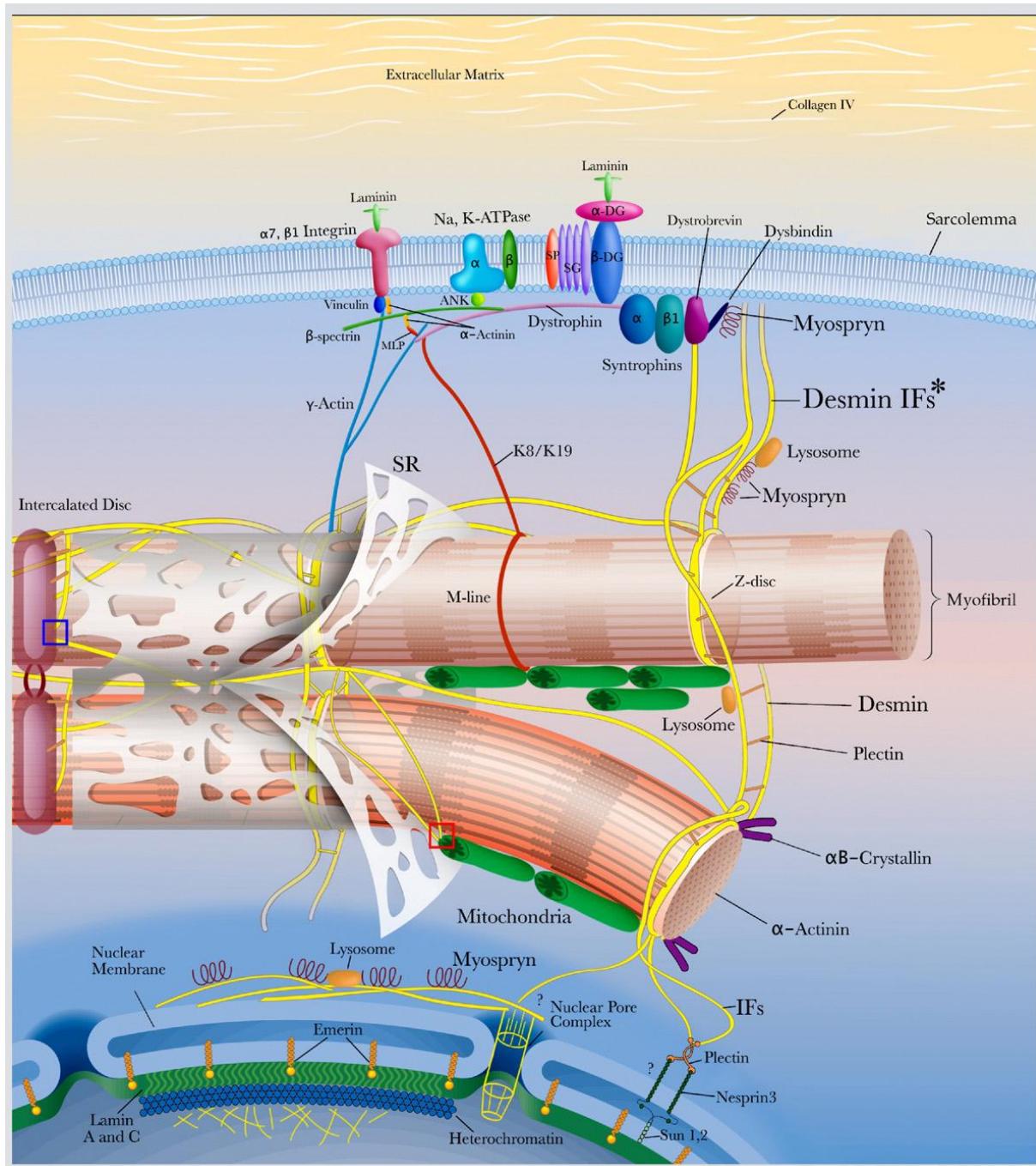
Die Assemblierung der Typ III IF-Proteinmoleküle beginnt mit einer parallelen, coiled-coil Aneinanderlagerung zu Dimeren, wobei die rod Domäne bei der coiled-coil-Dimerisierung durch den sogenannten heptad repeat (sieben Aminosäuren mit bestimmter Polarität) eine zentrale Rolle spielt (Burkhard, Stetefeld et al. 2001). Zwei coiled-coil Dimere lagern sich halbversetzt und antiparallel zu einem Tetramer zusammen. Mehrere Tetramere lagern sich spontan über die Zwischenstufe der Unit length filaments (ULFs), bestehend aus 32meren, zu Filamenten zusammen (Herrmann, Haner et al. 1996). Ausgehend von den Tetrameren kann die Assemblierung spontan in drei Stufen verlaufen: (1) Eine laterale parallele Anordnung von Tetrameren zu longitudinalen 32meren (ULF, unit length filaments), (2) die longitudinale Assemblierung von ULFs und kurzen Filamente zu verlängerten Intermediärfilamenten und (3) die finale radialverdichtete Aneinanderlagerung der Filamente zum ausgereiften IF-Gerüst (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2 Schematisches Modell der cytoplasmatischen IF-Assemblierung.**

**a** Zwei Dimere lagern sich zum antiparallel halbversetzten Tetramer zusammen. **b** Laterale Zusammenlagerung der Tetramere unter bestimmten Assemblierungsbedingungen zu unit length filaments (ULFs), die aus acht Tetrameren bestehen. **c1-c3** Längsausrichtung von mehreren ULFs zu kurzen Filamentstücken. **d** Radiale Verdichtung der langen Filamente zum ausgereiften Intermediärfilament (Clemen, Herrmann et al. 2013).

Als essentieller Bestandteil des Filamentgerüsts in Muskelzellen spielt Desmin eine zentrale Rolle bei Signalübertragungsprozessen sowie bei der strukturellen und funktionellen Verankerung, Anordnung und Verbindung der Myofibrillen und der Zellorganellen über die Z-Scheiben. Es interagiert sowohl mit anderen IF-Proteinen (Synemin, Syncoilin, Vimentin), mit IF-assozierten Proteinen (Plectin-Isoformen,  $\alpha$ B-Crystallin), mit sich selbst, als auch mit der extrazellulären Matrix über das subsarkolemmale Cytoskelett. Bei mechanischem Stress wird der Elastizität des Desminfilaments eine zellprotektive Rolle im quergestreiften Muskel zugeschrieben. Demnach kann das Desminnetzwerk mechanische Energie während der Muskelkontraktion aufnehmen (Price 1987, Capetanaki, Bloch et al. 2007).



**Abbildung 3 Schematische Darstellung des Intermediärfilamentgerüsts im kardialen Muskel und die potentiellen Verbindungen mit unterschiedlichen Membrankompartimenten und Organellen.** Desmin und die möglichen IF-Interaktionspartner (nicht muskelspezifisch), die die Z-Scheibe umgeben, sind gelb dargestellt. Desmin und die assoziierten Proteine verbinden sich sowohl untereinander als auch mit dem Sarkolemm, dem kontraktilem Apparat, Membrankomponenten und Organellen (Desmosomen im Herzmuskel), SR: Sarkoplasmatisches Retikulum; IFs: Intermediärfilamente; (Capetanaki, Bloch et al. 2007).

### 3.2 Klinik der Desminopathien

Desminopathien zählen, nach den bis jetzt veröffentlichten Daten, mit einer Prävalenz von fünf Betroffenen aus 10000 zu den seltenen Erkrankungen (*engl. rare diseases*). Bis Juni 2014 waren 78 krankheitsverursachende Mutationen im *DES*-Gen identifiziert worden (<http://www.LOVD.nl/DES>). Desminmutationen sind nach Myotilinmutationen einer der häufigsten vorhandenen Gendefekte, die Myofibrilläre Myopathien auslösen (Olive, Odgerel et al. 2011). Die Vererbung erfolgt meistens autosomal dominant, selten autosomal rezessiv. Sporadische Fälle oder *de novo* Mutationen sind ebenfalls bekannt. Der Erkrankungsbeginn ist von der ersten bis zur achten Lebensdekade variabel, allerdings zeigt sich bei der Mehrzahl der Patienten mit familiärer und sporadischer kombiniert-heterozygoter Desminmutation eine Krankheitsmanifestation zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Schroder and Schoser 2009, van Spaendonck-Zwarts, van Hessem et al. 2011). In seltenen rezessiven Fällen manifestiert sich das klinische Bild der Desmin-assoziierten Myopathien mit kardialer Beteiligung in den ersten zehn Lebensjahren (Clemen, Herrmann et al. 2013).

In einer Metanalyse von 2011 wurde zusammenfassend eine Mortalitätsrate von 26% bei einem Durchschnittslebensalter von  $49 \pm 9,3$  Jahre der Betroffenen errechnet (van Spaendonck-Zwarts, van Hessem et al. 2011).

#### Skelettmuskel

Das klinische Bild von Desmin-assoziierten Myopathien zeigt sich meistens initial durch eine distale Skelettmypathie mit progressiver Symptomatik, aus der sich eine Mischform oder eine einzeln vorliegende proximale und distale Muskelschwäche entwickelt. Es gibt jedoch auch Desminmutationen, die Gliedergürtel-, skapuloperoneale und generalisierte Myopathien verursachen (Bar, Fischer et al. 2005, Walter, Reilich et al. 2007, Clemen, Fischer et al. 2009).

Isolierte Skelettmuskelmyopathien sind nur bei 22% der Erkrankten identifiziert worden (van Spaendonck-Zwarts, van Hessem et al. 2011). Mit dem Fortschreiten der Erkrankung kommt Muskelatrophie und-schwäche der oberen Extremitäten und der Rumpf- und proximalen Beinmuskulatur hinzu. Schwächen der fazialen Muskulatur sind leicht ausgeprägt und bulbäre Symptome, die als Schluckbeschwerden beschrieben sind, zeigen sich im fortgeschrittenem Stadium der Krankheit (Goldfarb, Vicart et al. 2004). Katarakte sind eigentlich ein spezifisches Manifestationsmerkmal von  $\alpha$ B-Crystallinopathien, jedoch zeigte sich dieses Symptom auch in zwei Fällen von Desmin-assoziierten Myopathien (Olive, Goldfarb et al. 2004).

Erhöhte Serum-Creatinkinase-(CK)-Spiegel, als Markerenzym für Schädigungen an Herz- und Skelettmuskeln, sind bei 57% der Betroffenen festgestellt worden (van Spaendonck-Zwarts, van Hessem et al. 2011).

### Kardiale Manifestation

Multiple Formen von kardialen Erkrankungen wie Kardiomyopathien, kardiale Überleitungsstörungen (CCD=cardiac conduct defects) oder Arrhythmien treten bei Dreiviertel aller Träger pathogener Desminmutationen auf und manifestieren sich entweder zeitlich gesehen davor, gleichzeitig oder nach einer Skelettmuskelschwächesymptomatik.

Isolierte kardiale Erkrankungen sind im Zusammenhang mit einer *DES*-Mutation nur in 22% der Fälle bekannt. Der Häufigkeit nach werden Kardiomyopathien in dilatative, unspezifische, restriktive und arrhythmogene, rechtsventrikuläre Kardiomyopathien klassifiziert. In einer Kohortenstudie mit 425 Probanden konnte umgekehrt gezeigt werden, dass 1 bis 2% aller diagnostizierten dilatativen Kardiomyopathien, die isoliert vorlagen, durch Mutationen im *DES*-Gen verursacht werden (Taylor, Slavov et al. 2007).

Ein evidenter Geschlechtsunterschied zeigt sich bei den Kardiomyopathien: Männliche Träger der pathogenen Mutationen leiden öfter an kardialer Manifestation als weibliche Träger. MRT-Aufnahmen vom Herzen werden als sensitivs Diagnosehilfsmittel eingesetzt, um die fokalen, pathologischen kardialen Veränderungen in frühen und klinisch asymptomatischen Stadien der Desminopathie zu erkennen (van Spaendonck-Zwarts, van Hessem et al. 2011, Clemen, Herrmann et al. 2013).

### Respiratorische Beteiligung

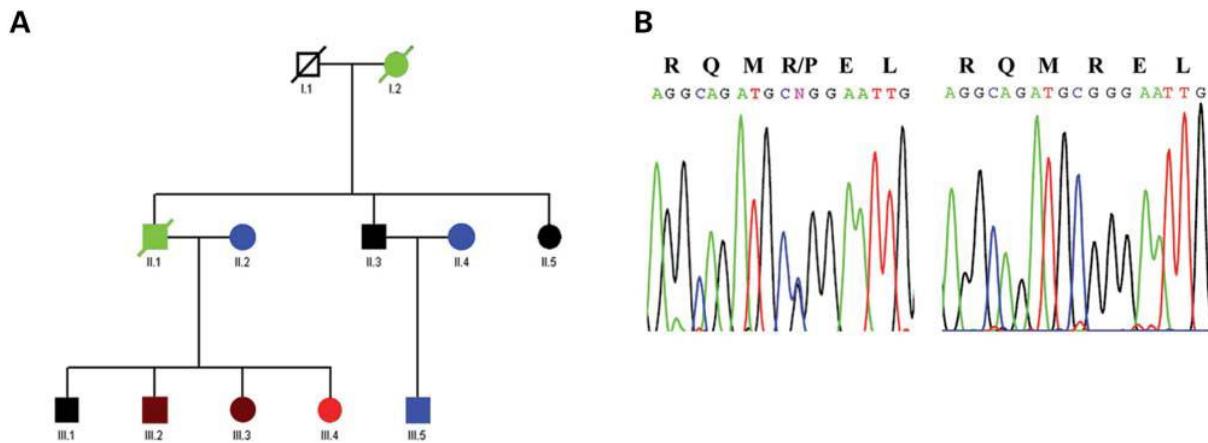
Pulmonale Erkrankungen können im Verlauf der Krankheit als lebensbedrohliche, rezidivierende bronchiale Erkrankung auftreten und je nach Verlaufsform nächtliche nichtinvasive Beatmung erforderlich machen (Olive, Goldfarb et al. 2004). Die kritische Rolle des Desminproteins im respiratorischen System lässt sich durch die komplexe mechanische Funktion im Diaphragma erklären (Boriek, Capetanaki et al. 2001).

In dieser Forschungsarbeit wurden drei verschiedene pathogene Desminmutationen mit unterschiedlicher Lage im Desmingen ausgewählt, deren klinische Phänotypen im Folgenden dargestellt werden:

### p.R350P Desminopathie

Erstmals wurde 2005 eine heterozygote R350P Desminmutation bei einem Indexpatienten identifiziert (siehe Abbildung 4) (Bar, Fischer et al. 2005). 2007 konnte bei Walter et al. das klinische Bild der R350P Desminopathie bei vier nicht verwandten deutschen Familien eingehend beschrieben werden: Molekulargenetische Untersuchungen ergaben eine heterozygote R350P Mutation (1049G>C) in allen betroffenen Familienmitgliedern mit manifestem klinischem Phänotyp. Dabei erkannte man eine große klinische Variabilität, sogar innerhalb derselben Familien. Das phänotypische Spektrum reichte von einer skapuloperonealem

Gliedergürteldystrophie bis zu einer distalen Muskeldystrophie mit oder ohne kardiale und respiratorische Beteiligung. Faziale Muskelschwäche, Schluckstörungen und Gynäkomastie waren häufig zusätzliche klinische Zeichen der Myopathie. Die erkrankten Männer trugen dabei ein höheres Risiko, an plötzlichem Herztod zu sterben als betroffene Frauen (Walter, Reilich et al. 2007).



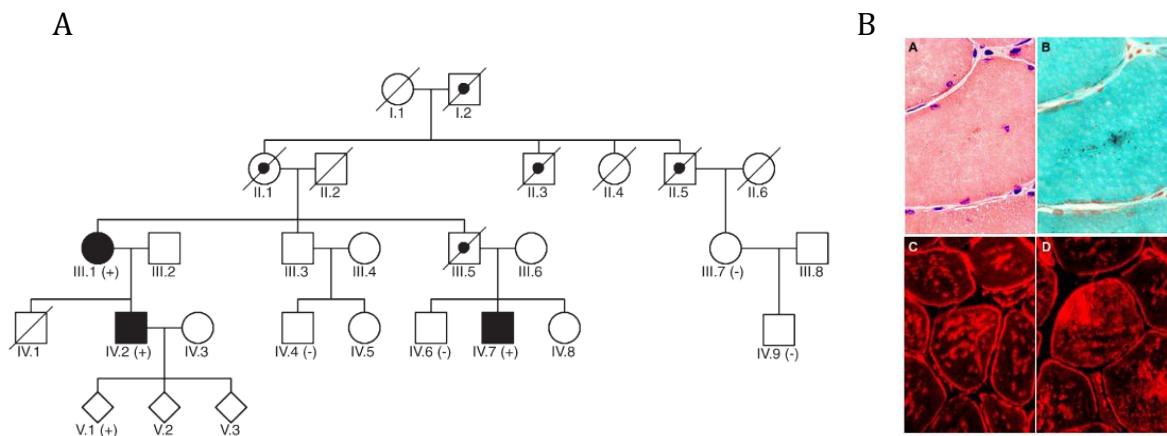
**Abbildung 4 Erstbeschreibung der R350P Desminmutation bei Bär et al., 2005.**

**A** Familienstammbaum und Segregation von R350P Desmin. II.3 repräsentiert den Indexpatienten, *schwarz*: klinisch betroffen und R350P positiv; *grün*: klinisch betroffen, Desminanalyse nicht durchgeführt; *braun*: klinisch nicht betroffen und R350P positiv; *blau*: klinisch nicht betroffen, R350P negativ; *rot*: keine Informationen bekannt; I.1 nicht betroffenes Individuum, Desminanalyse nicht durchgeführt. **B** Vergleich der Nukleotidsequenzen im Desmingen von PCR-amplifizierter genomicscher DNA des Indexpatienten mit einer Normalkontrolle. Es wurde eine Missense Mutation R350P im Exon 6 des *DES*-Gens entdeckt (Bar, Fischer et al. 2005).

#### p.E413K Desminopathie

Im Jahr 2007 konnte in einer polnischen Familie am hoch konservierten C-Terminus der  $\alpha$ -helikalen rod-Domäne die *DES*-Mutation p.E413K als Ursache für restriktive Kardiomyopathien festgestellt werden.

Drei Indexpatienten zeigten verschiedene kardiale Beeinträchtigungen, die zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr klinisch manifest wurden. Ein intermittierender AV Block mit Synkope erforderte bei allen drei Patienten die Implantation eines Schrittmachers und auftretendes Vorhofflimmern wurde durch Kardioversion behandelt. Die Erkrankung zeigte eine langsame Progredienz mit Schwierigkeiten beim Gehen und Treppensteigen, das durch eine Muskelschwäche und -atrophie der unteren Extremitäten hervorgerufen wurde. Bei den bereits verstorbenen Familienmitgliedern war anamnestisch bekannt, dass ein Mitglied (III.5) mit 30 Jahren am plötzlichen Herztod verstarb und vier weitere Verwandte in jungen Jahren plötzlich gestorben sind (Pruszczak, Kostera-Pruszczak et al. 2007).



**Abbildung 5 E413K Desminmutation erstmals beschrieben bei Pruszczak et al., 2007.**

**A** Stammbaum einer polnischen Familie, in der die E413K Missense-Mutation mit der Erkrankung segregiert. Volle Symbole: Mitglieder mit diagnostizierter restriktiver Kardiomyopathie; Symbole mit Punkt: Familienmitglieder, die an Herzerkrankungen gestorben sind; (+) E413K Mutation identifiziert, (-) E413K Mutation ausgeschlossen. **B** Histopathologie einer Skelettmuskelbiopsie des Indexpatienten (IV.2) A HE-Färbung mit kleinen roten intracytoplasmatischen Proteinansammlungen B Trichromfärbung der gleichen Muskelfaser mit blauen Ablagerungen. C, D Immunhistochemische Färbung von Desmin zeigt Desmin-positive Ablagerungen im Cytoplasma (C) und unterhalb des Sarkolemm (D) (Pruszczak, Kostera-Pruszczak et al. 2007).

#### p.R454W Desminopathie

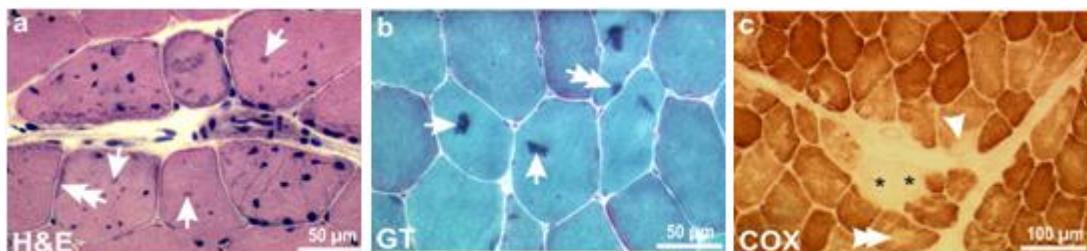
Die dritte untersuchte pathogene heterozygote Desminmutation liegt in Exon 8 (c.1360C>T) und verursacht im Desminprotein einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan an Position 454. Erstmals wurde die Mutation bei einem 15-jährigen Jungen aus Nordafrika 2005 als pathogen eingestuft, bei dem sich eine hypertrophe Kardiomyopathie durch Kurzatmigkeit und eingeschränkte körperliche Belastung bemerkbar machte. Mit 25 Jahren unterzog er sich einer Herztransplantation, nach der er bald darauf eine langsam progressive Muskelschwäche entwickelte, wobei mehr die distalen als proximalen Gliedermuskeln betroffen waren. Die Muskelschwäche zeigte sich beispielsweise durch ein Steppergangbild, eine bilaterale Ptose und faziale Muskelschwäche. Die Biopsie der betroffenen Muskeln ergab abnormale Desmin-positive Ablagerungen innerhalb der Muskelfasern und granuläres filamentöses Material. In der Familienanamnese waren keine Fälle von kardialen und muskulären Erkrankungen bekannt. Zusätzlich trug der Patient eine p.Q74K Mutation im Myotilin, die als konditionell pathogen beschrieben wurde. Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* konnten einen Einfluss der DES-Mutation auf die funktionelle Filamentbildung nachweisen (Olive, Goldfarb et al. 2005, Bar, Goudeau et al. 2007).

2010 wurde bei zwei Geschwistern einer weiteren Familie dieselbe R454W DES-Mutation gefunden, die bei beiden Betroffenen zu Herzversagen aufgrund fortgeschrittener Kardiomyopathie vor dem 30. Lebensjahr führte. Beim Vater der Kinder war ebenfalls eine

dilatative Kardiomyopathie bekannt. Er starb mit 31 Jahren an den Folgen einer Thromboembolie mit Lungeninfarkt und Herzinsuffizienz (Otten, Asimaki et al. 2010).

### 3.3 Pathogenese

Das morphologische Merkmal von betroffenen Skelett- und Herzmuskeln von Patienten mit Desminopathie sind pathologische Proteinaggregate (subsarkolemmale oder sarkoplasmatische Einschlüsse). Daneben zeigen sich in einer H&E, Gomori Trichrom oder enzymatischen Färbung abgerundete Muskelfasern, Fasernsplitting, Internalisierung der Nuclei, vermehrtes Bindegewebe und Fettgewebe, nonrimmed oder rimmed Vakuolen neben sarkoplasmatischen Einschlüssen, mitochondrialen Veränderungen, rubbed out Fasern oder core-like Läsionen (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6 Proteinaggregate und mitochondriale Veränderungen in Desminopathien.**

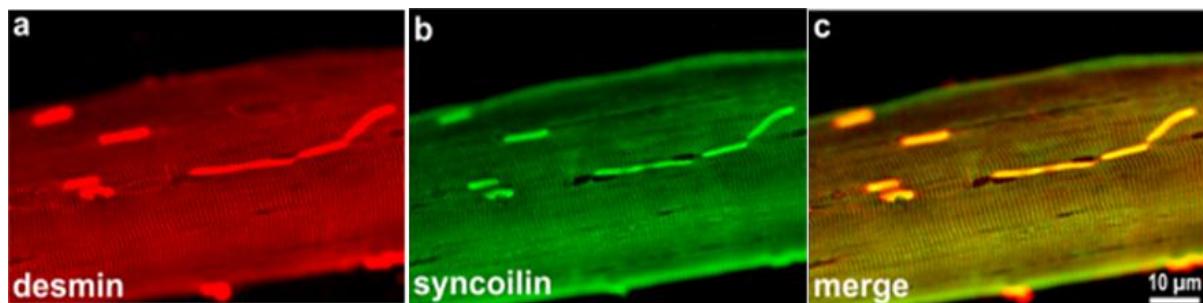
**a** und **b** Pfeile und Doppelpfeile kennzeichnen Proteinablagerungen im Sarkoplasma und im subsarkolemmalen Bereich. In **c** sind sogenannte rubbed out (Pfeilspitze) und core-like (Doppelpfeilspitze) Läsionen hervorgehoben (Clemen, Herrmann et al. 2013).

Grundsätzlich variieren die myopathologischen Untersuchungen und Erkenntnisse innerhalb der Desminopathien. Die Bestandteile der pathologischen Proteinaggregate können über Immunhistochemie identifiziert werden. Dazu zählen Cytoskelettproteine, wie Dystrophin, F-Aktin, Filamin C, Myotilin, Synemin und Desmin, Hitzeschockproteine, Ubiquitin, mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierte Proteine ( $\beta$ -APP) und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK2, p21) (Schroder and Schoser 2009).

Krankheitsauslösende Mutationen findet man über das ganze *DES*-Gen verteilt, was sich teilweise mit dem weiten Phänotypenspektrum korrelieren lässt. Auffällig ist ein Mutationscluster im Exon 6, das die C-terminale Hälfte der coil 2-Domäne kodiert. Mutationen in diesem Genabschnitt lassen einen isolierten Skelettmuskelphänotyp erkennen, Mutationen im head oder tail Bereich des Proteins verursachen Kardiomyopathien (van Spaendonck-Zwarts, van Hessem et al. 2011). Allerdings wird auch von „tail“-Mutationen berichtet, von denen die wesentlichen Phänotypmerkmale verglichen mit Desminopathien ausgelöst durch „coil“ Mutationen keinen Unterschied zeigten (Maddison, Damian et al. 2012).

Bei heterozygot vorliegender Mutation sind in einzelnen Muskelfasern Desmin-positive Proteinaggregate mit den normal quergestreiften Muskelfasern assoziiert. Es ist aber noch nicht geklärt, ob Intermediärfilamente molekular betrachtet aus der mutierten und oder der Wildtyp-

Form gebildet werden oder die Proteinaggregate aus beiden Desminproteinen bestehen oder ob das mutierte Protein vom Wildtyp Desmin segregiert vorliegt.



**Abbildung 7 Immunfluoreszenzfärbung von Desmin (rot) und Syncolin (grün) einer isolierten Muskelfaser bei einer Desminopathie.**

Dargestellt sind die multiplen Proteinaggregate in Gegenwart von normalen transversalen quergestreiften Mustern bei einem Patienten mit R350P Desminmutation (Clemen, Herrmann et al. 2013).

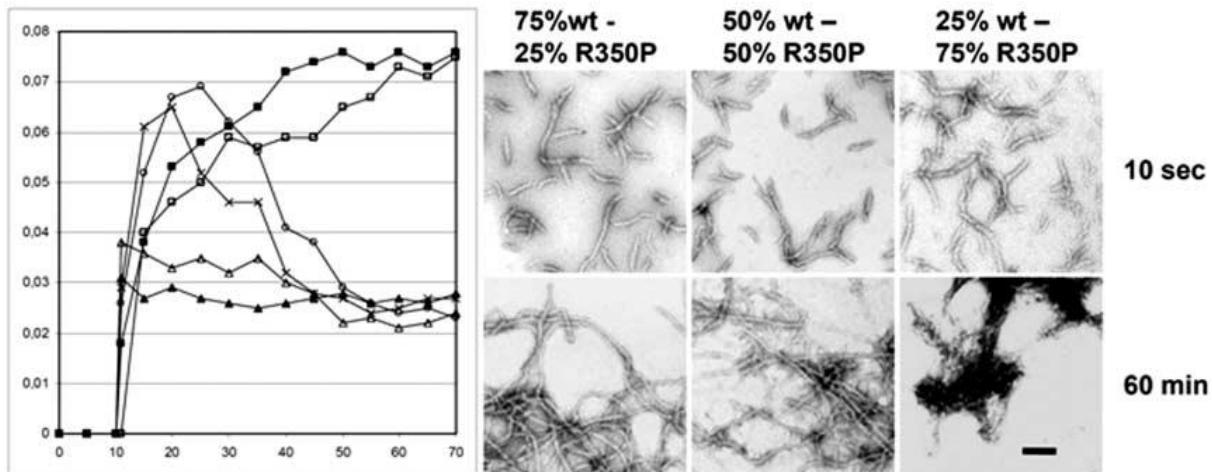
Die gesamte exprimierte Desminmenge ist im Skelettmuskel von betroffenen MFM Patienten, verglichen mit Normalkontrollen, meistens unverändert. Allerdings liegt bei seltenen Desminmutationen ein Teil des exprimierten Proteins trunkiert vor (Clemen, Fischer et al. 2009). In Muskelfasern, die pathologische Proteinaggregate enthalten, liegt Desmin oxidiert und nitriert vor. Diese Modifikationen scheinen einen toxischen Effekt zu haben und beeinflussen auf diese Weise die Funktion des Ubiquitin-Proteasomsystems (UPS). Weiterhin findet man in Desminopathien und in Myotilinopathien erhöhte Mengen an glykosylierten, lipoxidierten und nitrierten Proteinen, die zu Fehlfaltungen prädestinieren und resistent gegenüber dem Proteinabbau über das UPS sind (Janue, Odena et al. 2007, Janue, Olive et al. 2007). Die Desmin-positiven Proteinaggregate in Desminopathien sind mit mutiertem Ubiquitin (UBB<sup>+1</sup>) angereichert und kolokalisieren sowohl mit dem Autophagiemarker p62 als auch mit kleinen Hitzeschockproteinen. In der Histopathologie findet man bei SDH oder COX Färbungen Muskelareale mit erhöhter oder erniedrigter mitochondrialer Enzymaktivität (Schroder, Vrabie et al. 2007, Schroder and Schosser 2009).

*In vitro* Assemblierungsstudien konnten zeigen, dass die meisten Desminmutanten kein Filamentnetzwerk *de novo* bilden können, sondern zu Desmin-positiven Aggregaten und nichtfilamentösen Strukturen ausreifen. Die meisten davon können einen Kollaps eines bereits vorhandenen IF-Netzwerks induzieren; manche Mutanten werden in das IF-Netzwerk integriert und verhalten sich somit ähnlich wie Wildtyp Desmin (Bar, Strelkov et al. 2004, Bar, Fischer et al. 2005, Bar, Kostareva et al. 2006, Sharma, Mucke et al. 2009).

Bei Bar et al., 2005 konnten in rekombinanten mutierten Desminproteinen vier verschiedene pathologische Wirkungsweisen auf die Assemblierung beobachtet werden: (1) scheinbar normale Filamentbildung, (2) gestörte Längsausrichtung und radiale Verdichtung, (3) verstärkte

Filamentzusammenlagerung und Aggregatbildung sowie (4) konservierte ULF Bildung, dabei aber Entartung der Assemblierung und Zusammenbruch zu kleinen Aggregaten. (Bar, Mucke et al. 2005, Bar, Mucke et al. 2006).

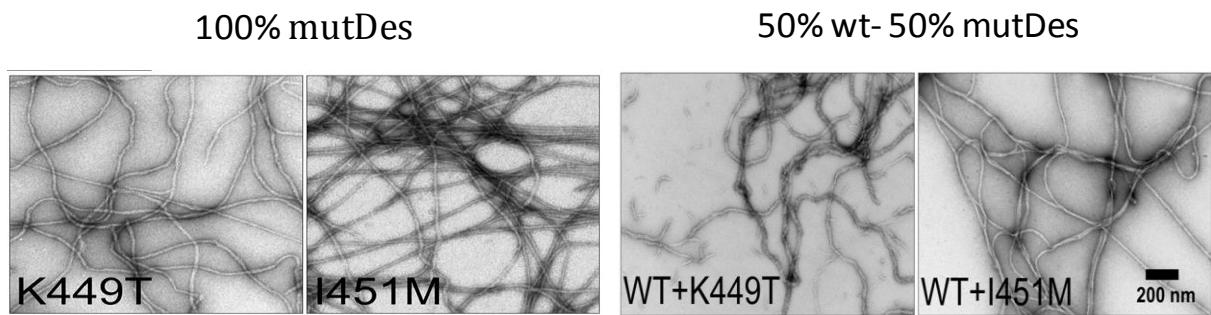
Biomechanische Eigenschaften der Intermediärfilamente können durch Desminmutationen verändert werden (siehe 3.3). Die Elastizität der Filamentnetzwerke spielt eine große zellprotektive Rolle bei mechanischem Stress und kann somit mechanische Energie während einer Muskelkontraktion ableiten. Bei mutierten Desminformen, die augenscheinlich eine normales Netzwerk ausbilden können, konnte untereinander ein Unterschied in den nanomechanischen Eigenschaften gezeigt werden, bei dem manche Desminmutante normale Wildtyp ähnliche Viskoelastizität zeigten und bei anderen untersuchten Formen die mechanische Festigkeit („strain stiffening“) bei Zugbelastung reduziert war (siehe Abbildung 8) (Kreplak and Bar 2009, Bar, Schopferer et al. 2010).



**Abbildung 8 Viskometrische und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Koassemblierungen wt Desmin mit R350P Desmin.**

Dargestellt sind unterschiedliche Proteinmengenverhältnisse von Wildtyp Desmin und R350P Desmin. 25% der Mutante reichen aus, um die Viskoelastizität der Wildtyp Assemblierung zu beeinflussen und dichtgepackte Aggregate zu bilden (Bar, Fischer et al. 2005).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass einzelne Desminmutanten bei Koassemblierungsstudien mit Wildtyp Desmin in äquimolarer Menge einen dominant negativen Effekt auf die Filamentassemblierung *in vitro* ausüben (Sjoberg, Saavedra-Matiz et al. 1999, Bar, Fischer et al. 2005, Bar, Schopferer et al. 2010).



**Abbildung 9 Filamentassemblierung von wt Desmin verglichen mit Desmin-K449T sowie Kopolymerisation von wt Desmin und Desmin-I451M.**

Bei äquimolarer Konzentration von Wildtyp Desmin+K449T lassen gebildete kurze ULF Strukturen eine Störung der Längsausrichtung erkennen, was nur heteropolymer entsteht. Ohne Wildtyp Desmin assembliert K449T alleine zu einem verlängerten Filamentnetzwerk. Im Gegensatz zur Koassemblierung von I451M mit Wildtyp Desmin, wobei laterale Einzelfilamentzusammenlagerung und Bündelung entstehen, hat K449T einen dominant negativen Effekt auf die Wildtyp-Filamentbildung. Maßstabsbalken 200 nm (Bar, Schopferer et al. 2010)

Diese Ergebnisse konnten auch von uns in Vorarbeiten einzelmolekülspktroskopisch bei der R350P Desminmutante bestätigt werden, wobei schon 20% der Mutante ausreichten, um einen dominant negativen Effekt auf das Filamentnetzwerk von Wildtyp Desmin zu erkennen (Levin, Bulst et al. 2010).

## 4 Mausmyoblastenmodelle mit KI R350P Desmin und Desmin KO

Etablierte stabile Zelllinien mit myogenem Differenzierungspotential waren bislang nicht verfügbar. Die Generierung von Zellkulturmodellen aus primären immortalisierten murinen Myoblasten kann diese Lücke in der Erforschung Myofibrillärer Myopathien schließen.

Für die hier entwickelten Zelllinien wurden zwei verschiedene transgene Mausmodelle benötigt (siehe dazu 7.4.1):

Myoblasten des Desmin-defizienten Mausmodells (des<sup>-/-</sup>) (Li, Colucci-Guyon et al. 1996) besitzen den erforderlichen Nullbackground, um in Transfektionsexperimenten von mutierten myofibrillären Proteinen endogenes Wildtyp Desmin als möglichen Einflussfaktor ausschließen zu können.

Die transgene Maus mit einem Knockin der humanen Desminmutation p.R350P (*Des<sup>tg p.Arg350Pro</sup>*) wird noch an anderer Stelle von Clemen *et al.* publiziert werden. Myoblasten dieses Knockin Modells ermöglichen eine stabile Expression einer der in dieser Arbeit untersuchten Desminmutationen.

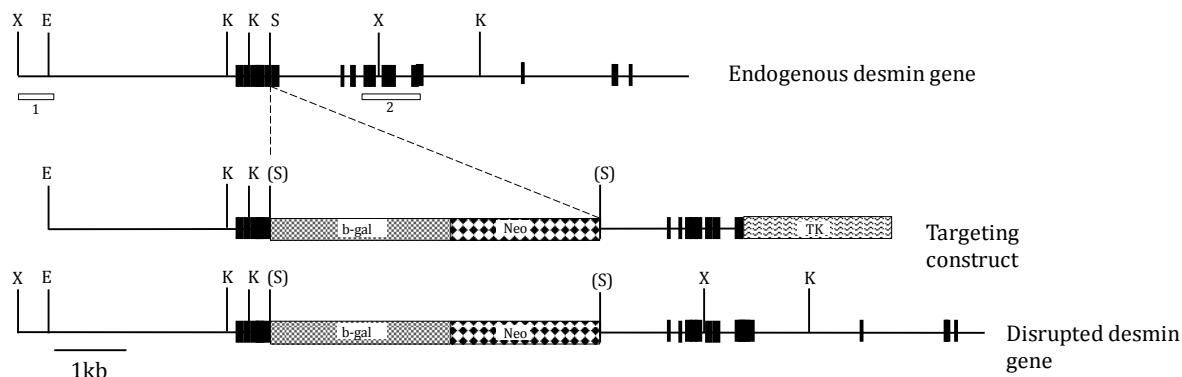
Die Desmin Knockout sowie die Desmin p.R350P Knockin Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Rolf Schröder (Universitätsklinikum Erlangen) in Kollaboration mit PD Dr. Christoph Clemen (Universitätsklinikum Köln) zur Verfügung gestellt.

## 4.1 Immortomaus

Für das angestrebte Zellkulturmodell wurden zwei transgene Mausmodelle mit Immortomäusen® verpaart, um das für die Immortalisierung verantwortliche Transgen *H-2K<sup>b</sup>-tsA58* stabil in das Genom der Nachzucht zu integrieren. Dieses thermolabile (33°C) immortalisierende Gen enthält die thermosensitive Mutante tsA58 des SV40 large T Antigens, das als Protoonkogen im Simian-Virus 40 vorkommt. Der MHC Klasse I Promotor *H-2K<sup>b</sup>* ist durch IFN $\gamma$  konditionell induzierbar (Jat, Noble et al. 1991, Morgan, Beauchamp et al. 1994).

## 4.2 Desmin KO Maus

Das Desmin Knockout Mausmodell wurde von Li et al. generiert. Als Background diente die C57Bl6-Maus. Die fertile homozygote Desmin Knockout Maus wurde als morphologisch normal beschrieben und lebte im Schnitt ein Jahr. Histopathologisch konnten allerdings eine zerstörte Muskelarchitektur und myokardiale Degeneration beobachtet werden. Es fanden sich abnormale Sarkomere vor allem im Diaphragma, in der Herzmuskulatur und in der glatten Muskulatur der Gefäßwände (Li, Colucci-Guyon et al. 1996).

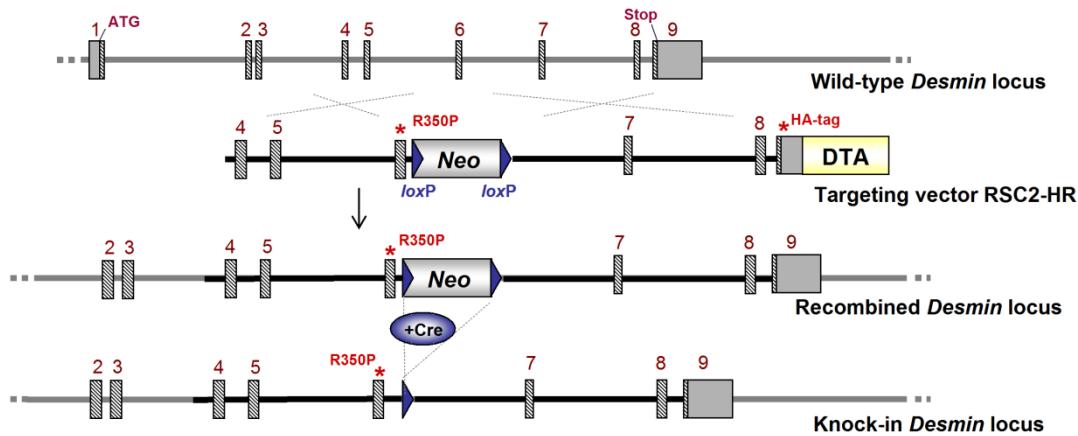


**Abbildung 10 Marketing Schema der Desmin KO Maus.**

Genomische Struktur und Restriktionsstellen im Locus des murinen Desmin-Gens. Darstellung des Inaktivierungsvektors; E, EcoRI; K, KpnI; S, SalI; X, XbaI, TK: negativer Selektionsmarker Thymidinekinase. Der Inaktivierungsvektor wird molekularbiologisch konstruiert und besteht aus dem zu inaktivierenden Gen, das eine Mutation (neo-Kassette) trägt, sodass es nicht mehr transkribiert werden kann, bzw. das entstehende Protein inaktiv ist. Der Austausch zwischen den DNA-Abschnitten erfolgt durch homologe Rekombination. Bei der homologen Rekombination lagern sich die benachbarten Abschnitte des Gens im Vektor an die gleiche Stelle im Maus-Genom und werden in manchen Fällen rekombiniert (Li, Colucci-Guyon et al. 1996).

### 4.3 Desmin R350P KI Maus

Die Desmin R350P KI Maus (Arbeitsgruppe Clemen et al.) wurde über homologe Rekombination in murinen ES-Zellen mit Hilfe eines Targeting Vektors generiert. Die Charakterisierung dieser transgenen Knockin Maus sowie deren Targeting Schema werden noch an anderer Stelle publiziert (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11 Targeting Schema der Desmin R350P KI Maus.**

Über ein Cre/loxP System wurde das Targeting Gen mit der enthaltenen humanen Desmin-Punktmutation R350P über Rekombination in das Mausgenom eingebracht. Die transgene Maus wird noch an anderer Stelle publiziert werden (Clemen et al., persönliche Mitteilung).

## 5 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Die konfokale Einzelmolekülspektroskopie macht sich die Brown'sche Molekularbewegung von Teilchen in einer Lösung zu Nutze und wurde als neues Verfahren aus der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie entwickelt, um die Diffusionseigenschaften von Einzelmolekülen zu erfassen (Magde, Elson et al. 1972, Ehrenberg and Rigler 1974, Magde, Elson et al. 1974, Aragón and Pecora 1975, Ehrenberg and Rigler 1976, Eigen and Rigler 1994, Rigler 1995).

Der dafür eingesetzte FCS-Reader stellt im Grunde ein konfokales Mikroskop dar, das die Diffusion von fluoreszierenden Teilchen abhängig von der Molekülgröße, Temperatur und Viskosität der Flüssigkeit misst. Dabei wird Laserlicht auf ein Fokusvolumen von 1fl fokussiert. Wahlweise kann man mit einem oder zwei Lasern mit unterschiedlichen Wellenlängen sowie mit stationärem oder mobilem Laserfokus messen. Die dadurch angeregten einzelnen Fluorophore in der Lösung senden Photonen entsprechend ihres Emissionsspektrums aus, die von einem hochempfindlichen Detektor erkannt werden. Über verschiedene Auswertungsverfahren (*Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)*, *Fluorescence intensity distribution analysis (FIDA)* und *Scanning for intensely fluorescent targets (SIFT)*) können die Diffusionszeit, Helligkeit, Partikelzahl und Partikelgröße der einzelnen Teilchen berechnet werden. Bei simultaner Anregung von zwei verschiedenen Fluoreszenzmarkern über zwei Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen (dual colour) und überlagertem Fokus erhält man Informationen über die Emission von unterschiedlich emittierenden Teilchen. Man kann aber auch Analysen über Interaktionen von unterschiedlich fluoreszierenden Partikeln machen. Ein weiterer Vorteil der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie gegenüber anderen Proteinanalytikmethoden besteht darin, dass geringe Proteinkonzentrationen sogar im subpikomolaren Bereich erfasst werden können (Schwille, Bieschke et al. 1997). Eine genaue Beschreibung des Aufbaus, der Funktion und der einzelnen Analyseverfahren der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie findet sich in Kapitel D Material und Methoden, D3.

### 5.1 Anwendung bei neurodegenerativen Erkrankungen

Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankung entstehen histopathologisch identifizierbare Aggregate, die meist nur in sehr geringer Konzentration vorliegen. Eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Tauopathien oder Synucleinopathien wird den Aggregationsprozessen niedermolekularer Proteinoligomere zugeschrieben. Mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie konnten in den letzten Jahren die Entwicklung und Zusammensetzung dieser pathogenen Ablagerungen genauer untersucht werden. Insbesondere große, seltene und helle Teilchen lassen sich schlecht durch einen Fokusdurchtritt detektieren, da sie eine geringe Diffusionsgeschwindigkeit besitzen. Hier bietet

das Scannen der Probe (SIFT-Technik) große Vorteile und erhöht die identifizierte Teilchenzahl gegenüber der Messung mit einem statischen Laserfokus (Bieschke, Giese et al. 2000, Giese, Bieschke et al. 2000).

Der Entstehungsprozess von Proteinaggregaten und den als pathogen angesehenen Oligomeren bei neurodegenerativen Erkrankungen kann *in vitro* mit aufgereinigten Proteinen im Zweifarbsatz (mit Hilfe rot und grün anregbarer Fluoreszenzmarker) auf Einzelmolekülebene genauer beschrieben werden. Die kleineren Oligomere stellen pathophysiologisch als definierte Aggregationszwischenform die relevante Aggregat-Spezies bei diesen Erkrankungen dar und können nach Fluoreszenzmarkierung in der FCS und im SIFT-Verfahren analysiert werden. Compound Screening von pharmakologisch interessanten Oligomermodulatoren bei neurodegenerativen Erkrankungen können in der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie im Hochdurchsatzverfahren schnell und mit geringem Substanzverbrauch durchgeführt werden. 2013 konnte erfolgreich ein solcher Modulator (Anle138b) identifiziert werden, der die Aggregatbildung pathologischer Oligomere von Prion-Proteinspezies und  $\alpha$ -Synuclein *in vitro* und *in vivo* inhibiert (Giese, Bertsch et al. 2011, Wagner, Ryazanov et al. 2013).

Diese erfolgreichen zweifarbigen Molekülanalysen bildeten die experimentelle Grundlage, um ähnliche Interaktionsstudien zwischen Wildtyp Desmin und Desminmutanten in einem Zellkultursystem zu etablieren.

## C Ziele der Arbeit

Strukturelle Veränderungen des Desmin-Intermediärfilamentgerüsts sind ein wesentliches histopathologisches Merkmal primärer Desminopathien. Die molekularen Ereignisse, die zur Fehlregulation der Desminfilamentbildung und Desminproteinaggregation führen, sind bisher nur unzureichend untersucht worden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten drei humanpathogene Mutanten mit unterschiedlicher Lage im Desmingen untersucht werden (siehe Abbildung 30). Die drei Punktmutationen befinden sich im C-terminalen Teil von Desmin, jedoch in unterschiedlichen funktionellen Domänen des Proteins. Alle drei korrelieren mit unterschiedlich ausgeprägten klinischen Phänotypen (siehe 3.2) und zeigten außerdem ein differenziertes Filamentassemblierungsverhalten sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene: R350P bildete große Aggregate aus, die hauptsächlich aus dimeren Proteinen bestehen. E413K Desmin lag ebenfalls in Aggregaten vor, allerdings waren diese kleiner, zahlreicher und weit verteilt im Cytoplasma. R454W als „tail“ Punktmutation bildete zwar ein dem Wildtyp ähnliches Filamentnetzwerk aus, zeigte jedoch Veränderungen bei der Dimer- und Tetramerbildung auf molekularer Ebene. Diese Untersuchungen wurden sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch Einzelmolekülspektroskopisch mit Hilfe von GFP-Desminfusionsproteinen durchgeführt (Levin, Bulst et al. 2010).

In Patienten liegen pathogene Desminmutationen heterozygot im Skelett- und Herzmuskel vor. Daher ist anzunehmen, dass physiologisch-funktionelles Desmin neben mutiertem Desmin in Muskelzellen *in vivo* exprimiert wird. Die zentrale Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines geeigneten *in vitro*-Systems, um diese Situation zu simulieren und auf molekularer und zellbiologischer Ebene zu validieren.

Neben den gut etablierten GFP-Desminvarianten sollte ein zweites geeignetes fluoreszenzes Protein als Desminfusionstag identifiziert werden, das in Koexpressionsexperimenten im roten Spektralbereich angeregt werden konnte. Dieser neu zu etablierende Desmin-Fluoreszenzmarker sollte in innovativen Zweifarbensätzen zusammen mit GFP-Desminvarianten dazu dienen, Mutanten und Wildtyp-Desmin sowohl in der Fluoreszenzmikroskopie als auch in der Einzelmolekülspektroskopie qualitativ und quantitativ zu unterscheiden.

Im Einzelnen war die Bearbeitung und Lösung folgender Teilaufgaben erforderlich:

- \* Generierung geeigneter eukaryontischer Desmin-Expressionskonstrukte mit einem fluoreszenten Fusionstag, das im roten bzw. nah-infraroten Spektralbereich anregbar ist
- \* Ausschluss einer Störung der physiologischen Desminfilamentassemblierung auf molekularer und zellulärer Ebene durch das neue fluoreszente Protein
- \* Optimierung der Transfektion und Koexpression mit GFP-Desminvarianten
- \* Überprüfung der äquimolaren Expression von beiden Expressionskonstrukten

- \* Charakterisierung und Quantifizierung der Anregbarkeit im roten bzw. nah-infraroten Spektralbereich
- \* Überprüfung der Anregbarkeit über Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zur quantitativen Analyse der Architektur von gemischt-zweifarbigem Desmin-Multimeren, sowie Filamenten und Aggregat-Spezies
- \* Validierung der Expression in verschiedenen Zellkultursystemen
- \* Etablierung und Charakterisierung von konditionell immortalisierten murinen Zelllinien bestehender Desminopathie-Mausmodelle (Desmin Knockout und Knockin der humanen R350P Desminmutante) zur erweiterten Validierung der Resultate des Zweifarbensatzes.

Diese einzigartige experimentelle Strategie auf molekularer und zellbiologischer Basis sollte dazu dienen, initiale molekulare Mechanismen auf der Ebene der Desmin-Multimerbildung und -Filamentassemblierung *in vitro* besser zu verstehen und die Rolle pathogener Desminvarianten detaillierter zu definieren, die sich auf die *in vivo*-Situation in Patienten übertragen lassen, um kausale, translationale Therapieansätze zu identifizieren.

## D Material und Methoden

### 1 Chemikalien

Alle Chemikalien besaßen die höchste kommerziell erhältliche Reinheit. Die Bezugsquellen, Katalognummern und genauen Sachbezeichnungen der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind im Methodenteil aufgeführt.

Allgemeine Verbrauchsmaterialien (Reaktionsgefäß, Pipettenspitzen) wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Peske (Karlsruhe, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und Greiner bio-One (Kremsmünster, Österreich) bezogen.

### 2 Molekulargenetische Methoden

#### 2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

##### 2.1.1 Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion

Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden durch die Amplifizierung von Desmin cDNA, wie auch von flankierender Plasmid-DNA, DNA-Fragmente mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR) für die Subklonierung in eukaryontische Expressionsplasmide synthetisiert.

Die Genotypisierung von Nachkommen der Maus-Zuchtlinien erfolgte über die Amplifizierung der genomischen DNA aus Schwanzbiopsien mittels PCR.

Das von Mullis entwickelte Verfahren ermöglichte die exponentielle *in vitro*-Vervielfältigung (Amplifikation) definierter DNA Abschnitte (Mullis 1990).

##### 2.1.2 PCR-Primer

Die verwendeten Primer wurden basierend auf in der Genbank veröffentlichten Sequenzen der zu untersuchenden Gene ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)) entworfen und durch Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Für die Genotypisierung wurden spezifische Primer entsprechend der genomischen DNA der zu untersuchenden Mäuse entworfen bzw. entsprechend vorgegebener Publikationen ausgewählt (Kern and Flucher 2005).

### PCR-Reaktionsbedingungen

#### 1. Standard-PCR-Mix:

Reagenzien	Volumen
Maxima™ Hot Start Green PCR Master Mix (# K1062 ThermoScientific, Rockford IL, USA )	25 µl
Forward Primer (50 pmol)	1 µl
Reverse Primer (50 pmol)	1 µl
Template DNA (1 µg/µl)	1 µl
Wasser, Nuklease-frei (#P1193 Promega, Mannheim, Deutschland)	ad 50 µl

#### 2. Standard-PCR-Mix (Polymerase mit Proofreading-Funktion):

Reagenzien	Volumen
AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase 2,5 U/µl (#12344-024 Invitrogen Darmstadt, Deutschland)	0,5 µl
10x Pfx Accu Prime Rxn Mix	5 µl
Forward Primer (50 pmol)	1 µl
Reverse Primer (50 pmol)	1 µl
Template DNA (1 µg/µl)	1 µl
Wasser, Nuklease-frei (#P1193 Promega, Mannheim, Deutschland)	ad 50 µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) durchgeführt. Um zusätzlich zur Amplifikation eine neue Restriktionsschnittstelle im PCR-Produkt einzufügen, wurden sogenannte Mismatch-Primer mit entsprechend modifizierten Basen verwendet.

Protokoll eines typischen PCR-Programms:

	Temperatur-Bsp	Zeit	Zyklen
I. Denaturierung der DNA	95°C	5 min	1
II. Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge (Melting)	95°C	30 sec	30
Anlagern der Primer (Annealing)	65°C	30 sec	
Synthese des DNA-Doppelstranges (Extension)	72°C	5 min	
III. Abschließende Extension	72°C	7 min	∞

#### 2.1.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Mittels einer Gelelektrophorese wurden die Produkte der PCR auf Ethidiumbromid-haltigen (0,5 µg/ml), 1%-igen Agarosegelen bei 120 V aufgetrennt. Die Gel-Bereiche mit den gewünschten PCR-Fragmenten wurden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Aufreinigungskits (#740609 Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) entsprechend dem Protokoll des Herstellers isoliert.

### 2.1.4 Direkte Sequenz-Analyse

Die Sequenzierung der PCR-Produkte und Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) mit DNA-Sequenziergeräten der Firma Applied Biosystem (Darmstadt, Deutschland) und fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Terminatoren nach der Sanger-Methode. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend auf potentielle Mutationen untersucht. Der Vergleich mit den Wildtyp-Sequenzen erfolgte computergestützt online über den Server des National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

## 2.2 Plasmidklonierung

### 2.2.1 Klonierung von Desmin-GFP Plasmiden

Die Desmin GFP Konstrukte lagen bereits im Labor vor und wurden bei Levin *et al.* beschrieben (Levin, Bulst et al. 2010).

In den Vektor pEGFP-N1 von BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA, USA) wurde die humane Desmin-cDNA über die Restriktionsstellen *Age*I und *Not*I einkloniert. Über ortsgerichtete Mutagenese wurden drei Konstrukte mit den Missensemutationen R350P, E413K und R454W als C-terminale GFP-Fusionsproteine generiert.

Vorhandene Plasmidkonstrukte:

wt Desmin-GFP-N1  
R350P Desmin-GFP-N1  
E413K Desmin-GFP-N1  
R454W Desmin-GFP-N1

### 2.2.2 Klonierung von Desmin-mKate2 Plasmiden

#### 2.2.2.1 Der Expressionsvektor pmKate2-N

Der von der Firma evrogen kommerziell erhältliche pmKate2-N Vektor (#FP182 evrogen, Moskau, Russland) diente als eukaryontisches Expressionsplasmid für das Fusionsprotein Desmin-mKate2 (Shcherbo, Murphy et al. 2009). Für die Klonierung lag der Vektor durch Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Age*I linear vor.

#### 2.2.2.2 Amplifikation der humanen Desmin-cDNA

Die cDNAs von Desmin und die drei verwendeten Desminmutanten wurden aus dem im Labor vorhandenen Desmin-pEGFP-N1 Plasmid für Wildtyp Desmin- und den mutierten Desminvarianten mittels folgender Primer amplifiziert:

Forward Primer: *Xho*I\_sense\_mKate2: 5'-tattactcgagccaccatggcccaggcc-3'

Reverse Primer: *Age*I\_as\_mKate2: 5'-aatataccggccgagcacttcatgctgctg-3'.

Nach einer Gelaufreinigung und einem Doppelverdau des Inserts mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Age*I wurden die cDNAs von Desmin und den drei Desminmutanten mit den neu eingeführten Restriktionsstellen *Xho*I am 5'- und *Age*I am 3'-Ende erzeugt.

Erhaltene Plasmidkonstrukte:

wt Desmin-mKate2-N1  
R350P Desmin-mKate2-N1  
E413K Desmin-mKate2-N1  
R454W Desmin-mKate2-N1

### 2.2.3 Klonierung von Desmin-PSmOrange Plasmiden

#### 2.2.3.1 Der Expressionsvektor pPSmOrange-N1

Der über Addgene bezogene Vektor pPSmOrange-N1 wurde über ein Material transfer agreement von Prof. Dr. Vladislav Verkhusha (Albert Einstein College of Medicine, New York, USA) zur Verfügung gestellt (Subach, Patterson et al. 2011). Für die Klonierung von Desmin-PSmOrangeN1 wurde das Plasmid mit *Age*I und *Xho*I verdaut und lag somit linear vor.

#### 2.2.3.2 cDNA von Desmin-pEGFP-N1 als Insert

Bei dieser Klonierung wurden die gleichen Amplicons von Desmin verwendet, wie im Desmin-mKate2 Konstrukt.

#### 2.2.4 Ligation

Die Ligation der vorhandenen linearen Plasmide pmKate2-N und pPSmOrange-N1 mit den Inserts cDNA Desmin-wt, Desmin-p.R350P, Desmin-p.E413K und Desmin-p.R454W erfolgte mit einer T4-DNA-Ligase (#M0202S NEB, Ipswich, MA, USA) entsprechend den Herstellerangaben bei 14-20°C isoliert in einer Styroporbox über Nacht.

#### 2.2.5 Transformation in kompetente Bakterienzellen

Die Transformation von Desmin-mKate2 erfolgte in kompetente DH5 $\alpha$  *E.coli*-Bakterien von Invitrogen, die Transformation von Desmin-PSmOrange in Oneshot®Top10 chemically competent *E.coli* (#C4040-06 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Beide Transformationen erfolgten über die Hitzeschockmethode bei 42°C für 45 sec.

#### 2.2.6 Bakterienkultur

Die transformierten Bakterienkulturen wurden im LB- (lysogeny broth) Medium mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz (Kanamycin 50 µg/ml) bei 37°C auf einem Schüttler über Nacht kultiviert, sodass die rekombinante DNA vervielfältigt wurde.

### 2.2.7 Isolierung der Plasmid DNA

Die rekombinante DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, #27104, Hilden, Deutschland) aus 2 ml Bakterienkultur aufgereinigt und anschließend zur Kontrolle direkt sequenziert. Präparative Mengen an Plasmiden aus einer 200 ml-Bakterienkultur wurden mit Hilfe des NucleoBond®PC 500 Maxi Prep Kit von Macherey& Nagel, Düren, Dtl (#740574) extrahiert. Die Isolierung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

### 3 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Um die Pathologie und den Mechanismus von kotransfizierten Desminaggregaten auf molekularer Ebene zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die konfokale Einzelmolekülspektroskopie eingesetzt, vor allem die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl. „fluorescence correlation spectroscopy“, *FCS*), die Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-analyse (engl. „fluorescence intensity distribution analysis“, *FIDA*) und das Scannen nach intensiv fluoreszierenden Zielstrukturen (engl. „scanning for intensely fluorescent targets“, *SIFT*). Das theoretische Konzept der FCS-, FIDA- und SIFT-Methode wurde u.a. von Schwille und Giese *et al.* beschrieben (Schwille, Bieschke et al. 1997, Schwille, Meyer-Almes et al. 1997, Kask, Palo et al. 1999, Giese, Bieschke et al. 2000, Kask, Palo et al. 2000, Bacia and Schwille 2003). Im Folgenden soll das Prinzip der Messmethode und die verschiedenen Analyseverfahren dargelegt werden.

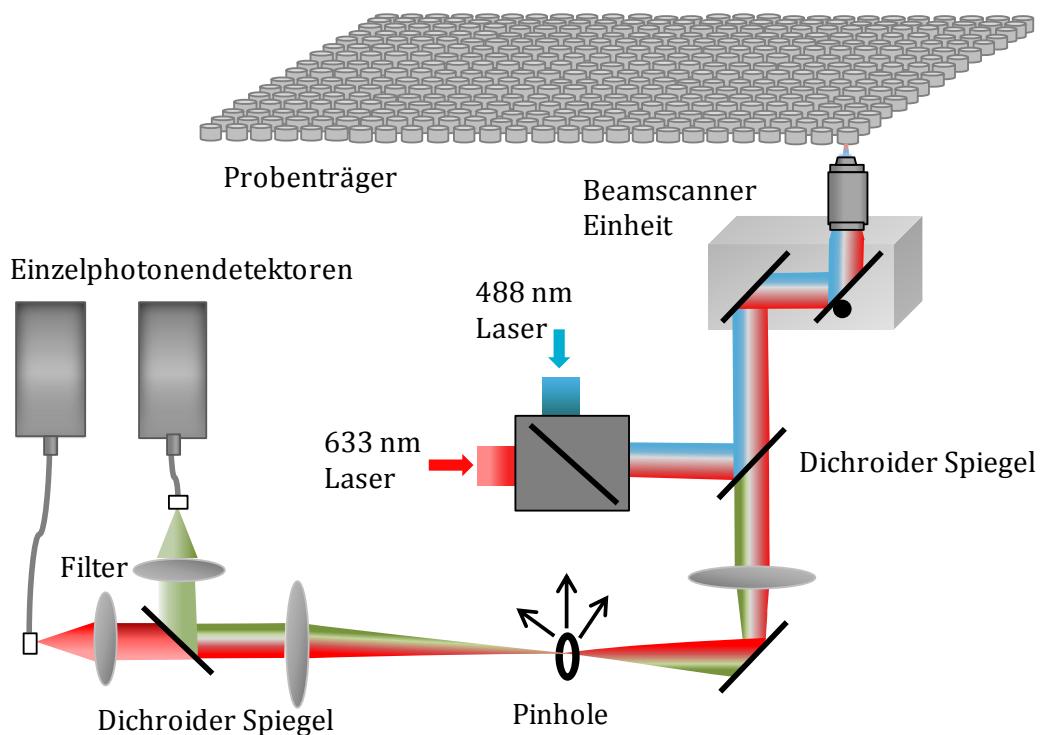
Alle Messungen der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie wurden auf einem Insight II Reader (Evotec Technologies, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

#### 3.1 Messaufbau

Der Reader stellt im Grundaufbau ein konfokales Mikroskop dar. Es wurde Laserlicht von 488 nm (Argon Ionen Laser) und 633 nm (Helium Neon Laser) in ein Probenvolumen mit einem 40x Wasserimmersionsobjektiv hoher numerischer Apertur (1,2) (Olympus, Tokio Japan) fokussiert. Eine automatische Wasserpumpe von Evotec sorgte für die notwendige Immersionswasserzufuhr. Das Fokusvolumen in der Probe betrug ca. ein Femtoliter. Die Anregung erfolgte mit einer Laserleistung von 200  $\mu\text{W}$  bei 488 nm und 300  $\mu\text{W}$  bei 633 nm. Die in dem Insight II Readern verwendeten 384-Well Probenträger (#781856, Greiner bio-ONE) fassten pro Well ein Volumen von jeweils 20  $\mu\text{l}$ . Der Laserfokus befand sich 150  $\mu\text{m}$  über dem Glasboden des Probenträgers in der Messlösung und wurde mit einer über Spiegel mechanisch zuschaltbaren Videokamera optisch eingestellt. Das offene Messvolumen der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie wurde aus dem Brennpunkt der beiden Laser gebildet. Der Radius des roten (633 nm) Fokus war etwas größer als der des grünen. Trotz einer minimalen Abweichung der Mittelpunkte beider Laserfoci von ca. 50 nm, bildete die optische Apparatur aber den grünen Laserfokus vollständig innerhalb des roten Fokus ab. Die nach Anregung der fluoreszierenden Partikel im Lasermessfokus emittierten Photonen wurden gegenläufig zum Anregungsweg über zwei dichroische Spiegel und eine Lochblende (engl. pinhole, Durchmesser 70  $\mu\text{m}$ ) auf zwei Einzelphotonendetektoren (sog. Avalanche-Photodioden, APD) getrennt geleitet (siehe Abbildung 12).

Dadurch war es möglich, das Fluoreszenzsignal in zwei Kanälen separat voneinander, aber parallel zueinander aufzuzeichnen und auszuwerten. Die APDs lagen bis 1000 kHz Gesamthelligkeit ( $I_{\text{tot}}$ ) in einem Bereich, in dem sie lineare Messergebnisse lieferten. Um nicht

in die Totzeit der Detektoren (>3000 kHz) zu gelangen und um eine gute Auswertbarkeit der Messungen zu gewährleisten, sollte dieser Bereich der Gesamthelligkeit nicht überschritten werden. Es bestand die Wahl zwischen einem stationären und einem mobilen Fokus (engl. Beamscanner). Die Frequenz des mobilen Fokus betrug 50 Hz, die Länge des Scan-Pfades 100  $\mu\text{m}$  und die Distanz des Probentischvorschubs 2000  $\mu\text{m}$ . Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Einzelmessungen über zehn Sekunden. Die Temperatur während der Messungen betrug ca. 21°C. Über die Software FCS+Plus\_Control konnten die hochpräzisen Motorsteuerungssysteme und Mikroschrittmotoren für den Probenträgertisch, die Positionen der Laserfoci und der Lochblende am Insight Reader gesteuert werden.



**Abbildung 12 Messaufbau des Insight Readers.**

Die Laserstrahlen (488 nm / 633 nm Wellenlänge) wurden mit einem dichroiden Spiegel vereint und in das Messvolumen geleitet. Das Laserlicht wurde über einen dichroiden Spiegel, der nur Licht der Wellenlänge 488 nm und 633 nm durchlässt, reflektiert und über die Optik eines konfokalen Mikroskops in das Probenvolumen geleitet. Das von den angeregten Fluorophoren emittierte Signal wurde auf gleichem Wege zurückgeleitet, über einen zweiten dichroiden Spiegel getrennt und von zwei Photodetektoren aufgezeichnet. Für die Reduktion unspezifischer Hintergrundsignale wurden mehrere Filter sowie eine Lochblende (Pinhole) in den Strahlengang eingearbeitet. Durch Zuschalten der Beamscanner Funktion konnte der Fokus in gleichbleibender Höhe durch das Messvolumen mäandrieren, was die Detektion seltener, großer Aggregate ermöglichte.

### 3.2 Einstellung und Eichung

Vor jedem Messdurchgang wurde der Messaufbau mit Hilfe eines standardisierten Protokolls justiert und so für jede einzelne Messung gleichbleibende Versuchsbedingungen geschaffen.

Für eine konstante Laserleistung benötigten die verwendeten Laser vor der Justierung eine Aufwärmphase von 30 min. Die Anregungsintensität der Laser im Fokus wurde über ein Powermeter gemessen und mittels eines manuell einstellbaren Filtersystems auf 200  $\mu\text{W}$  Laserleistung für den Argon Laser bei 488 nm und auf 300  $\mu\text{W}$  für den Helium Neon Laser bei 633 nm justiert. Anschließend wurde die Justagelösung in ein Probenwell gegeben, die unkonjugiertes Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 647 mit bekannten konstanten Farbstoffparametern enthielt. Die entscheidenden Parameter zur optimalen Einstellung der Fokusabbildung waren CPP (engl. „counts per particle“), die ein Maß für die Helligkeit der einzelnen Farbstoffmoleküle unabhängig von der Farbstoffkonzentration darstellt, sowie die Diffusionszeit ( $T_{\text{diff}}$ ) der Farbstoffmoleküle, mit der sich die Abbildungsschärfe des Lasermessfokus bestimmen lässt.

Über eine zuschaltbare Kamera wurde die Position des Laserfokus auf 150  $\mu\text{m}$  oberhalb des Glasbodens der 384-Well-Platte eingestellt.

Die Messzeit betrug 10 sec pro Einzelmessung. Für gescannte Messungen wurde die Länge des „Scan-Pfades“ auf 100  $\mu\text{m}$ , die Frequenz des mobilen Fokus (Beamscanner) auf 50 Hz und die Distanz der Probentischvorschubs auf 2000  $\mu\text{m}$  festgesetzt. Daraus resultierte eine Geschwindigkeit von  $v_{\text{scan}} = 2000\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 50 \text{ Hz} = 10 \text{ mm/sec.}$ , mit die der Messfokus durch die Probe scannt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

### 3.3 Analyseverfahren

Durch den Ein- und Austritt fluoreszenzmarkierter Partikel im Lasermessfokus wurden Fluoreszenzsignale im stationären oder mobilen Messfokus detektiert. Diese ließen sich durch die Analyseverfahren FCS (*Fluorescence correlation spectroscopy*), FIDA (*Fluorescence intensity distribution analysis*) und SIFT (*Scanning for intensely fluorescent targets*) auswerten.

Zur Analyse der ermittelten Daten stand als Software FCSP+Plus Evaluation Software Version 2.0 (Evotec Technologies) zur Verfügung (Evotec 2001).

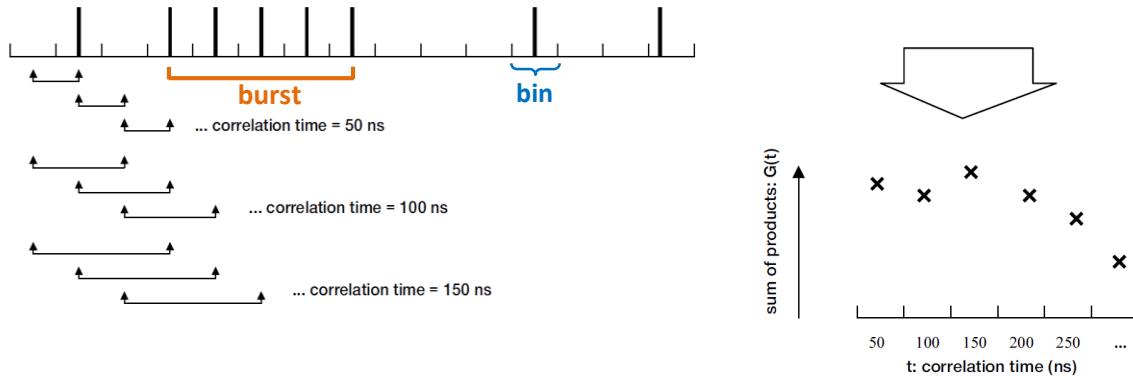
#### 3.3.1 Autokorrelation

Das mathematische Modell der Autokorrelation diente dazu, die Fluoreszenzsignale von Partikeln im Fokus von Hintergrundsignalen zu extrahieren und zu identifizieren.

Bei Messungen mit einem stationären Fokus wird die Signalfliktuation über die Zeit durch die Korrelationsfunktion  $G(t)$  charakterisiert. Diese Funktion zeigt die Selbstähnlichkeit eines Signals zum Zeitpunkt  $t$  mit dem Signal des Zeitpunkt  $t+\tau$  auf.

Die Messzeit der Einzelmessung wurde in sogenannten „bins“ (Zeitscheiben) mit 50 ns unterteilt. In diesen Zeitfenstern kann ein Photon detektiert werden oder nicht, sodass dem einzelnen bin der Zahlenwert 1 oder 0 zugeordnet wurde. Somit entstand eine Zahlenreihe aus aufeinanderfolgenden Einsen und Nullen, wobei 1 = „mindestens ein Photon detektiert“ und 0 = „kein Photon detektiert“ beschreibt, die in Zeiteinheiten von 50 ns gemessen werden. Für die Autokorrelationsanalyse wurde der jeweilige Wert jeder Zeitscheibe mit dem Wert einer weiteren Zeit multipliziert, die in Zeitabständen aus dem Vielfachen des kleinsten Abstandes von 50 ns entfernt lag. Diese Zeitabstände wurden als Korrelationszeiten bezeichnet (siehe Abbildung 13). Über den gesamten Datensatz wurden die bins mit verschiedenen Korrelationszeiten, die sich von 50 ns bis zu mehreren Sekunden erstreckten, multipliziert und das Ergebnis wurde konsekutiv für jede Korrelationszeit addiert. Mittels der entstandenen Autokorrelationsfunktion konnte somit zwischen einem burst und einem andauernden oder zufällig verteilten Signal unterschieden werden. Weiterhin erhielt man über diese Analyse Aussagen über Dauer und Häufigkeit eines bursts, die auf Anzahl und Diffusionszeit der emittierenden Teilchen schließen lässt.

Zudem wurden die Werte der pro Korrelationszeit detektierten Photonen auf die mittlere Häufigkeit normiert. An das beschriebene Autokorrelogramm wurde eine mathematische „Fit“-Kurve in einem iterativen Prozess angepasst (engl. „fitting“) (siehe Abbildung 13).



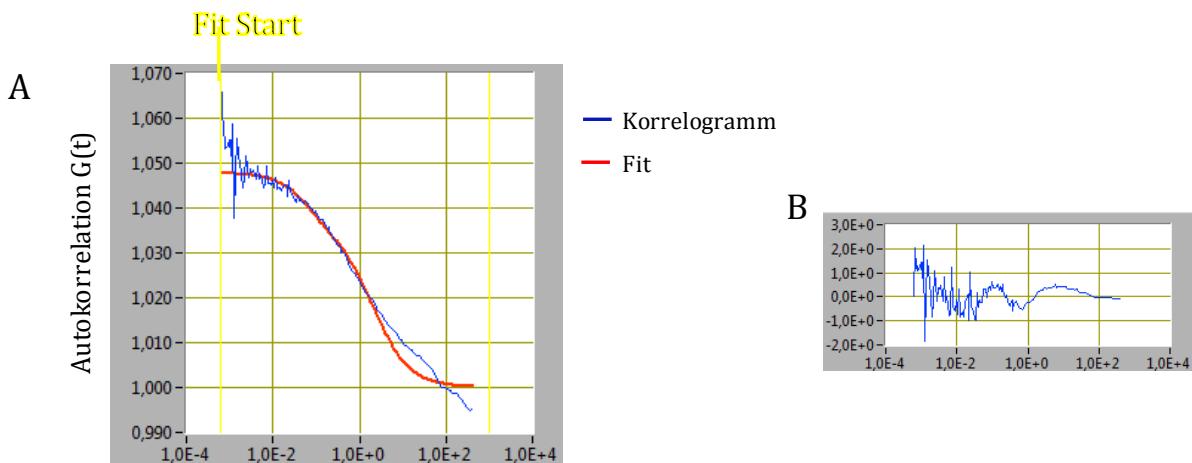
**Abbildung 13 Grundprinzip der Autokorrelations-Analyse.**

Die Zeitachse wurde in bins zu je 50 ns unterteilt. Die senkrechten Balken stellen gemessene Photonen dar. Beispielhafte Korrelationszeiten von 50, 100 und 150 ns sind gekennzeichnet. Rechts sind die gemessenen Ereignisse je Korrelationszeit aufgetragen.

Ein burst stellt das Zeitintervall für den Durchtritt eines fluoreszierenden Partikels durch den Fokus dar (Evotec 2001).

Aus dem Autokorrelogramm konnten verschiedene Parameter wie die durchschnittliche Diffusionszeit der Partikel ( $T_{\text{diff}}$ ), die mittlere Helligkeit der einzelnen Teilchen (CPP, engl. „counts per particle“) und die mittlere Partikelzahl im Lasermessfokus (N) errechnet werden. Die Abweichung zwischen den Autokorrelationsdaten und dem Fit wurde als Residualkurve dargestellt (siehe Abbildung 14B). Um die Anpassungsgüte (goodness of fit) zu überprüfen, wurde der Parameter Chi<sup>2</sup> herangezogen, der sich aus der Summe der durch die erwarteten Häufigkeiten

geteilten quadrierten Differenzen zwischen den beobachteten und erwarteten (theoretischen) Häufigkeiten der Signale berechnet. Die Gesamthelligkeit ( $I_{tot}$ ) entspricht dabei der mittleren Photonenanzahl (angegeben in kHz) aus der gesamten Messzeit und geht direkt als erfasste Größe aus der Messung hervor. CPP berechnet sich aus der Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals pro Anzahl der Partikel. Somit ließ sich die Güte der Justage zwischen den verschiedenen Messtagen vergleichen. Ein weiterer Parameter, der die Eigenschaft verschiedener Partikel beschreibt, ist die Diffusionszeit ( $T_{diff}$ ). Mit Hilfe der Diffusionszeit war es möglich, die ungefähre Masse der gemessenen Partikel zu berechnen. Für kugelförmige Partikel gleicher Dichte, was den Proteinmolekülen näherungsweise entspricht, besteht dabei die Möglichkeit, die Größe bzw. das Molekulargewicht (MW) mit Hilfe der Formel  $T_{diff} \sim \sqrt[3]{MW}$  aus der Autokorrelationsfunktion einzuordnen. Somit entsprach beispielsweise eine Verdoppelung der Diffusionszeit im Vergleich zweier Partikelspezies einer achtfach größeren Masse. Im Rahmen von Proteinaggregationsstudien konnte somit die Anzahl der Monomere, aus denen sich ein Proteinaggregat zusammensetzte, näherungsweise bestimmt werden. Konkret nimmt im Verlauf von Aggregationsprozessen die Diffusionszeit und die CPP der Partikel zu, die Partikel- bzw. Teilchenzahl (N) sinken, womit ein weiterer entscheidender Parameter der FCS-Auswertung genannt ist. Nach Einführung einer Normalisierungskonstante entsprach die Partikelzahl (N) der inversen Amplitude der Autokorrelationsfunktion.



**Abbildung 14 Autokorrelogramm und Residualkurve einer FCS Messung.**

**A** Typisches Autokorrelogramm einer FCS-Messung. Die Y-Achse zeigt die Autokorrelationswerte und die X-Achse die Korrelationszeiten in msec. Mit der roten Kurve ist der Fit dargestellt. **B** Qualitätskontrolle des Fits durch die Residualkurve, welche die Abweichung des Autokorrelogramms vom Fit darstellt.

Das Software Modul FCSPP Evaluation erlaubte auch, das gewonnene Fluoreszenzsignal aus der Messlösung nicht nur mit einer Partikelspezies zu beschreiben bzw. zu fitten, sondern auch verschiedene, in der Messprobe vorkommende Molekülspezies zu erkennen und zu berechnen. In einem sog. Mehrkomponenten-Fit lieferte die Software für jede Komponente den relativen Anteil an der Gesamtmenge der Partikel (in %) und eine entsprechende eigene Diffusionszeit (Ehrenberg and Rigler 1976, Schwille, Bieschke et al. 1997, Meseth, Wohland et al. 1999, Evotec 2001, Bacia and Schwille 2003, Haustein and Schwille 2003).

### 3.3.2 FIDA

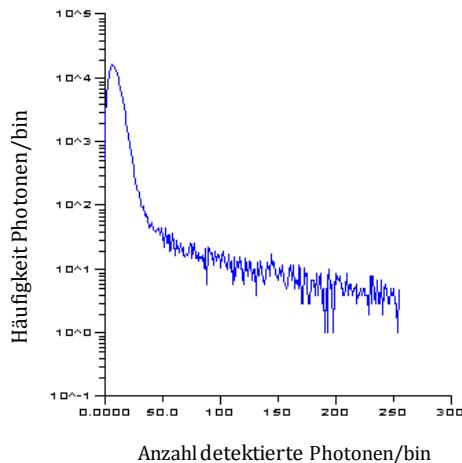
FIDA (Fluorescence Intensity Distribution Analysis) kann die spezifische Helligkeit von fluoreszierenden Einzelmolekülen in einer heterogenen Probe erfassen. Bei dieser Analyse wird die Einzelmessung im konfokalen Messaufbau in Zeitintervallen (bin) von  $40 \mu\text{s}$  aufgeteilt und die Photonenzahl bezogen auf die bins statistisch ausgewertet.

In einem Intensitätsverteilungshistogramm werden die Anzahl der pro Zeitintervall detektierten Photonen und die Häufigkeit dieser Ereignisse dargestellt (siehe Abbildung 15). Über einen anschließenden 1D FIDA-Multikomponenten-Fit ist es möglich, die einzelne Partikelspezies, die eine charakteristische, von den anderen Spezies zu unterscheidende Fluoreszenzintensität aufweist, im jeweiligen Kanal zu identifizieren. So können bei der FIDA bis zu vier Komponenten gleichzeitig erkannt werden, die sich in ihrer spezifischen Helligkeit  $q_x$  [kHz] und Konzentration im Fokus (mittlere Anzahl der Partikel im Fokus  $c_x$ ) unterscheiden lassen. Zusammen ergeben sie eine Gesamtfluoreszenzintensität  $I_{\text{total}}$ , die sich folgendermaßen errechnet:

$$\begin{aligned} I_{\text{total}} &= I_1 + I_2 + I_3 + \dots \\ &= c_1 q_1 + c_2 q_2 + c_3 q_3 + \dots \end{aligned}$$

Die in der FIDA gemessene spezifische Helligkeit  $q_x$  entspricht der CPP in der Autokorrelationsanalyse und die spezifische Konzentration  $c_x$  der Teilchenzahl N im FCS.  $\chi^2$  dient hier, wie in der Autokorrelationsanalyse, als Qualitätswert für die Übereinstimmung der einzelnen Daten mit dem Fit. Der Wert von  $\chi^2$  sollte für einen guten Fit bei 1 liegen, kann jedoch in einer heterogenen Reaktionslösung bis zu 10 erreichen. Abweichungen vom Fit werden ähnlich wie in der Autokorrelationsanalyse als Residualkurve dargestellt und sollten um 0 liegen.

Die FIDA kann bei gescannten und ungescannten Messungen angewendet werden. In dieser Arbeit wurden gescannte Messungen über FIDA analysiert, um fluoreszierende größere Moleküle mit unterschiedlicher Intensität bzgl. der Konzentration und der spezifischen Helligkeit zu erfassen.



**Abbildung 15 Intensitätsverteilungshistogramm einer FIDA.**

Die X-Achse stellt die gemessenen Photonen pro Zeiteinheit (40  $\mu$ sec) dar, die Y-Achse gibt die auftretende Häufigkeit des Signals wieder. In dieser Analyse wurden Moleküle mit bis zu 250 Photonen pro bin detektiert.

Eine zweidimensionale FIDA (2D FIDA) ermöglicht die gleichzeitige Analyse der spezifischen Helligkeit aus dem roten und dem grünen Detektionskanal von fluoreszierenden Partikelspezies. Die Messmethode ergibt eine gemeinsame Statistik der Photonenzahlen aus beiden Detektoren, die im Zeitfenster von 40 $\mu$ sec erfasst werden.

Die gesamte Fluoreszenzrate  $I_{\text{total}}$  setzt sich aus den einzelnen Intensitäten der Partikelspezies zusammen, die wiederum auf zwei Detektoren [grün (ch1) und rot (ch2)] aufgeteilt sind:

$$\begin{aligned} I_{\text{total}} &= I_1 + I_2 + \dots \\ &= [I_1 (\text{ch1}) + I_1 (\text{ch2})] [I_2 (\text{ch1}) + I_2 (\text{ch2})] \\ &= c_1 * [q_1 (\text{ch1}) + q_2 (\text{ch2})] + c_2 * [q_1 (\text{ch1}) + q_2 (\text{ch2})] + \dots \end{aligned}$$

Anhand der beiden Fluoreszenzhelligkeitswerte aus beiden Detektoren und deren Konzentrationen können die einzelnen Spezies bestimmt werden. Die erhaltenen Rohdaten können in einem 2D Verteilungshistogramm dargestellt werden (Evotec 2001).

### 3.3.3 SIFT2D (Scanning for Intensely Fluorescent Targets)

Das Auswertungsverfahren SIFT2D ist durch die erhöhte Signalsensibilität ein wichtiges Softwaretool zur Analyse von hellen, großen und zweifarbigen Partikeln in subpicomolarer Konzentration, wie Aggregatspezies mit hochintensem Fluoreszenzsignal. Die Software SIFT2D beruht auf den Ergebnissen der 2D FIDA Analysen, bei welchen die gemessenen Fluoreszenzsignale in Zeitintervallen (bins) von 40  $\mu$ sec unterteilt werden. Sie analysiert also, in

wie vielen bins welche Anzahl an Photonen gemessen wurde. Sowohl kleine als auch größere Partikel werden aufgrund des Scannens zum selben Zeitpunkt im Fokus gemessen. Die hochintensen Fluoreszenzsignale von mehrfach markierten, großen Partikeln, wie Aggregatteilchen, erlauben als direktes Maß eine Quantifizierung ihrer Partikelkonzentration. Des Weiteren addiert das Programm alle gemessenen Photonen zur Gesamthelligkeit ( $I_{total}$ ) der Probe auf. Da große Partikel heller sind als kleine, kann nun die Gesamthelligkeit auf die spezifische Helligkeit von vier Partikeltypen aufgeteilt werden, die sich aus der Zahl der emittierten Photonen pro Partikelart ( $q$ ) und deren Konzentration ( $c$ ) zusammensetzt:

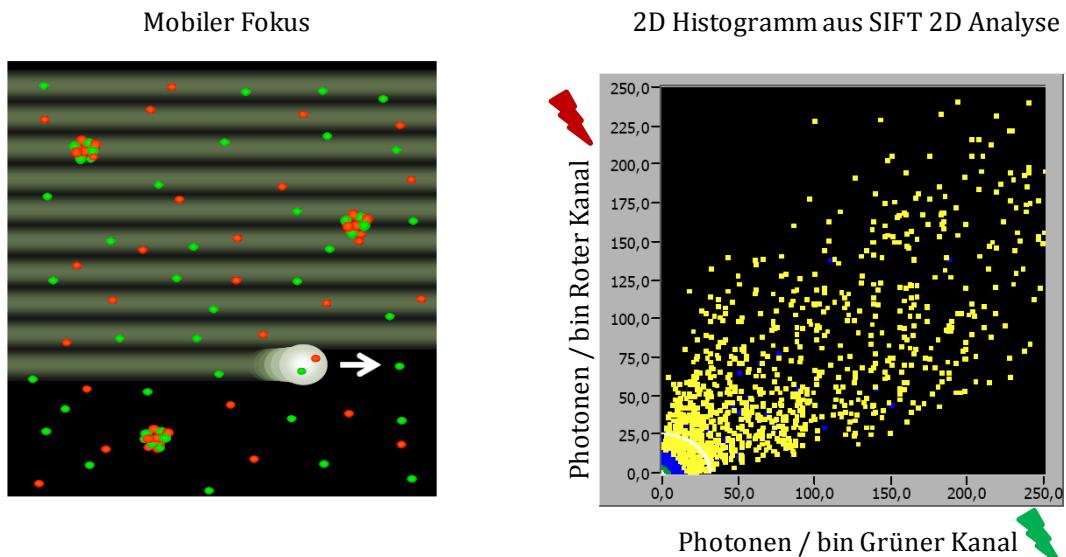
$$I_{total} = I_1 + I_2 + I_3 + I_4 = c_1 * q_1 + c_2 * q_2 + c_3 * q_3 + c_4 * q_4$$

Diese Analyse erfolgt analog zur Autokorrelation anhand eines Fits, bei dem die Zahl der zu ermittelnden Partikeltypen frei gewählt werden kann und dessen Qualität sich im Wert Chi<sup>2</sup> widerspiegelt.

Der limitierende Faktor von seltenen und großen Aggregatpartikeln ist deren langsame Diffusionsgeschwindigkeit und beruht auf der Beschaffenheit der Partikel. Für die Detektion dieser langsam diffundierenden, picomolar konzentrierten Teilchenart wären im stationären Fokus längere Messzeiten erforderlich, bis der Fokus einmal passiert würde. Der limitierende Faktor für die Detektion großer Aggregate, die Diffusionszeit ( $T_{diff}$ ), wird umgangen, indem die Proben gescannt gemessen werden (mobiler Fokus). Durch den mobilen Fokus kann in einer Intensitätsverteilung das hochintense Signal der mehrfach markierten Zielmoleküle vom Hintergrundsignal analytisch abgetrennt werden.

Im Detail werden die FIDA Daten aus der SIFT 2D Analyse in einem zweidimensionalem Verteilungshistogramm („*scatter plot*“) qualitativ dargestellt, das die aufsummierten Photonen/bin (Photonen pro Zeitscheibe) entsprechend aus den roten und grünen Detektionskanälen farbkodiert für die Häufigkeit darstellt (siehe Abbildung 16).

Ein Intensitätsschwellenbereich („*threshold*“) kann definiert werden, um die Signale der wenig intensen Spezies wie Monomere von den hochintensen helleren Multimeren auszuschließen und die größeren Aggregate besser quantifizieren zu können. Das Histogramm kann in verschiedene Segmente  $n$  aufgeteilt werden. Anschließend werden die Signale der einzelnen Segmente summiert. Signale aus den Segmenten nahe der Achsen stellen einfarbige Aggregate dar, wohingegen Signale von zweifarbigem großen Partikel im Bereich um die Halbierende des Histogramms vorzufinden sind (Giese, Bieschke et al. 2000).



**Abbildung 16 Gescannte Messung verschiedener zweifarbiger Oligomerformen in einer Probe und anschließende SIFT 2D Analyse.**

Schematische Darstellung der SIFT-Messung, bei der der Laserfokus durch das Probenvolumen mäandriert und somit das in der Probe erfasste Volumen im Vergleich zu einem stationären Lasermessfokus vergrößert (linkes Bild). Die SIFT2D Analyse verwendet nun die FIDA-Daten aus beiden Kanälen: Die Abszisse zeigt die Photonen/bin im grünen Kanal auf, die Ordinate entsprechend die Photonen/bin im roten Kanal. Im zweidimensionalen scatter plot wird die Anzahl der Bins für die erfassten Photonen mit gleichen Werten im roten und grünen Kanal in ihrer Häufigkeit farbkodiert dargestellt. In diesem Histogramm erscheinen also kleine bzw. monomere Partikel nahe dem Ursprung, einfarbige Aggregate befinden sich entlang der Achsen, zweifarbige Multimere liegen in der Mitte des Histogramms. In dem verwendeten System liegt der Maximalwert an hochintensiven Signalen bei 255 Photonen pro 40  $\mu$ sec.

### 3.4 Proteinextraktion für die konfokale Einzelmolekül-spektroskopie

Für die Einzelmolekülmessungen im Insight Reader wurden transient transfizierte HEK293 Zellen so lysiert, dass das physiologisch vorliegende Desmin und Desminmultimere in der Zelle bestimmt werden konnten:

Nach der Ernte der Zellen mit einem Zellschaber in 2 ml PBS und anschließender Gewinnung des Zellpellets durch Zentrifugation (4°C, 10000x g, 10 min) wurden die Pellets in einem 1% NP40 Lysispuffer aufgeschlossen und anschließend mechanisch homogenisiert (2 ml-Spritze mit 20G-Nadel). Zum Schluss wurde das Zellhomogenat durch Zentrifugation (4°C, 10000x g, 20 min) von nichtlysierten Zellbeständen befreit.

1% NP40 Lysispuffer: 1% 40 (Nonidet P-40)  
 50mM Tris-HCl pH7,6  
 150mM NaCl  
 1mM EDTA

## 4 Photokonvertierung von PSmOrange

Um PSmOrange als Far-Red anregbares Protein im FCS Reader von Evotec einsetzen zu können, muss PSmOrange stabil und ausreichend photokonvertiert sein. Dazu wurden vier 15 cm große Schalen mit HEK293-Zellen mit einer Konfluenz von 80% für 48 h mit PSmOrange und mit JetPEI transfiziert. Entsprechend der Methode der Proteinextraktion für die konfokale Einzelmolekülspektroskopie (siehe 3.4) wurden die Zellen in insgesamt 2 ml RIPA Puffer lysiert. Als Kontrolle (Mock-Transfektion) dienten HEK293-Zellen, die mit dem Transfektionsreagenz Jet PEI® 48 h lang behandelt wurden.

Für die Photokonvertierung der orangefarbigen Form in das Far-Red Derivat wurden 1 ml Zelllysat in eine Quartz-Glasküvette (10x4 mm, Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland) überführt, die eine Röhreinheit enthielt. Die Extraktlösung wurde mit einem CW Laser mit 532 nm (3 mm Strahlendurchmesser, Verdi-V5, maximale Ausgangsleistung 5 W; Coherent, Dieburg, Deutschland) belichtet. Die Leistung des Lasers wurde auf 0,5 Watt bzw. 1 Watt eingestellt, woraus sich bei einem Spotdurchmesser von 3 mm eine Laserintensität von 5 W/cm<sup>2</sup> bzw. 10 W/cm<sup>2</sup> an der Probenlösung ergab. Die Proben wurden durch ein Kühlssystem (Chiller) an der Küvette auf 0°C gehalten und maximal für 70 min belichtet. Mit Hilfe eines Fluorimeters (Fluorolog®-3, Horiba, Kyoto, Japan) wurde die Lösung unter weiteren Röhren und Kühlen auf eine mögliche stattgefundene Photokonvertierung hin überprüft, indem die relevanten Fluoreszenzsignale (orangefarbige Form Fluoreszenzbereich 550-700 nm, Ein- und Ausgangsspaltbreite 2 nm; Far-Red Form Fluoreszenzbereich 645-800 nm, Eingangsspaltbreite 3 nm, Ausgangsspaltbreite 2 nm) bei Anregung mit 548 nm bzw. 636 nm spektralphotometrisch zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen wurden. Eine erfolgreiche Photokonvertierung wurde durch die Zunahme der Fluoreszenzintensität im Far-Red Spektrum bei gleichzeitiger Fluoreszenzabnahme im orangefarbigen Bereich bestätigt.

## 5 Zellkultur

Für die zelluläre und molekulare Analyse der Desminaggregate auf Einzelmolekülebene wurde neben der humanen embryonalen Nierenepithel-Zelllinie HEK293 die humane Nebennierenkarzinom Zelllinie SW-13 verwendet. Aus den HEK293-Zellen wurden Proteinextrakte für die Einzelmolekülspektroskopie und für den Western-Blot hergestellt. Die SW-13-Zellen dienten zur bildgebenden Darstellung des Desminfilamentnetzwerks im konventionellen Fluoreszenzmikroskop. Beide Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in DMEM-Medium (#E15-011 PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) kultiviert, das mit 10% fetales Kälberserum (#A15-101 PAA), 2 mM Glutamin (# M11-004 PAA) und 100 I.U. Penicillin/100 µg Streptomycin (Pen/Strep, #P11-100, PAA) supplementiert wurde. Die Zellen wurden beim

Splitten mit 1xPBS [Dulbecco's PBS(10x) # H15-011 PAA] gewaschen, anschließend für einige Minuten bei 37°C trypsiniert (#L11-004 PAA), in Kulturmedium resuspendiert und erneut ausplattiert.

### 5.1 Transfektion von HEK293 Zellen

Die adhärenten Zellen HEK293 wuchsen in 10 cm Zellkulturschalen an. Bei einer Konfluenz von ca. 50-60% wurden die Zellen transient mit den entsprechenden Plasmiden (co-)transfiziert. Die Transfektion wurde durch kationische Polymere des Transfektionsreagenzes JetPEI® (# 101-10N Polyplus Transfection, New York, NY, USA) ermöglicht. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet und für Proteinextrakte verwendet (siehe 3.4).

### 5.2 Transfektion von SW-13 Zellen

Die transiente Transfektion von SW-13 Zellen, die kein endogenes cytoplasmatisches Intermediärfilament (IF)-System enthalten (Hedberg and Chen 1986), erfolgte mit dem Transfektionsreagenz X-tremeGENE9® (#06365779001, Roche). Dieses Reagenz ergab die beste Transfektionseffizienz in Optimierungsexperimenten der SW-13 Zellen (siehe 3.2).

So wurden 6-Well-Platten (#657160 Greiner bio-one) mit vier Deckgläschern (10-12 mm, #P231.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland) pro Well versehen, Medium vorgelegt und die SW-13 Zellen darin ausgesät und kultiviert. Bei einer Konfluenz von 50-60% wurden die Zellen entsprechend dem Herstellerprotokoll für 48 h transfiziert.

### 5.3 Immun- und Fluoreszenzfärbung

SW-13-Zellen wurden für die Fluoreszenz- und Immunfluoreszenzfärbung von Desmin verwendet, da diese durch ihre Zell- und Cytoplasmagröße bei 100facher Vergrößerung eine optimale Auflösung der Desminfilamente ermöglichen. 48 h nach einer transienten Transfektion wurden die transfizierten Zellen für die Immunfluoreszenz mit 3,7% Paraformaldehydlösung in 1xPBS für 10 min fixiert. Es folgte eine DAPI-Färbung (4-,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride #D9542 Sigma, Stammlösung 5 mg/ml, Verdünnung 1:1000) für je 5 min und ein anschließendes dreimaliges Waschen mit 1xPBS. Die Deckgläschern wurden mit Fluorescence Mounting Medium (Dako, Glostrup, Dänemark) auf Objektträgern eingedeckt, 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und mit Nagellack am Rand versiegelt.

Die immortalisierten Mausmyoblasten wurden für die muskelspezifische Charakterisierung mit Immunfluoreszenz gefärbt (s. Anhang Antikörper). Nach der Fixierung der Zellen mit 3,7% Paraformaldehyd in 1xPBS wurden die Zellen in 1xPBS mit 0,1% Triton X-100 für 15 min permeabilisiert. Es folgte ein Waschschritt mit 1xPBS, der dreimal für 5 min wiederholt wurde.

Bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 5% Pferdeserum (Donor Horse serum # B11-124, PAA) in 1xPBS geblockt.

Der erste Antikörper wurde in der Blockierlösung verdünnt und das fixierte System wurde bei 4°C über Nacht bzw. 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal mit 1xPBS für 5 min gewaschen. Als Zweitantikörper wurden Alexa Fluor 488- bzw. AlexaFluor 594-gekoppelte Antikörper in der Verdünnung 1:500 eingesetzt, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, einmal kurz in 1xPBS gewaschen und abschließend die Zellkerne 5 min mit DAPI angefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS (5 min bei Raumtemperatur) wurden die Deckgläschchen mit Fluorescence Mounting Medium (Dako) eingedeckt, getrocknet und mit Nagellack versiegelt. Die Zellen wurden mit einem Leica Axiovert 200M (Kamera Zeiss AxioCamHRc) Fluoreszenzmikroskop konventionell mikroskopiert. Die geeigneten Filter für die grüne und rote Fluoreszenz waren I3 513808 und F-46-008 ET-Set TxRed.

## 6 Western-Blot-Analyse

### 6.1 Zellaufschluss

Für den Nachweis der transienten Desminexpression in Zellen diente ein Western-Blot von dialysierten Harnstoff-Zelllysaten. Dazu wurden die HEK293-Zellen für 48 h mit den einzelnen Desminkonstrukten (wt Desmin, R350P Desmin, E413K Desmin, R454W Desmin, wt Desmin-GFP, R350P Desmin-GFP, E413K Desmin-GFP, R454W Desmin-GFP, wt Desmin-mKate2, R350P Desmin-mKate2, E413K Desmin-mKate2 und R454W Desmin-mKate2) wie auch mit zwei unterschiedlich markierten Desminplasmiden kotransfiziert. Die Zellen wurden durch Abschaben auf Eis geerntet und anschließend bei 4°C für 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 9,5 M Harnstoff-Lösung homogenisiert und bei 37°C für 30 min zum Quellen gebracht. Nachdem die Zellen durch Scherungskräfte in einer 0,3 ml-Spritze mit einer 30 G-Nadel lysiert wurden, folgte ein Zentrifugationsschritt, um die restlichen Zellbestandteile zu entfernen. Über Nacht wurde der Harnstoff mit Hilfe von Dialyseröhrchen (#69570, Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices, 10K MWCO, ThermoScientific) bei 4°C entfernt. Der Überstand wurde für die SDS-PAGE Analyse verwendet.

Die Gesamtproteinmenge wurde spektrometrisch über Absorption im UV-Bereich bei 280 nm über das Programm „A280 Protein“ am Nanodrop (peqLab) gemessen.

Die Zelllysate enthielten 20 µg Gesamtprotein und wurden mit 6x Laemmli Puffer und destilliertem Wasser zu einem Probenvolumen von 20 µl ergänzt. Für die Proteinauf trennung wurden die Probenlösungen 5 min bei 95°C denaturiert.

**6x Laemmli Puffer:** 0,05M Tris-HCl (pH 6,8)  
0,93% DTT  
0,0012% Bromphenolblau  
10% SDS  
30% Glycerol

## 6.2 SDS-Gel/Western-Blot

Die Proben wurden auf ein 4-15% SDS-PAGE Gradientengel (Mini-PROTEAN®TGXTM Precast Gel; Bio-Rad #456-1083) geladen und die Proteine zuerst 10 min im Sammelgel bei 80 V (10 mA konst. pro Gel) und dann im Trenngel bei 120 V (20 mA konst. pro Gel) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde bei jedem Lauf eine Proteinstandardlösung aufgetragen (PageRuler Prestained Protein Ladder, #26616 Thermo Scientific). Nach der Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm, #162-0115 Biorad) unter Verwendung eines Wet-Blottingsystems transferiert (2 h bei 110 V, 4°C).

## 6.3 Ponceau S-Färbung

Mithilfe der Ponceaufärbung (Ponceau S Solution SIGMA #P7170) wurde die Effizienz des Blotting-Transfers überprüft. Dazu wurde die Membran für 1-3 Minuten in der Färbelösung [0,1% Ponceau S in 5%iger Essigsäure (w/v)] inkubiert und die Proteine somit fixiert und reversibel rot angefärbt. Durch ein bis zwei Waschschritte mit destilliertem Wasser wurden die Protein-Banden in jeder Ladespur sichtbar. Zum Entfärben wurde die Membran zwei- bis dreimal für 10 min in TBS-T (1M TRIS-HCl pH 7,50, 0,8% NaCl, 0,1% Tween20) auf einem Schüttler gewaschen.

## 6.4 Immunodetektion

Für die Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran 2 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer [5% Milchpulver in TBS-T (w/v)] geschüttelt. Bei 4°C und über Nacht erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers [anti-Desmin, rabbit polyclonal; CellSignaling, Danvers, USA; anti-GFP, rabbit polyclonal Abcam, Cambridge, UK; anti-tRFP (anti-mKate), evrogen]. Die Membran wurde wieder 3x 30 min mit TBS-T gewaschen und der sekundäre Antikörper anti-HRP (goat anti-rabbit, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase); Jackson Immuno Research, USA] eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren fünf aufeinanderfolgenden 10-minütigen Waschschritten wurde die Peroxidaseaktivität (HRP) und damit die Antikörpersignale mittels Lumigen-Reagenz ECL plus (ECL Advance Western Blotting Detection Kit, Amersham #RPN2135) visualisiert.

Als Ladekontrolle wurde eine anti-GAPDH Färbung angeschlossen. Dazu wurde der Blot für 1 h bei Raumtemperatur im Erstantikörper inkubiert (anti-GAPDH, Millipore, Billerica, USA) und nach

dreifachem Waschen mit TBS-T der Zweitantikörper für ebenfalls eine Stunde verwendet (anti-mouse HRP, Dako, Glostrup, Dänemark).

## 6.5 Western-Blot Stripping und erneute Detektion (Reprobing)

Die Western-Blots wurden gestript, um den an Desminprotein gebundenen Antikörper zu entfernen und erneut mit Antikörpern gegen die fluoreszenten Tags zu färben. Das Strippen erfolgte in 1x ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution von Millipore (#2504) für 30-45 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Danach wurde viermal für 5 min mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h mit 3% BSA in 1xPBS blockiert und unmittelbar wie oben beschrieben mit dem weiteren Primär- und Sekundärantikörper gefärbt.

# 7 Mausmyoblastenmodell

## 7.1 Versuchstiere

Für das vorliegende immortalisierte Mausmyoblastenmodell der Desminopathie p.R350P und des Desmin Knockouts (*Des*<sup>-/-</sup>) wurden Immortomäuse® (*H-2K<sup>b</sup>-tsA58*) von Charles River Laboratories, Luxembourg S.à.r.l. (Luxemburg) mit Desmin R350P Knockin bzw. mit Desmin Knockout Mäusen gekreuzt und aus isoliertem Mausmuskelgewebe immobilisierte primäre Mausmyoblasten isoliert, kultiviert und charakterisiert.

## 7.2 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in Makrolonkäfigen EuroStandard Typ II long (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland) gehalten und in IVC-Racks (Individuell Ventilated Cages-Racks, Tecniplast Deutschland GmbH) bei gleichen Belüftungsbedingungen untergebracht. Weichholzgranulat von Ssniff (Lignocel Typ: FS 14, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) wurde als Käfigeinsteu verwendet. Die Labormäuse wurden unter gleichbleibenden äußereren Bedingungen (durchschnittlich 23°C Raumtemperatur, 45% relative Luftfeuchtigkeit, Lichtprogramm mit 12 Stunden dauernder Tagphase) in Gruppengrößen von 1-5 Tieren gehalten. Zusätzlich wurden die Käfige mit roten Zuchthäuschen (aus Makrolon®), Nagemöglichkeiten (Hölzer) und Baumwoll-Nestels ausgestattet. Den Mäusen stand zu jeder Zeit und nach Belieben pelletiertes Alleinfuttermittel für Mäuse (Ssniff Spezialdiäten GmbH) sowie Wasser zur Verfügung. Für die Nachzucht wurden getönte Käfige (Tecniplast Deutschland GmbH) und Zuchtfutter Typ M Zucht (strahlensterilisiert, standardisiert; Ssniff Spezialdiäten GmbH) verwendet. Im Alter von 3-4 Wochen wurde der Nachwuchs abgesetzt, mit Ohrlochung markiert und die Geschlechter voneinander getrennt gehalten. Das gesamte Zubehör für die Tierhaltung (u. a. Behältnisse, Tierfutter und Wasser) wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

## 7.3 Zucht und Genotypisierung

### 7.3.1 Verpaarung

#### 1. *Immorto x Desmin KI p.R350P human*

Die Verpaarung einer heterozygoten Immortomaus® der F5-Generation mit einer Desmin KI R350P Maus der F3-Generation ergab eine Nachzucht, die für die Isolierung von konditional immortalisierten Myoblasten geeignet war. Für eine homozygote Form der humanen Desminmutante R350P anstelle des entsprechenden Maus-Gens wurde Maus Nr. 51 ausgewählt (s. Anhang S.124).), um immortalisierte Myoblasten aus dem Muskelgewebe zu isolieren.

Aus der gleichen Verpaarung ergab sich u.a. eine Maus, die einen heterozygoten KI der humanen p.R350P Desminmutante im Genom besaß und für die Myoblastenisolierung verwendet wurde. Zudem lag das T Antigen heterozygot vor (siehe Anhang S. 124).

#### 2. *Immorto x Desmin KO*

Um immobilisierte Myoblasten ohne Desminfilamente zu generieren, wurden lebensfähige, fertile Desmin KO Mäuse aus der F3-Generation mit Immortomäusen® aus der F4-Generation verkreuzt. Aus einer homozygoten Desmin KO Maus mit heterozygot vorliegendem Immortogen wurden die Myoblasten isoliert (siehe Anhang S.125).

### 7.3.2 Genotypisierung

Für die Bestimmung des Genotyps einer Maus wurde die genomische DNA im Alter von 4 Wochen aus Schwanzbiopsien isoliert und mit spezifischen Primern amplifiziert.

Über Nacht wurden die Schwanzproben bei 56°C in 400 µl Tail-Buffer und 24 µl Proteinase K (20 mg/ml, #P-5147 SIGMA, St.Louis, MO, USA) verdaut. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Fällung erhielt man die genomische DNA. Das DNA-Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit 70% Ethanol in 20 µl 5 mM Tris/HCl, pH 8,5 1 h bei 50°C unter Schütteln gelöst. Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch mit dem Nanodrop (peqLab, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Für die PCR wurden 200-500 ng der genomischen DNA eingesetzt und die entsprechenden Genfragmente mit spezifischen Primern amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem 1%igen Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt.

Tail Buffer: 1% SDS

10 mM Tris pH 7,5

50 mM EDTA

150mM NaCl

Für die *Immorto*-PCR wurde Maxima™ Hot Start Green PCR Master Mix (ThermoScientific) verwendet. Es ergaben sich nach zwei PCRs mit folgendem Programm und mit den folgenden Primern (Kern and Flucher 2005) zwei Banden unterschiedlicher Länge in einer Gelelektrophorese (Wildtyp 500 bp; *Immorto* 300 bp).

PCR-Programm

	95°C	5 min
35x	94°C	20 sec
	60°C	30 sec
	72°C	1 min
	72°C	5 min
	20°C	∞

Spezifische Primer *Immorto*

Immorto wt-f	5'- GAT CTG CCT GAG GTG TTA CTT G-3'
Immorto wt-r	5'- GGA TGG CAT TAG TCA TGA C-3'
Immorto tsA-f	5'- AGT CCT CAC AGT CTG TTC ATG ATC-3'

Die *Desmin KI R350P*-PCR wurde ebenfalls mit der Polymerase Maxima™ Hot Start Green PCR Master Mix (ThermoScientific) durchgeführt. Bei dieser Polymerase-Ketten-Reaktion wurde die Anwesenheit des Transgens indirekt über den Verbleib der *loxP*-site aus der homologen Rekombination und damit über unterschiedliche Basenlängen von Wildtyp- und KI-Bande nachgewiesen (Wildtyp 179 bp; KI 244 bp). Eine heterozygote Maus zeigte dementsprechend eine Doppelbande, eine homozygote bzw. Wildtyp Maus nur eine einzelne Bande entsprechender Größe.

PCR-Programm

Spezifische Primer *Desmin R350P KI*

	95°C	5 min
35x	94°C	20 sec
	65°C	30 sec
	72°C	1 min
	72°C	5 min
	20°C	∞

Des R350Ps	5'-GCT GTA GGT TTT TAA TTC TAA AGG TGG ATA AGG G-3'
Des R350Pas	5'-AAA CCT GGA AGC AGT TTT ACA CAA GAG GC-3'

Für den Nachweis eines Knockouts von Desmin im murinen Genom wurde die *Desmin KO*-PCR mit drei spezifischen Primern und der AccuPrime™*Pfx* DNA Polymerase durchgeführt. Das Desmin Knockout Allel war bei einer Größe von 450 bp als Bande im Agarosegel zu erwarten, Wildtyp Desmin bei einer Größe von 350 bp. Bei Heterozygotie des Desmin KO lag eine Doppelbande vor.

PCR-Programm

	94°C	4 min
30x	94°C	1 min
	62°C	45 sec
	68°C	1 min
	68°C	5 min
	20°C	∞

Spezifische Primer Desmin KO

Des KO 1	5'-TTG GGG TCG CTG CGG TCT AGC C-3'
Des KO LacZ 430R	5'-GAT CGA TCT CGC CAT ACA GCG G-3'
Des KO 1R	5'-GGT CGT CTA TCA GGT TGT CAC G-3'

## 7.4 Desmin KO und R350P Desmin KI H-2K<sup>b</sup>-tsA58 Mausmyoblasten

### 7.4.1 Isolierung von primären Mausmyoblasten und Etablierung einer stabilen Zelllinie

Ziel der Verpaarung von Desmin KO- bzw. Desmin R350P KI-Mäusen mit einer Immortomaus®-Linie war die Etablierung einer konditionell immortalisierten Myoblastenlinie mit entsprechendem Desmin Knockout oder R350P Knockin.

Nachdem die entsprechenden Mäuse für die jeweiligen Myoblastenlinien ausgesucht waren, wurden diese sofort nach der Genotypisierung für die Isolierung von Myoblasten aus Muskelgewebe vorbereitet.

Die ca. vier Wochen alten *H-2K<sup>b</sup>-tsA58* Mäuse wurden in einer mit Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) abgesättigten Kammer schmerzlos narkotisiert und schließlich mit einer Überdosis des Narkotikums euthanisiert. Die Haut wurde mit 70% Ethanol desinfiziert und es wurde an beiden Hinterläufen seziert. Anschließend wurde der M.tibialis anterior, M. extensor digitorium longus und M. soleus ohne die anliegenden Sehnen steril entnommen, in kaltem (4°C), sterilem 1x PBS (pH 7,2) in einem 15 ml-Falkon-Röhrchen gesammelt und auf Eis gehalten. Die gesammelten Muskeln wurden anschließend unter Laminar Air Flow mit Hilfe zweier Skalpelle in einer Petrischale maximal zerkleinert. Als nächstes wurden die zerkleinerten Muskeln in 1,5 ml Enzymlösung (30mg Kollagenase D (#11088858001 Roche, Deutschland), 29,1 mg Dispase II (#04942078001 Roche, Deutschland), 2,5 µl 1M Ca<sub>2</sub>Cl-Lösung in 1,5 ml 1xPBS pH 7,2) für 25 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Daraufhin wurde bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet resuspendiert und auf drei Kollagenbeschichtete, mit 10 ml Immorto Growth Medium befüllte, 10 cm großen Zellkulturschalen aufgeteilt. Die Zellen wurden nach 30 min präplattiert und bei 33°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten.

### 7.4.2 Kultivierung konditionell immortalisierter Mausmyoblasten

Die immortalisierten primären Mausmyoblasten wurden aus transgenen Mäusen isoliert (siehe 3.3) und bei 33°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Simian-Virus 40 (SV-40) thermolabile Onkogen large tumor (T) Antigen tsA58 inhibiert Tumorsuppressorgene wie p53. In immortalisierten Mausmyoblasten ist es stabil in das Genom der Zellen integriert und durch den murinen Promotor *H-2K<sup>b</sup>* reguliert, der durch Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) induziert werden kann. Die isolierten, kultivierten primären Zellen exprimierten das Onkogen bei 33°C und Anwesenheit von Interferon gamma (# PMC4031 Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) im Immorto Growth Medium (IGM) und ermöglichen so eine unbestimmte Zellteilungsrate (Jat, Noble et al. 1991).

#### Immorto Growth Medium:

DMEM	500 ml
FCS	100 ml
Pen/Strep (100x)	5 ml
Mouse recombinant IFN $\gamma$	15 $\mu$ g

Die Myoblasten wuchsen auf Kollagen-beschichteten Kulturschalen. Petri-Schalen mit 10 cm Durchmesser wurden bei Raumtemperatur über Nacht mit Kollagenlösung (#C8919 Sigma, 10%ige Kollagenlösung mit 0,5% Eisessig) inkubiert und danach wieder abgenommen. Die Kollagenlösung konnte für weitere Beschichtungen bis zu dreimal wiederverwendet werden und war ca. drei Monate bei 4°C haltbar.

Bei einer Konfluenz der Zellen von 50-60% wurden die Zellen gesplittet- spätestens nach fünf Tagen. Um eine Kontamination mit Fibroblasten zu reduzieren, wurden die Fibroblasten ca. 1 h nach dem Splitten präplattiert und verworfen. Die noch nicht adhärenten Myoblasten im Überstand wurden auf eine neue Kollagen-beschichtete Kulturschale gegeben und weiter kultiviert.

#### Fusionierung zu Myotuben

Die Zellen wurden in einer beschichteten 12 Well-Platte (mit 2 Deckgläschern von 10 mm Durchmesser pro well) ausgesät. Bei einer Konfluenz von 80-100% kam es spontan zur Fusionierung der Myoblasten bzw. wurde die Fusion durch Zugabe von Fusionsmedium (in DMEM, 2% Pferdeserum, 2 mM Glutamin, Pen/Strep) eingeleitet.

## E Ergebnisse

### 1 Charakterisierung der fluoreszierenden Far-Red Proteine

Zweifarbig Interaktionsstudien in der Einzelmolekülspektroskopie ermöglichen es, ungeklärte Fragen über Koassemblierungsvorgänge zu beantworten. Dabei wurden in einem Zellsystem Wildtyp Desmin und die drei Mutanten mit unterschiedlichen fluoreszenten Proteinen gelabelt, die jeweils über die Laser des FCS Readers angeregt werden konnten. Für einen zweifarbigem Ansatz wurde neben dem etablierten Fluorophor GFP ein Far-Red Fluorophor benötigt, das ähnlich wie GFP die Filamentbildung der Desminvarianten nicht beeinflussen durfte. Weitere Voraussetzung für den Einsatz als Fusionstag war, dass es bei Anregung durch die geeignete Wellenlänge nur gering ausbleicht und monomer vorliegt, sodass eine direkte Proportionalität hinsichtlich der Helligkeit des getagten Desminkonstrukts zur Teilchenkonzentration gewährleistet ist.

Für die Dualcolour-Analyse waren zwei Farbstoffe indirekt geeignet, die die genannten Bedingungen erfüllten. Beide Fluorophore sind etwa 23 kDa (PSmOrange) bzw. 26 kDa (mKate2) groß und damit ähnlich wie GFP (26,9 kDa).

Protein	Maxima(nm) Anregung/ Emission	Quantenausbeute	Speziesform	Photobleaching
mKate2 <sup>1</sup>	588/633	0,4	Monomer	71
PSmOrange (Far-Red) <sup>2</sup>	636/662	0,28	Monomer	48,5

**Abbildung 17 Physikalische Parameter von mKate2 und PSmOrange für die Einzelmolekülspektroskopie.**

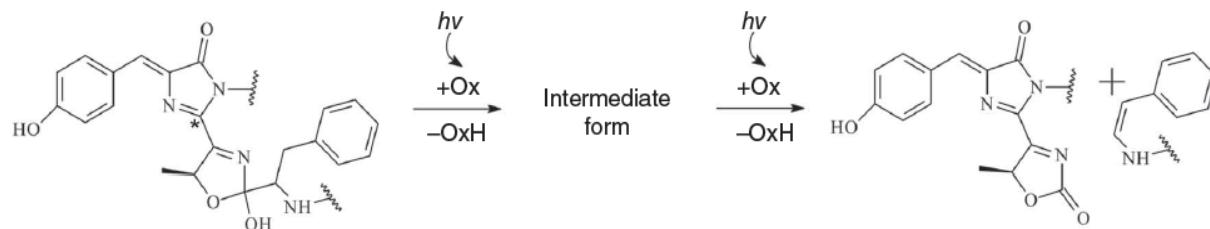
Photobleaching: durchschnittliche Fluoreszenzhalbwertszeit in sec; Quantenausbeute: Anzahl emittierter Photonen/absorbiertener Photonen. <sup>1</sup>(Shcherbo, Murphy et al. 2009) und <sup>2</sup>(Subach, Patterson et al. 2011).

#### 1.1 PSmOrange

Subach *et al.* erkannte, dass sich das konventionelle Fluoreszenzprotein mOrange mit blaugrüner Laserbestrahlung (458 bzw. 488 nm) zu einem Far-Red anregbaren Fluorophor photokonvertieren lässt (Subach, Patterson et al. 2011). Allerdings war die Photostabilität sowie die Far-Red Helligkeit der photokonvertierten Variante zu gering, um ein stabiles Tag daraus zu etablieren. Durch Mutagenese entstand aus dem mOrange Fluorophor ein stabiles photokonvertierbares PSmOrange.

PSmOrange musste für die zweifarbigen, molekularen Interaktionsanalysen im FCS Reader photokonvertiert werden, sodass das fluoreszente Protein ein für den Insight Reader geeignetes Anregungsmaximum bei 633 nm erreicht. Nur so kann es als Fluoreszenztag für Desmin in der Einzelmolekülspektroskopie eingesetzt werden.

Gemäß der publizierten Daten sollte die Photokonvertierung in einem Zellkultursystem, das mit PSmOrange transient transfiziert wurde, durch blaugrünes Laserlicht mit einer Wellenlänge von  $480 \pm 40$  nm und einer Leistung von  $1130 \text{ mW/cm}^2$  für eine Minute erfolgen. Dabei steigt die Photokonvertierungsrate mit zunehmender Laserleistung an. Die hohe Laserleistung lässt sich durch den energiereichen, nicht linearen, Zwei-Photonenübergang bei der Konvertierung erklären (siehe Abbildung 18) (Subach, Patterson et al. 2011).

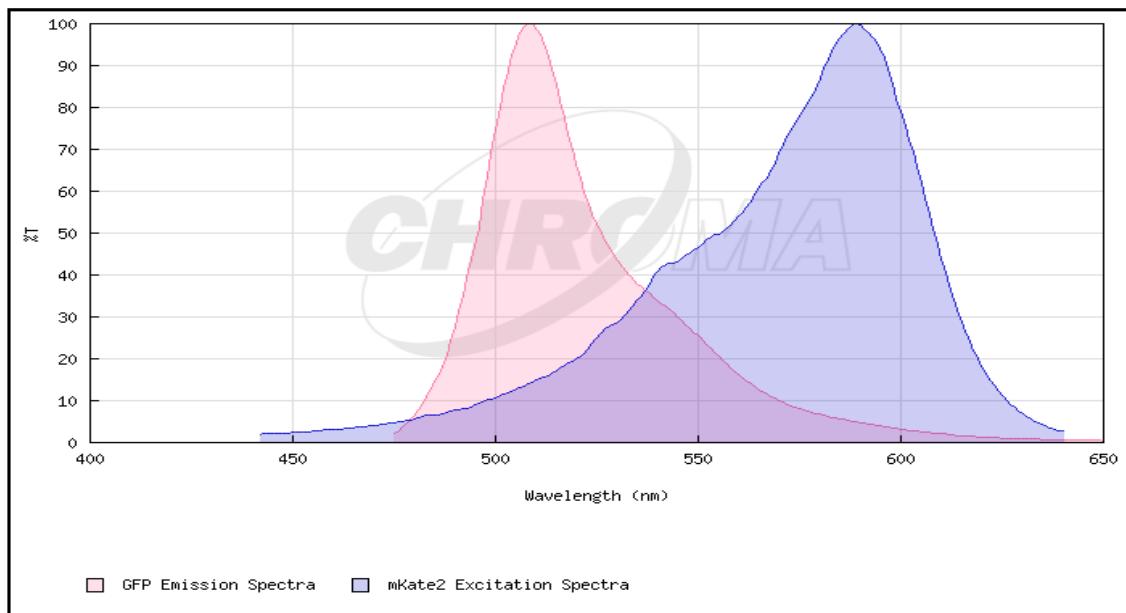


**Abbildung 18 Möglicher Mechanismus der Photokonvertierung von PSmOrange zur Far-Red Form.** Für die Photokonvertierung mit blaugrünem Laserlicht ( $h\nu$ ) ist eine zweifache Photonenübertragung durch ein Oxidationsmittel ( $Ox$ ) nötig. Die vorhandenen oxidierten Teilchen in der Lösung werden dabei reduziert ( $OxH$ ) (Subach, Patterson et al. 2011).

## 1.2 mKate2

Als zweiter möglicher Fluorophor für die zweifarbigen Interaktionsstudien wurde mKate2 ausgewählt. Das monomere Far-Red Fluoreszenzprotein ist dreimal heller als mKate. Durch Mutagenese von mKate entstand das Fluorophor mKate2, das ein pH-, und photostabileres Protein im Vergleich zum Ausgangsfluorophor ist (Shcherbo, Murphy et al. 2009).

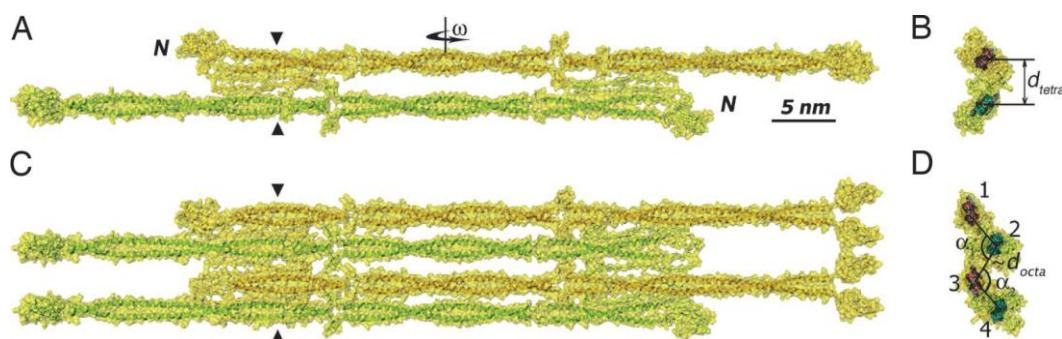
Mit seinem Anregungsmaximum bei 588 nm kann allerdings keine direkte Anregung des Fluoreszenzproteins im FCS Reader erwartet werden, da die Anregungsbereiche bei 488 nm und 633 nm liegen. Deshalb wurde eine mögliche indirekte Anregung von mKate2 über FRET (Förster Resonanz Energie Transfer) im Rahmen dieser Arbeit überprüft: Man nutzt dabei die Energieübertragung, bei der die Energie eines angeregten Fluorophors- GFP- bei einer gewissen Nähe auf ein weiteres Fluorophor- mKate2- strahlenfrei übertragen werden kann. Der Energietransfer kann nur dann stattfinden, wenn zwei unterschiedlich gelabelte Moleküle (Desmin-GFP und Desmin-mKate2) im Zellkultursystem in gewisser Nähe miteinander interagieren. Abhängig von der FRET-Rate hätte sich eine detaillierte Aussage über die Architektur von Desminfilamentassemblierungen treffen lassen können.



**Abbildung 19 Fluoreszenzspektren von GFP und mKate2.**

Dargestellt ist die Überlappung des Emissionsspektrums von GFP mit dem Absorptionsspektrum von mKate2 als Voraussetzung für einen erfolgreichen Energietransfer nach FRET. Die Spektren wurden mit Hilfe des Spektrumviewers von Chroma dargestellt. <http://www.chroma.com/spectra-viewer?fluorochromes=837|845&set=3&showDetails=1> (August 2014).

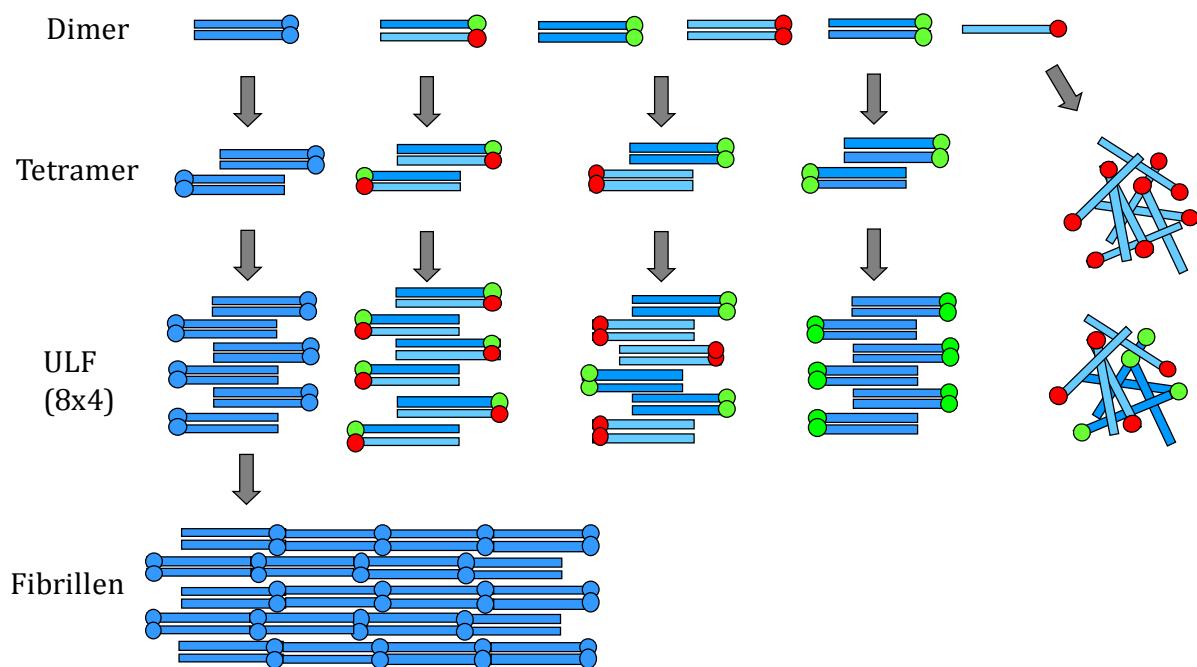
Eine weitere Bedingung für die strahlenlose Energieübertragung ist die Überlappung des Emissionsspektrums von GFP mit dem Absorptionsspektrum von mKate2. Diese Voraussetzung wurde als gegeben angesehen. Eine direkte Anregung von mKate2 im Insight Reader mit einer vorhandenen Laserwellenlänge von 633 nm ist nur in geringem Umfang möglich, sodass es theoretisch im Zweifarbanansatz nur indirekt über GFP angeregt werden sollte (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 20 Dreidimensionales (3D) Modell von Vimentin und der Vimentinfilamentsynthese.**

3D Modell von Vimentin als Tetramer (A) und Octamer (C) von der Seite. (B) Querschnitt eines Tetramers. Der Abstand der Tetramerachsen  $d_{tetra}$  beträgt 3,4 nm. (D) Der Querschnitt eines Octamers,  $d_{octa}$  beträgt 3,2 nm (Sokolova, Kreplak et al. 2006).

Wie bereits erwähnt, darf für eine Energieübertragung über FRET maximal ein Abstand von 10 nm zwischen GFP und mKate2 bestehen. Für Vimentin, das wie Desmin zu den Intermediärfilamentproteinen gehört und entsprechend assembliert (siehe Abbildung 2), konnten bei Kleinwinkel-Röntgenstreuungsmessungen (SAXS) die im nm-Bereich liegenden Abstände zwischen den einzelnen Molekülen in einer Assemblierung genau bestimmt werden (siehe Abbildung 20) (Sokolova, Kreplak et al. 2006). Die relevanten Interaktionsbereiche von farblich unterschiedlich markierten Desminmolekülen liegen unter dem geforderten Maximalabstand von 10 nm, könnten somit über FRET angeregt und in der Einzelmolekülspektroskopie quantitativ analysiert und charakterisiert werden (siehe Abbildung 21).



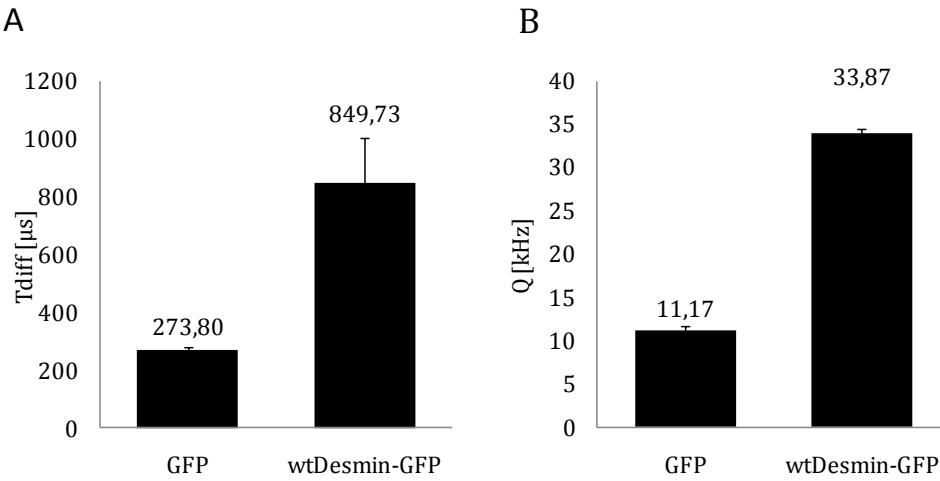
**Abbildung 21 Hypothetisches Modell verschiedener Assemblierungsstufen von farblich unterschiedlich markierten Desminmolekülen.**

Links ist der physiologische, bekannte Assemblierungsweg von Intermediärfilamentproteinen wie z. B. Vimentin oder Desmin dargestellt: parallele Dimere lagern sich halbversetzt und antiparallel zu Tetrameren zusammen. Bei rot und grün fluoreszenzmarkierten Molekülen könnte die Aneinanderlagerung entweder kombiniert zweifarbig oder einfarbig ablaufen. Es könnten auch einfarbig fluoreszierende Aggregate bei pathologisch vorliegender Filamentbildung entstehen (rechts).

### 1.3 Überprüfung von GFP in der Einzelmolekülspektroskopie

Das Verhalten von GFP im Vergleich zu Desmin-GFP in der Einzelpartikeluntersuchung wurde bereits bei Levin *et al.* ausführlich beschrieben (Levin, Bulst et al. 2010). Um eine Reproduzierbarkeit dieser Daten zu gewährleisten, wurde das Fluoreszenzsignal von dem Protein GFP im Vergleich zu Desmin-GFP noch einmal analysiert. Dabei wurden native Desminproteinextrakte in der FCS Analyse betrachtet. Wildtyp Desmin-GFP zeigte eine hohe

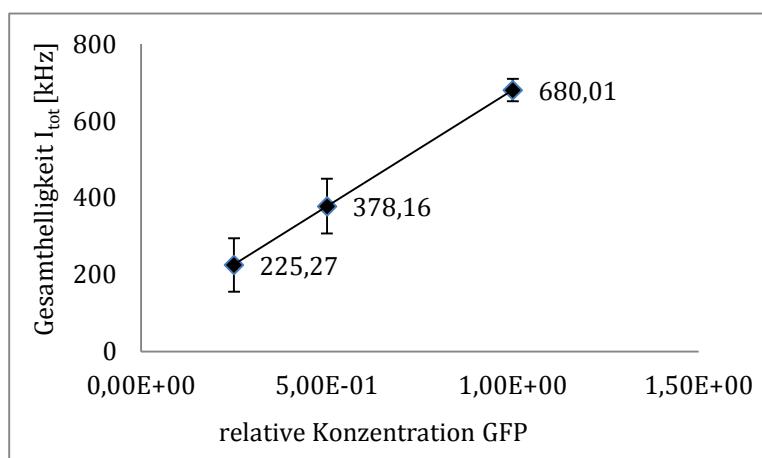
Diffusionsgeschwindigkeit  $T_{\text{diff}}$  (ca. 1000  $\mu\text{sec}$ ) wie zuvor publiziert, was im nativen Extrakt für ein Vorliegen hauptsächlich als Dimere spricht. Die über FIDA berechnete Partikelhelligkeit [Q] von Desmin-GFP lag ähnlich, wie schon zuvor publiziert wurde, bei 11 kHz (Levin, Bulst et al. 2010). Im Vergleich dazu liegt Wildtyp Desmin-GFP im nativen Proteinextrakt bei 33 kHz.



**Abbildung 22 Diffusionszeit und Partikelhelligkeit eines monomeren grün fluoreszierenden Proteins (GFP) im Vergleich zu wt Desmin-GFP.**

Die vor kurzem veröffentlichten Daten (Levin, Bulst et al. 2010) waren in der vorliegenden Arbeit bei drei unabhängigen Messungen reproduzierbar und zeigen vergleichbare absolute Werte aus drei unabhängigen Messungen mit fünffachem Mäander.

In der Einzelmolekülspektroskopie von fluoreszenden Teilchen wird vorausgesetzt, dass die Proteinkonzentration proportional zur gemessenen Gesamthelligkeit in FIDA oder FCS ist. Im dargestellten Graphen konnte ein homologer linearer Zusammenhang zwischen beiden Größen, der Diffusionszeit und der Partikelhelligkeit, bestätigt werden.

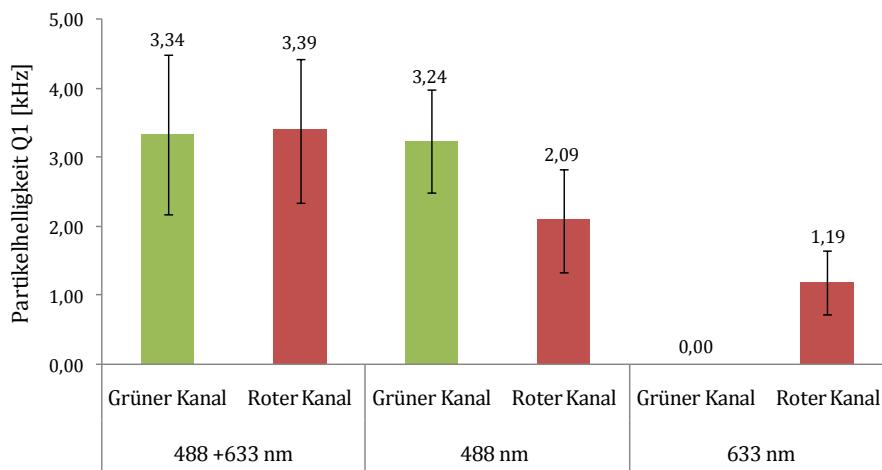


**Abbildung 23 Korrelationsdiagramm von GFP über 1K FIDA Fit.**

Gemessen wurden die Gesamthelligkeitswerte in einer Verdünnungsreihe von GFP bei Anregung im grünen Spektralbereich im Insight Reader. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Messungen (je fünfmal gemessen) angegeben. Die gemessenen Werte liegen in der Nähe der linearen Trendlinie.

## 1.4 Verhalten von mKate2 in der Einzelmolekülspektroskopie

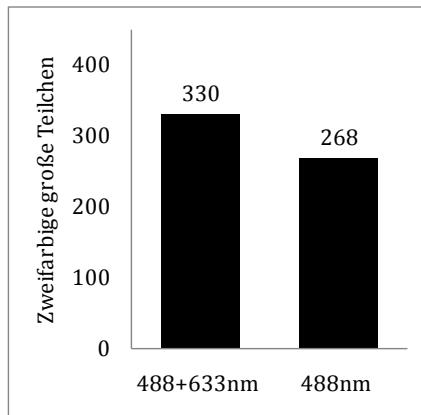
Um das Verhalten von mKate2 im Insight Reader für weitere Interaktionsmessungen abzuschätzen, wurde mKate2 hinsichtlich Partikelhelligkeit und Korrelationsverhalten (Teilchenkonzentration zur Gesamthelligkeit) im nativen Extrakt charakterisiert. Wie erwartet, war die Partikelhelligkeit bei direkter Anregung mit rotem Laserlicht (633 nm) sehr dunkel (1,19 kHz). Es stellte sich allerdings auch heraus, dass mKate2 im grünen Spektralbereich direkt anregbar ist: Bei einer 1K FIDA Fit Analyse ergab sich eine relevante Partikelhelligkeit bei einfarbiger Anregung mit dem grünen Laser von 3,24 kHz im grünen Kanal (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24 Direkte Anregung von mKate2 ist bei 488 nm möglich.**

Dargestellt ist die Partikelhelligkeit Q1 von mKate2 mit unterschiedlicher Anregung, errechnet über 1K FIDA Fit. Bei Anregung mit beiden Lasern ist mKate2 im roten und grünen Emissionsspektralbereich 3,34 (grüne Detektion) bzw. 3,39 (rote Detektion) kHz hell. Unerwarteterweise emittierte mKate2 direkt über 488 nm ein Signal von 3,24 bzw. 2,09 kHz. Die direkte Far-Red Anregung (633 nm) ist vernachlässigbar klein (1,19 kHz).

Diese Erkenntnis stellte die FRET-Eignung von mKate2 in Frage. Daraufhin wurden Pilotversuche mit Zweifarbensätzen unternommen, die eine auswertbare FRETbarkeit nicht indizierten: Über SIFT wurden native Proteinextrakte aus kotransfizierten Wildtyp Desmin-GFP und Wildtyp Desmin-mKate2 zum Vergleich mit beiden Lasern (488 nm und 633 nm) und nur mit grünem Laser (488 nm) angeregt. Bei der Energieübertragung nach Förster erwartet man eine signifikante Zunahme der detektierten rot-grünen großen Teilchen bei alleiniger grüner Anregung, da mKate2 sich über GFP durch Interaktionen zweier Wildtyp Desminmoleküle anregen und so im roten Far-Red Kanal detektieren lässt. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 25): In sechs unabhängigen Versuchen war die aufsummierte Zahl an detektierten zweifarbigem großen Molekülen mit FRET-Anregung sogar kleiner als bei Anregung im roten und grünen Frequenzbereich (268<330 nm).

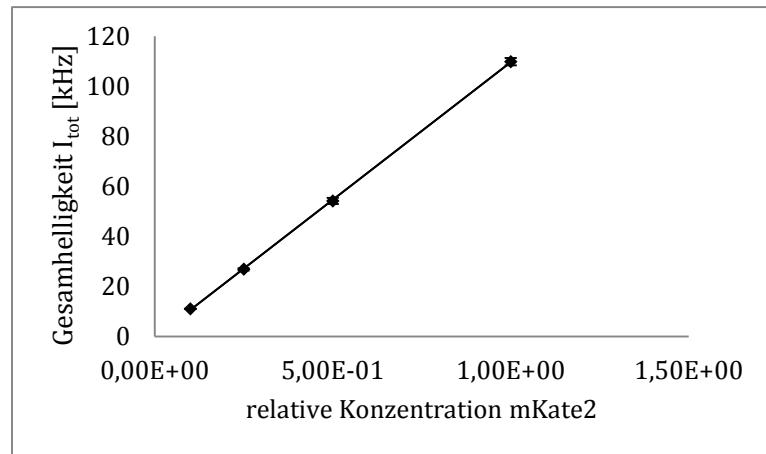


**Abbildung 25 Fehlende Anregbarkeit von großen zweifarbigen Molekülkomplexen über FRET bei Kombination von GFP- und mKate2-Desminfusionsproteinen.**

Von sechs unabhängigen Versuchen wurden die detektierten Photonensignale von großen, rot-grünen Multimeren mit unterschiedlicher Anregung aufsummiert. Bei einer Anregbarkeit über FRET wäre eine Zunahme der zweifarbig großen Teilchen im roten Kanal erwartet worden. Es wurden sogar weniger zweifarbig Teilchen registriert.

Für weitere Interaktionsanalysen wurde mKate2 als roter, fluoreszierender Farbstoff genutzt, allerdings nicht für FRET Versuche, die eine genaue Beschreibung der Architektur von koassemblierten Desminfilamente zugelassen hätten.

Wie vorher für GFP beschrieben (siehe 1.3), wurde auch hier eine Korrelationsmessung der Teilchenkonzentration zur Gesamthelligkeit von mKate2 durchgeführt, um eine Proportionalität hinsichtlich der Teilchenkonzentration zur Helligkeit zu bestätigen. Auch hier lagen die Mittelwerte nahe der gesetzten Trendlinie (siehe Abbildung 26).



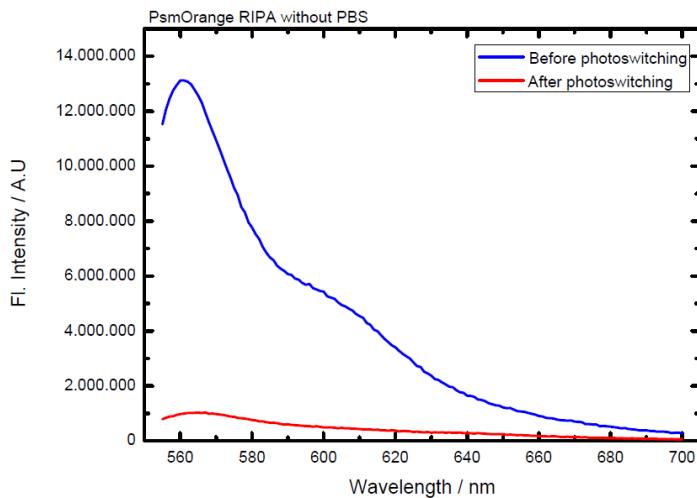
**Abbildung 26 Korrelationsdiagramm von mKate2 über 1K FIDA Fit.**

Gemessen wurden die Gesamthelligkeitswerte in einer Verdünnungsreihe von mKate2 bei Anregung im roten Spektralbereich im Insight Reader. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Messungen (je fünfmal gemessen) angegeben. Die gemessenen Werte liegen in der Nähe der linearen Trendlinie.

## 1.5 PSmOrange als alternatives Far-Red Fluorophor

### 1.5.1 Photokonvertierung von PSmOrange

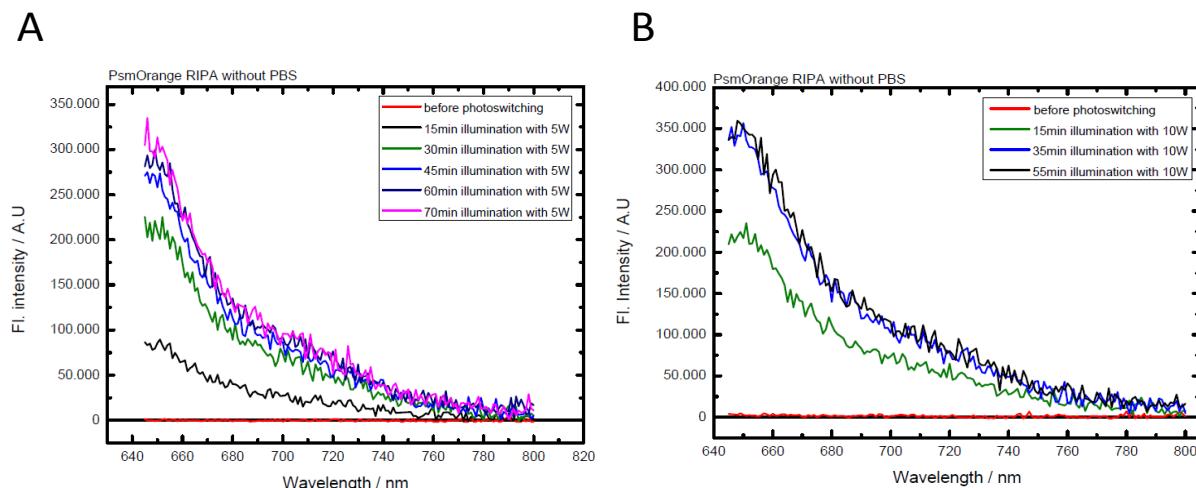
Die Fluoreszenzintensität von PSmOrange (blaue Kurve) wurde im Wellenlängenbereich von 555 nm-700 nm vor der Photokonvertierung aufgenommen (siehe Abbildung 27). Bei Anregung mit 548 nm zeigte das orangefarbene Proteinderivat ein Fluoreszenzmaximum bei 560 nm.



**Abbildung 27 Fluoreszenzmaximum von orangem PSmOrange liegt nach Fluoreszenzanregung (548 nm) bei 560 nm.**

Das aufgenommene Fluoreszenzspektrum im Bereich von 550-700 nm, Spaltbreite 2 nm, von orangefarbenem PSmOrange zeigte vor der Konvertierung einen Maximalwert bei 560 nm (blaue Kurve). Die photokonvertierte, Far-Red Form zeigt im orangefarbigen Wellenlängenbereich ein abgeschwächtes Fluoreszenzsignal um den Faktor 12 (rote Kurve).

Die Photokonvertierung des orangefarbenen in das Far-Red anregbare Protein PSmOrange erfolgte bei 532 nm. Eine erfolgreiche Photokonvertierung konnte durch Zunahme der Fluoreszenzintensität im Bereich des Far-Red Spektrums erkannt werden (siehe Abbildung 28). Dazu wurde die photokonvertierte Proteinlösung bei 636 nm angeregt und die Fluoreszenzspektren im Wellenlängenbereich von 645-800 nm aufgenommen. Nach der Photokonvertierung mit einer Laserleistung von 10 W/cm<sup>2</sup> stieg das Fluoreszenzintensitätssignal über die einzelnen Belichtungszeitschritte und war nach 35 min abgesättigt. Es wurde ein Emissionsmaximum bei 650 nm erreicht. Dabei nahm die gemessene Fluoreszenzintensität zwischen unkonvertiertem (siehe Abbildung 28, rote Linie) und photokonvertiertem Protein (siehe Abbildung 28, rosafarbene Linie) bei 650 nm um mehr als den Faktor 70 zu. Bei der Hälfte der Laserleistungsdichte (5 W/cm<sup>2</sup>) war erst nach 70 Minuten Belichtungszeit ein Maximalwert in der Fluoreszenz im Far-Red Bereich zu erkennen.



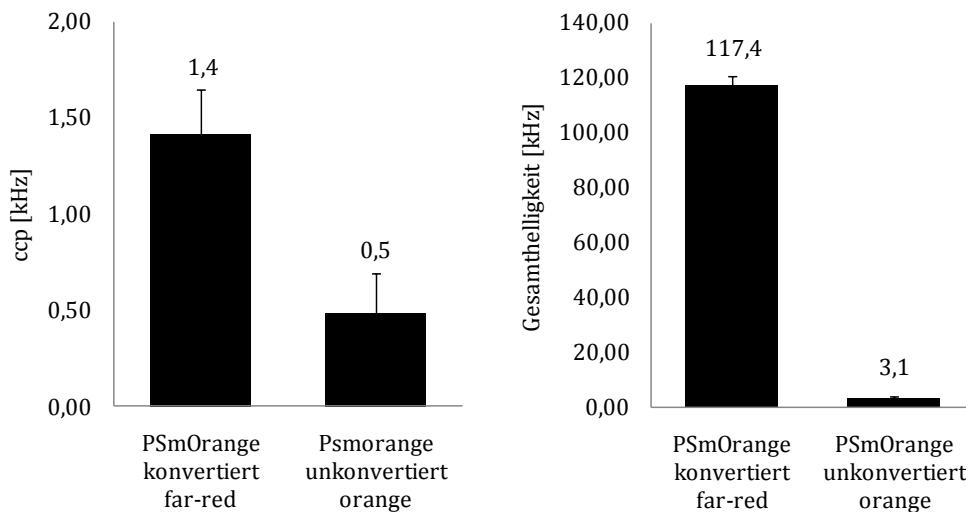
**Abbildung 28 Fluoreszenzintensitätsspektrum des Far-Red Bereichs vor und nach der Photokonvertierung von PsmOrange mit unterschiedlicher Laserleistung.**

Die Fluoreszenzintensität (Fl. Intensity, A.U., arbitrary units) wurde im Far-Red Wellenlängenbereich (645-800 nm, Eingangsspaltenbreite 3 nm, Ausgangsspaltenbreite 2 nm) zu unterschiedlichen Konvertierungszeitpunkten gemessen. Durch Zunahme der Intensität im Far-Red Bereich konnte eine Photokonvertierung detektiert werden. Die Anregung erfolgte bei 636 nm, Integrationszeit 0,1 sec. Ein Signalmaximum wurde bei 650 nm erreicht. **A** zeigt die Photokonvertierung mit 5 W/cm<sup>2</sup> und einer Laserwellenlänge von 568 nm. Nach 70 Minuten Belichtungszeit ist das Signal abgesättigt. Bei **B** wurde mit einer Laserleistung von 10 W/cm<sup>2</sup> und gleicher Wellenlänge konvertiert. Schon nach 35 min Belichtungszeit wurde der maximal erreichbare Wert an Fluoreszenzintensität erreicht.

Nach der Absättigung wurde ein Spektrum bei einer Anregungswellenlänge von 548 nm in einem Spektralbereich von 555 nm-700 nm aufgenommen (Eingangsspalt 2 nm, Ausgangsspalt 2 nm). Dabei nahm das Fluoreszenzintensitätssignal der photokonvertierten Form im orangefarbigen Wellenlängenbereich um den Faktor 12 ab (rote Kurve in Abbildung 27).

### 1.5.2 Messung im Insight Reader

Die photokonvertierten Proteinextrakte von PsmOrange wurden anschließend in der Einzelmolekülspektroskopie analysiert, um es bei zweifarbigem Interaktionsstudien einzusetzen. In der FCS Analyse hatte der photokonvertierte Extrakt eine Helligkeit von 117,37 kHz bei einer Anregung von 633 nm. Dagegen ließ sich das unkonvertierte Fluorophor nicht im Far-Red Bereich anregen (3,1 kHz). Betrachtet man die cpp (counts per particle), also die Helligkeit pro Teilchen in einer ungescannten Messung, der konvertierten Far-Red Form, so war sie zu gering, um es bei zweifarbigem Interaktionsstudien als Farbstoff zur Quantifizierung einzusetzen zu können (siehe Abbildung 29).

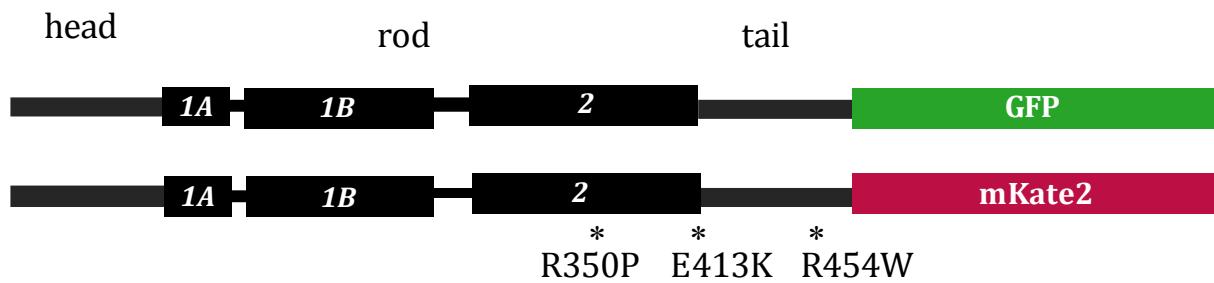


**Abbildung 29 Charakterisierung von Far-Red PSmOrange im Insight Reader.**

Far-red PSmOrange zeigte durch die erhöhte Gesamthelligkeit im Vergleich zur orangen unkonvertierten Form eine Anregung von Far-Red PSmOrange mit 633 nm Anregungswellenlänge im Insight Reader ( $117,37 \text{ kHz} > 3,12 \text{ kHz}$ , 633 nm Anregungswellenlänge). In einer ungescannten Messung hatte Far-Red PSmOrange im Vergleich zur unkonvertierten Form eine höhere, aber zu geringe Helligkeit pro Teilchen (cpp), sodass eine weitere Anwendung von PSmOrange in der Einzelmolekülspektroskopie bei zweifarbigem Desmin-Interaktionsstudien nicht zielführend war.

## 2 Überprüfung der Filamentbildung in SW-13-Zellen

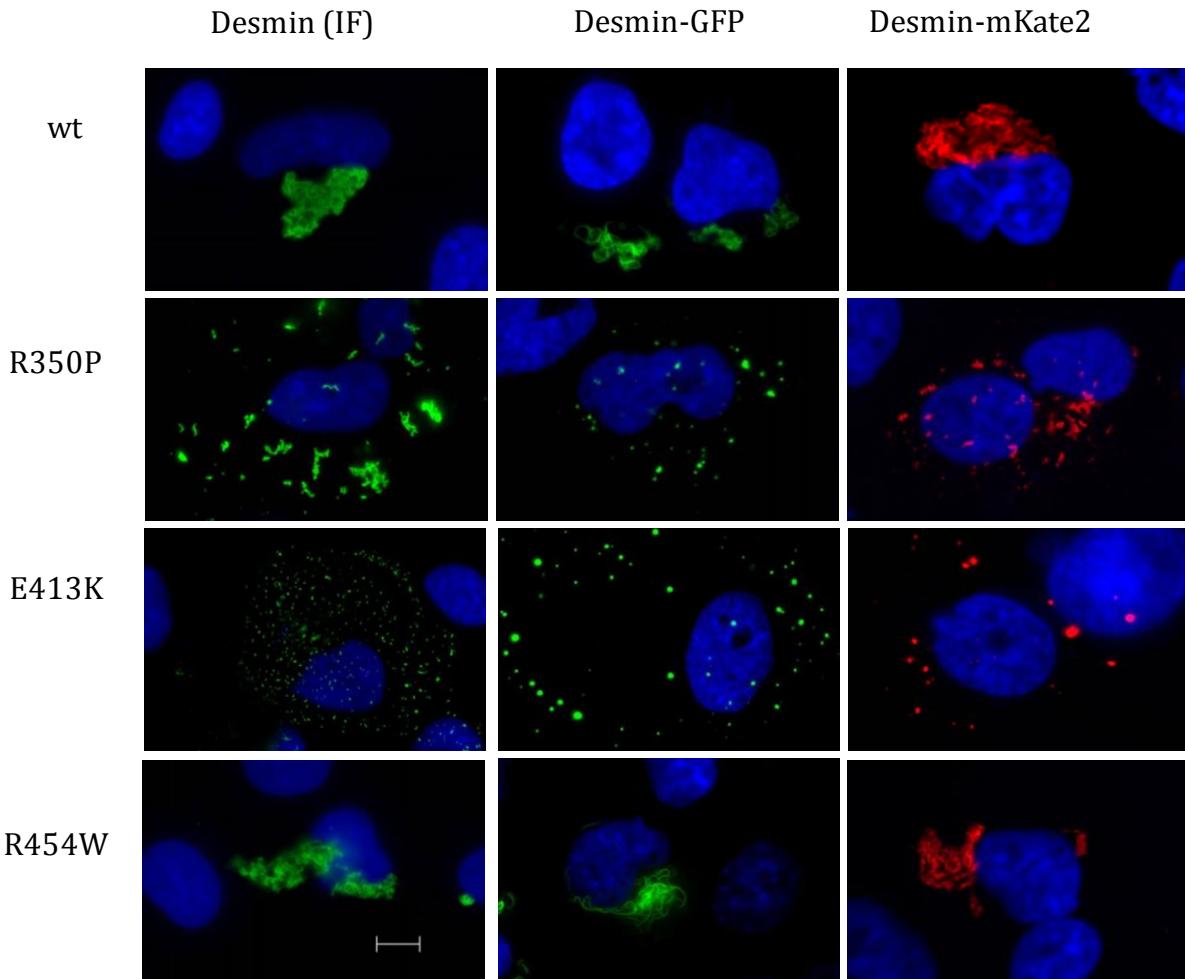
Zur Unterscheidung von Wildtyp-Desmin und Desminmutanten bei den molekularen Interaktionsstudien wurden die Proteine C-terminal mit GFP bzw. mKate2 fluoreszenzmarkiert und in Kulturzellen kotransfiziert (siehe Abbildung 30), sodass der Einfluss von mutiertem (rotmarkiertem) Desmin auf das physiologische (grünmarkierte) Intermediärfilamentennetzwerk *in vivo* besser untersucht werden kann. Für die bildgebende Darstellung der Filamente wurden Intermediärfilament-freie SW-13-Zellen 48 h mit den jeweiligen Expressionskonstrukt von Desmin-GFP und Desmin-mKate2 simultan transfiziert.



**Abbildung 30 Schematische Darstellung von Desminprotein gelabelt mit C-terminalen GFP bzw. mKate2.**

Die fluoreszenten Proteine wurden C-terminal an Desmin fusioniert. Die Sternchensymbole stellen die Lage der in dieser Arbeit untersuchten humanpathogenen Desminmutanten dar.

Die drei untersuchten humanpathogenen Punktmutationen im Desminprotein befinden sich in unterschiedlichen Domänen des Desminproteins und zeigen ein heterogenes Bild hinsichtlich der Filamentassemblierung und Aggregatbildung. Die zugehörigen, unterschiedlich schweren klinischen Phänotypen wurden bereits in 3.2 ausführlich beschrieben. Das Aggregationsverhalten der einzelnen Mutanten wurde bereits von Levin *et al.* und Bär *et al.* auf EinzelmolekülEbene und elektronenmikroskopisch untersucht (Bar, Goudeau et al. 2007, Levin, Bulst et al. 2010). Es konnte in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie kein Einfluss des C-terminalen GFP-Tags auf die Filamentbildung beobachtet werden. Diese Erkenntnis wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Beim Vergleich der getagten Desminproteine (Desmin-mKate2 und Desmin-GFP) mit dem Immunfluoreszenz-gefärbten Desmin konnte für das C-terminale getaggte Desmin-mKate2 ebenfalls kein Unterschied zum Immunfluoreszenz-gefärbten Desminfilamentennetzwerk erkannt werden (siehe Abbildung 31)



**Abbildung 31 Immunfluoreszenz- und Fluoreszenzdarstellung von Desmin und den Desmin-mutanten.**

SW-13-Zellen wurden 48 h mit den entsprechenden Desmin-Plasmiden transient transfiziert. Ungetaggtes Desmin (linke Spalte: Desmin IF) wurde mit einem Desmin-Antikörper gefärbt. Die Desminmutanten R350P und E413K bildeten ausschließlich Aggregate, wohingegen R454W ein ähnliches Filamentnetzwerk wie Wildtyp (wt) Desmin ausbildet. In der mittleren Spalte sind die entsprechend getaggten Versionen mit GFP (wt Desmin-GFP, R350P Desmin-GFP, E413K Desmin-GFP, R454W Desmin-GFP) sowie in der rechten Spalte mit mKate2 (wt Desmin-mKate2, R350P Desmin-mKate2, E413K Desmin-mKate2, R454W Desmin-mKate2) nebeneinander dargestellt. Fluoreszenzmikroskopisch ist kein Unterschied in der Filamentbildung zwischen getagtem und nicht getagtem Desminprotein zu erkennen; Maßstabsbalken 20

### 3 Optimierung der Transfektionseffizienz

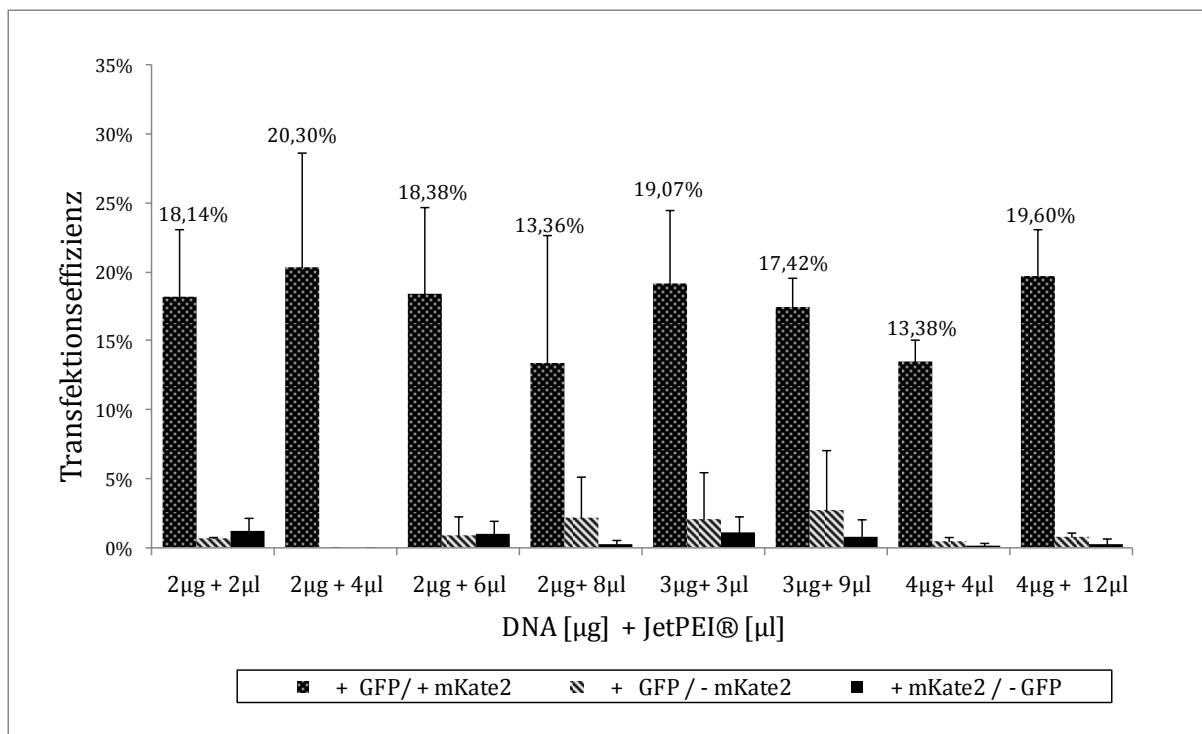
Für reproduzierbare Untersuchungen der Interaktion von Wildtyp Desmin mit mutiertem Desmin im zweifarbigem Ansatz wurde ein transient transfiziertes Zellkultursystem durch die Optimierung der Transfektionsraten von HEK293- und SW-13-Zellen etabliert. Dazu wurden alle Zellen im Gesichtsfeld des Fluoreszenzmikroskops bei 40facher Vergrößerung gezählt, die das Protein exprimierten und nicht artifiziell verändert vorlagen. Es war zudem entscheidend, dass die Zellen bei Kotransfektionen beide transfizierten Plasmidproteine enthielten.

### 3.1 Optimale Jet PEI® Transfektion von HEK293-Zellen

Für die einzelmolekülspektroskopische Analyse der Koassemblierungsansätze wurden HEK293-Zellen transient transfiziert und die nativ vorliegenden Proteine extrahiert. Die HEK293-Zellen wurden mit zwei Plasmiden im gleichen stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 kotransfiziert. Da die Interaktionsanalysen im unteren Sensitivitätsbereich des Insight Readers lagen, war ein optimiertes Zellkultursystem die Grundvoraussetzung für signifikante Messwerte.

Die Optimierung der Transfektionsrate von HEK293-Zellen ergab, bezogen auf eine Fläche eines Wells einer 6-Well-Platte, ein Verhältnis DNA/Transfektionsreagenz [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] von **2  $\mu\text{g}$  DNA zu 4  $\mu\text{l}$  JetPEI®-Lösung** (siehe Abbildung 32). Dabei wurden HEK293-Zellen mit unterschiedlichen Verhältnissen von DNA/JetPEI transient laut den Herstellerangaben kotransfiziert. Als Plasmid-DNA-Konstrukt wurde Wildtyp Desmin-GFP und Wildtyp Desmin-mKate2 im gleichen stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 verwendet.

Die Kotransfektionsrate bei einem Verhältnis von 2  $\mu\text{g}$  DNA zu 4  $\mu\text{l}$  JetPEI lag bei 100%.



**Abbildung 32 Effizienz der Kotransfektion in HEK293-Zellen 48 h nach Transfektion.**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Transfektionsrate und -effizienz verschiedener titrierter Verhältnisse von Menge DNA zur Transfektionslösung ( $\mu\text{l}$ ) im HEK293-Zellkultursystem in einem Well einer 6-Well-Platte. Auszählung der Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl an Zellen, welche kotransfiziert (+GFP/+mKate2), oder einzeln transfiziert (+GFP/-mKate2; +mKate2/-GFP) vorlagen ( $n=3$ ). Das Verhältnis 2  $\mu\text{g}$  DNA/ 4  $\mu\text{l}$  Reagenz zeigte die beste Transfektionsrate (20,30%) und Kotransfektions-effizienz simultan transfizierter Konstrukte (100%).

### 3.2 Optimierung der X-tremeGENE 9® Transfektion von SW-13-Zellen

Die fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden in SW-13-Zellen durchgeführt, da diese Zellen relativ groß sind, keine endogenen Intermediärfilamente besitzen und sich die Ausbildung eines Filamentnetzwerks aus rekombinantem Desmin beim konventionellen Mikroskopieren gut beobachten lässt. Für eine optimale Transfektion der SW-13-Zellen wurden X-tremeGENE 9® und Lipofectamin2000 als Reagenzien ausgewählt. X-tremeGENE 9® zeigte eine 98%ige Kotransfektionsrate, Lipofectamin 2000 hatte eine Rate von 95,7%. Deshalb wurde X-tremeGENE9® als Transfektionsreagenz ausgewählt. Nach einer Titration des Mengen-/Volumenverhältnisses von DNA zum Transfektionsreagenz, wurde das Verhältnis 1:2 als ideal angesehen. In diesem Beispiel fand sich die optimale Kombination für die höchste Proteinexpression bei geringster Zelltoxizität mit **1 µg DNA zu 2 µl Transfektionsreagenz** pro Well einer 12-Well-Platte (siehe Abbildung 33).

	DNA[µl] + XtremeGene9[µl]			
	1 µg + 2 µl	1 µg + 3 µl	1 µg + 6 µl	2 µg + 6 µl
Transfektionsrate	10,52%	3,45%	3,35%	0,92%
Standardabweichung	0,03	0,02	0,02	0,01

**Abbildung 33 Bestimmung der idealen Transfektionsrate mit verschiedenen Konzentrationen von X-tremeGENE 9® in SW-13-Zellen.**

Das optimale Verhältnis der DNA-Menge zum Transfektionsreagenz lag in einem Well einer 12 Well-Platte und bei 50% Zellkonfluenz von SW-13-Zellen bei 1 µg DNA zu 2 µl X-tremeGENE 9® bei einem Gesamttransfektionsvolumen von 50 µl. Aufgetragen sind die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Bestimmungen der transfizierten Zellen im Verhältnis zur Zellgesamtzahl in einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung.

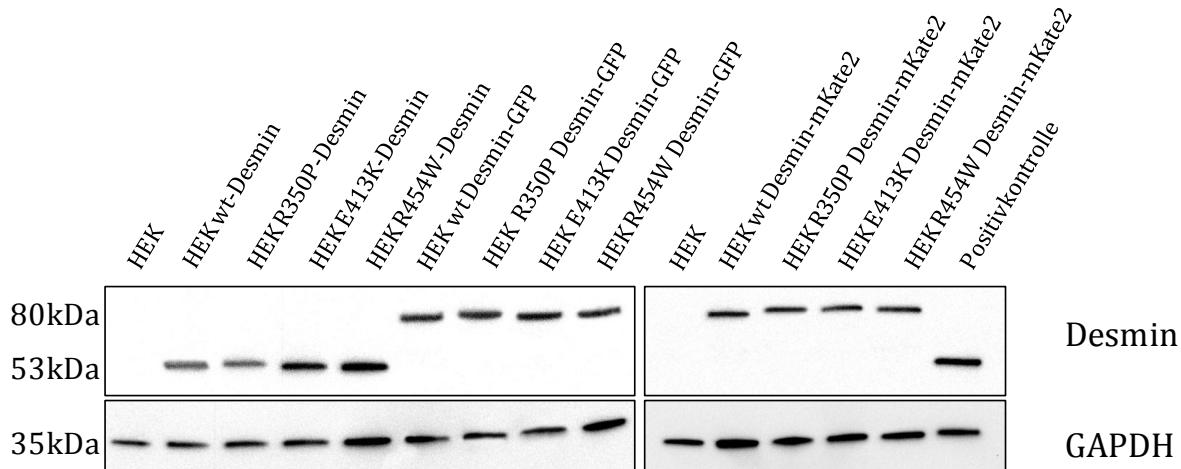
## 4 Desminexpression in HEK293- und SW-13-Zellen

Um ein äquimolares Expressionsniveau bei Kotransfektionen von HEK293- und SW-13-Zellen zu gewährleisten, wurde die Proteinmenge in beiden Zelllinien mit Hilfe von Western-Blots überprüft. Dabei war es essentiell zu bestätigen, dass die Expressionsmenge von markiertem Desmin mit den Fluorophoren GFP und mKate2 ähnlich zum Expressionsniveau von untaggetagtem Desmin ist. Weiterhin wurde überprüft, ob bei kotransfizierten Zellen die Expression von unterschiedlich markiertem Desmin dem stöchiometrischen Verhältnis der eingesetzten Plasmid-DNA Menge entsprach.

### 4.1 Transfektion von HEK293- und SW-13-Zellen mit einzelnen Expressionskonstrukten

Der repräsentative Western-Blot zeigt die Proteinexpression in HEK293-Zellen, die nach 5.1 transient mit einzelnen Konstrukten transfiziert und nach 6.1 lysiert wurden.

Entsprechend den molekularen Massen von monomerem Desmin (53,5 kDa) und den Fusionsproteinen (Desmin-GFP 79,5 kDa bzw. Desmin-mKate2 80,5 kDa) zeigten sich spezifische Signale im Immunoblot. Die Negativkontrolle („HEK“) enthielt als Lysat von unbehandelten Zellen kein endogenes Desmin. Außerdem waren keine unspezifischen Banden zu beobachten (siehe Abbildung 34).

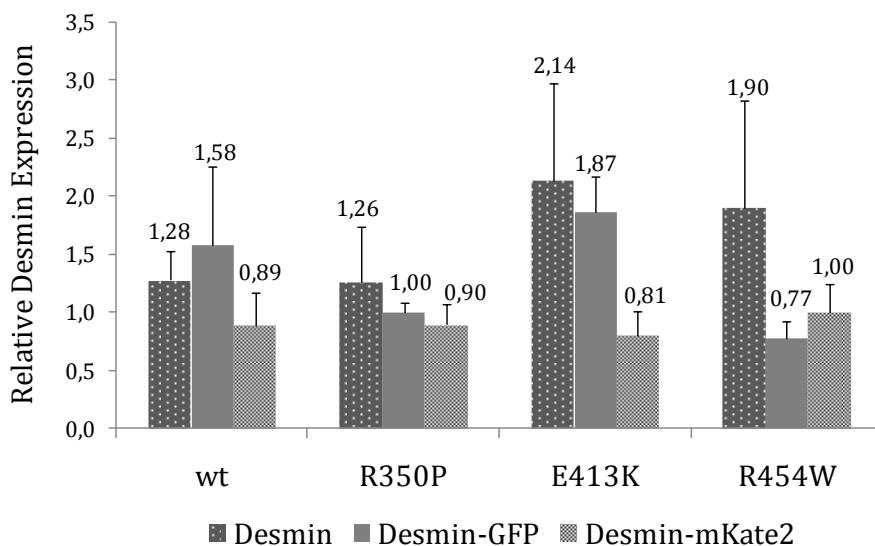


**Abbildung 34 Repräsentative Western-Blot-Analyse von HEK293-Zellen, die mit einzelnen Konstrukten transfiziert wurden.**

Dargestellt ist die Desminexpression von transfizierten HEK293-Zellen. Diese Proteinexpression wurde mit Hilfe der GAPDH-Expression normalisiert. Die rekombinante Proteinmenge aller Desmin-Konstrukte war vergleichbar. Es wurden weder unspezifische Banden detektiert noch besaßen diese Zellen endogen vorliegendes Desmin.

Um eine quantitative Aussage treffen zu können, wurde mit Hilfe der ImageJ Software die relative Expression ermittelt. Dabei wurde das Desminsignal mit Hilfe der GAPDH-Immunofärbung normalisiert. Die getaggten Desminvarianten zeigten außer bei Wildtyp Desmin eine geringere Expressionsrate im Vergleich zum unmarkierten Protein. Wildtyp-Desmin-mKate2 und die drei mutierten Desmin-mKate2-Formen hatten ein ähnlich hohes relatives Expressionsniveau (0,81-1,0). Generell kam es bei den drei unabhängig durchgeföhrten Western-Blot-Analysen zu sehr hohen Standardabweichungen.

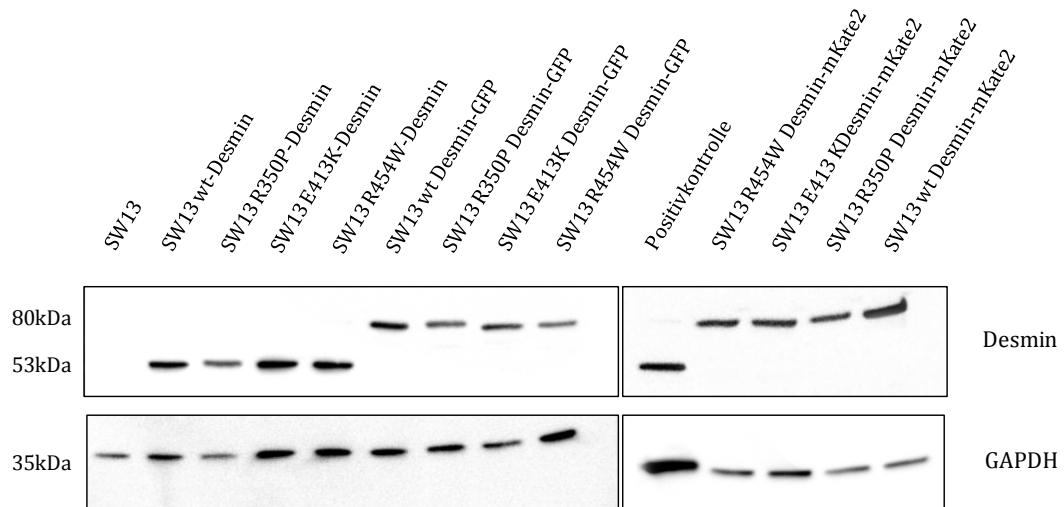
Es war kein signifikanter Unterschied im Expressionsniveau von ungetaggtem und getaggtem Desmin zu beobachten (siehe Abbildung 35).



**Abbildung 35 Relative Quantifizierung der Desminexpression in HEK-Zellen.**

Expression von überexprimierten Desmin in transfizierten HEK293-Zellen. Vergleich der relativen Expression der einzelnen Desminformen zwischen GFP- bzw. mKate2-getaggtem und unmarkiertem Desmin. Expressionsniveau der unterschiedlichen Desmin-mKate2-Konstrukte zeigt sich annähernd gleich. Die Messwerte sind als arithmetisches Mittel wiedergegeben ( $n=3$ ) $\pm$  Standardabweichung.

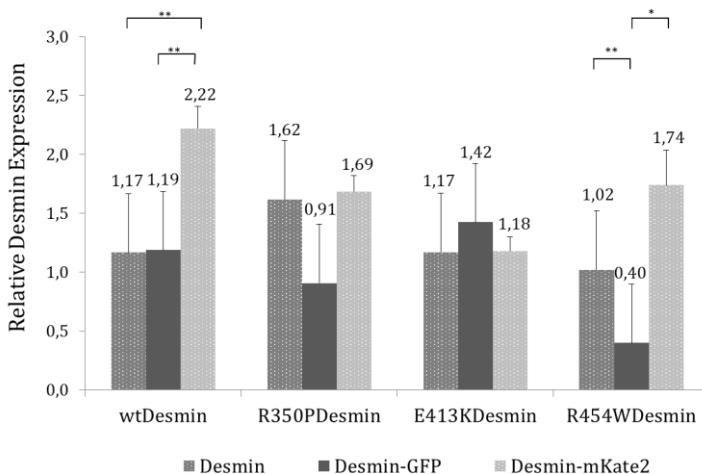
Die SW-13-Zellen wurden für die mikroskopischen Untersuchungen der Desminassemblierung von zweifarbig markiertem Desmin verwendet. Um eine reproduzierbare Expression des rekombinanten Desmins in SW-13-Zellen zu gewährleisten, wurden die einzeln transfizierten Zellen in einer quantitativen Auswertung über eine Western-Blot-Analyse im Folgenden verglichen (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37). In der Negativkontrolle („SW-13“, nur mit Transfektionsreagenz X-tremeGENE 9® behandelt) wurde kein endogenes Desmin detektiert. Als Positivkontrolle wurde ein Lysat humaner, primärer Myoblasten einer gesunden Kontrollperson verwendet. Die SW-13-Zelllysate, die 24 h mit dem entsprechenden Desminkonstrukten transfiziert wurden, zeigten alle eine spezifische Proteinbande mit entsprechendem Molekulargewicht. Unspezifischer Proteinabbau fand sich nicht.



**Abbildung 36 Repräsentativer Western-Blot von transfizierten SW-13-Zellen.**

Die einzeln transfizierten SW-13-Zellen mit Desmin-, Desmin-GFP- und Desmin-mKate2 Konstrukten in einer Western-Blot-Analyse zeigen kein endogenes Desmin in den Zellen sowie nur eine, in der Höhe des Molekulargewichts zu erwartenden Bande. Die Desminexpression wurde mit Hilfe der GAPDH Expression normalisiert. Die Proteinmenge liegt für alle Desminkonstrukte homogen vor.

Desmin wurde gegen die GAPDH Expression normalisiert. Bei der quantitativen Auswertung gab es signifikante ( $p < 0,05$ ) bzw. sehr signifikante ( $p < 0,01$ ) Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen gelabeltem Wildtyp Desmin und R454W-Desmin.: Zwischen Wildtyp Desmin und Wildtyp Desmin-mKate2 zeigte sich eine signifikante Zunahme an der Desminexpression ( $p=0,004$ ); genauso zwischen R454W Desmin und den Fusionsproteinen R454W Desmin-GFP und R454W Desmin-mKate2 ( $p=0,04$  bzw.  $p=0,03$ ). Eine hoch signifikante Diskrepanz war zwischen R454W Desmin-GFP und R454W Desmin-mKate2 zu beobachten ( $p=0,01$ ).

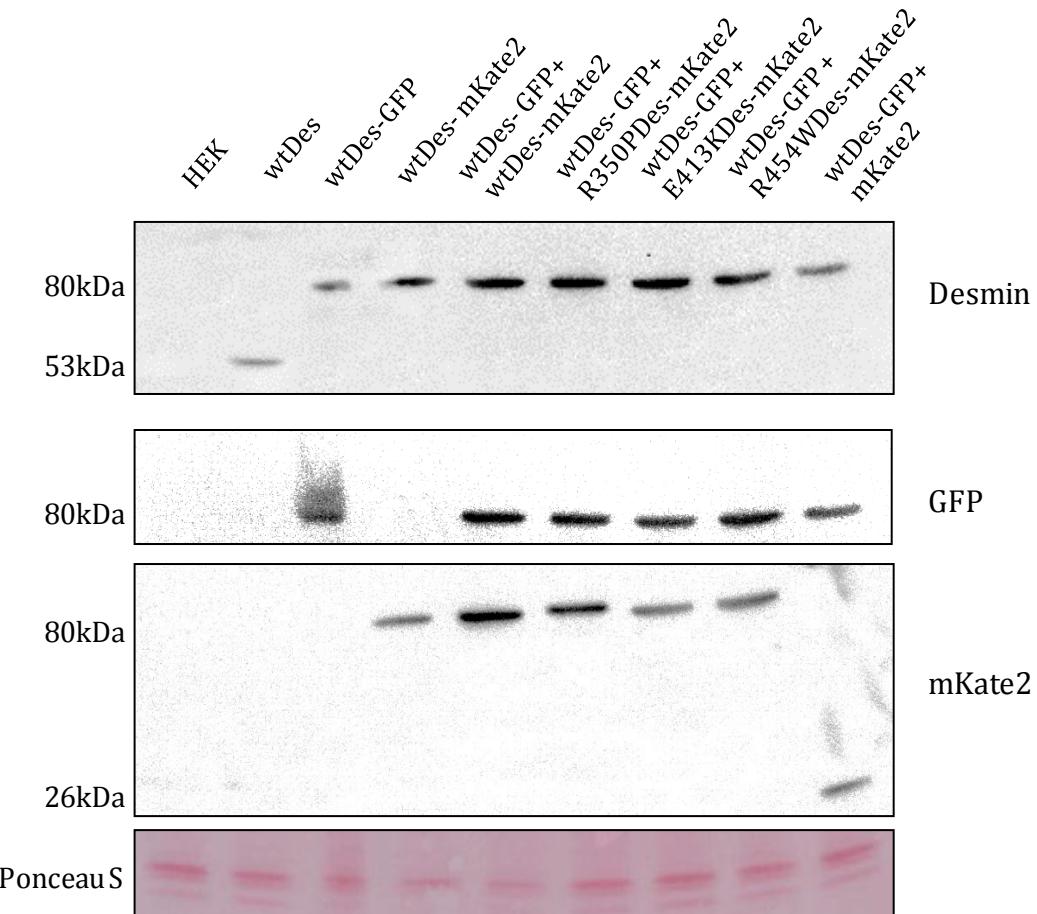


**Abbildung 37 Quantifizierung der Desminexpression in SW-13-Zellen.**

Relative Desminexpression von überexprimierten Desmin in transfizierten SW13-Zellen. Vergleich der relativen Quantifizierung der einzelnen Desminformen zwischen GFP- bzw. mKate2-getaggt und unmarkiertem Desmin. Bei den wt Desmin bzw. R454W Desminkonstrukten war eine signifikante (\* =  $p < 0,05$ ) bzw. hoch signifikante (\*\* =  $p < 0,01$ ) Abweichung der relativen Desminexpression zu beobachten. Die Messwerte sind als arithmetisches Mittel wiedergegeben ( $n=3$ )  $\pm$  Standardabweichung.

## 4.2 Proteinexpression von kotransfizierten HEK293-Zellen

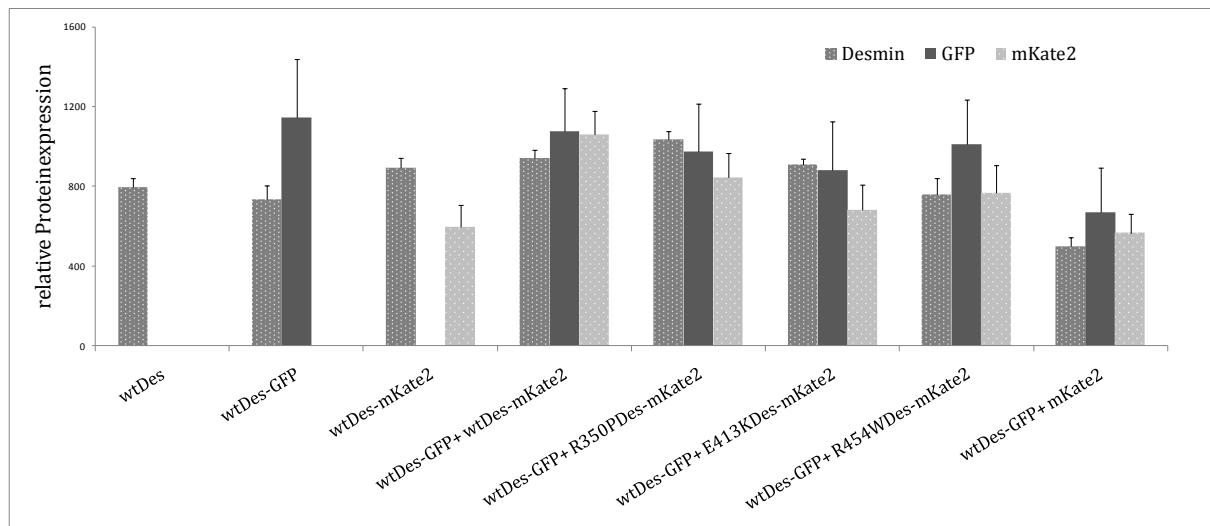
Für die Einzelmolekülanalyse von zweifarbigen Koassemblierungen von Wildtyp Desmin mit mutiertem Desminprotein muss ein homogenes Expressionsverhältnis bei den Kotransfektionen gegeben sein, das heißt, es sollen bei einem kotransfizierten DNA Mengenverhältnis von 1:1 auch die gleichen Proteinmengen 1:1 exprimiert werden. Diese Bedingung für gleichmäßige Messungen in der Einzelmolekülspektroskopie wurde in Western-Blots analysiert.



**Abbildung 38 Repräsentative Western-Blot-Analyse von Lysaten kotransfizierter HEK293-Zellen.** Vergleich der rekombinanten Proteinexpression der GFP- und mKate2-Fusionsproteine nach Transfektion im stöchiometrischen Verhältnis 1:1. Die Banden, die mit dem Desmin-Antikörper detektiert werden, zeigen die gesamte Desminproteinmenge in jedem Lysat, wogegen die Banden der anti-GFP- und anti-mKate2 (Trip)-Färbung den jeweiligen Anteil der Fusionskonstrukte aufzeigen. Die prominente Bande in der Ponceau S-Färbung befindet sich auf einer Höhe von 15 kDa, korreliert mit der Gesamtproteinmenge der einzelnen Lysate und diente bei der Normalisierung der Immunoblot-Signale.

Dazu wurde über die Software ImageJ die „integrated „density“ der einzelnen Banden in Relation zu einer Ponceau Bande (siehe Abbildung 38) gesetzt. Die relative Proteinexpression von kotransfizierten Zellen ist in Abbildung 39 wiedergegeben: So müsste die Expression mit GFP und mKate2 detektierten Protein gleich sein und aufsummiert die Proteinexpression an Desmin

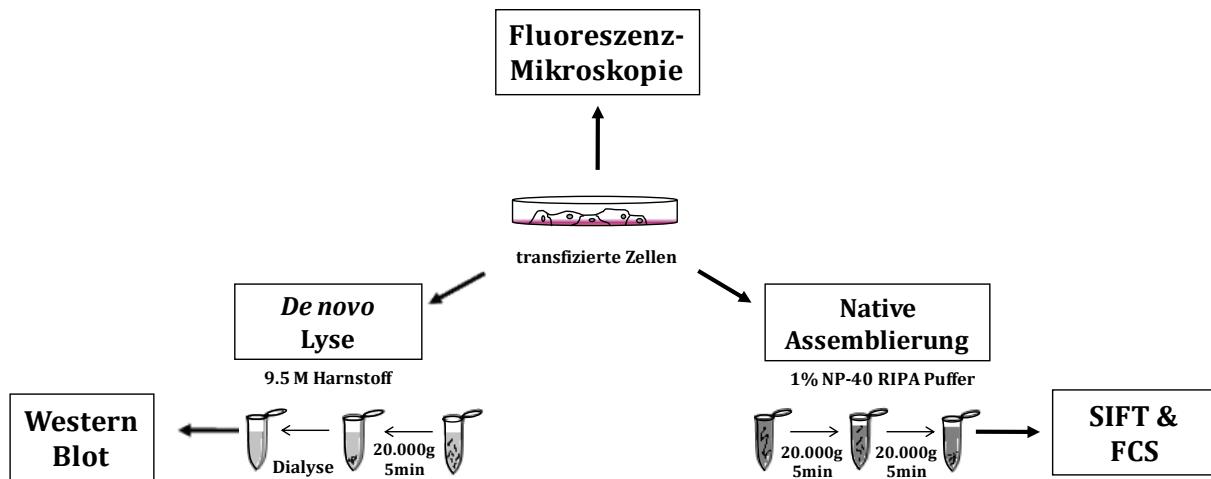
ergeben. Für jedes untersuchte Zelllysat (wtDes-GFP+ wtDes-mKate2, wtDes-GFP+ R350Des-mKate2, wtDes-GFP+ E413KDes-mKate2, wtDes-GFP+ R454WDes-mKate2, Des-GFP+mKate2) war kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen der Desmingesamtmenge und den Fusionskonstrukten erkennbar. Als Kontrolle wurden mock-transfizierte HEK293-Lysate, die mit Transfektionsreagenz 48 h behandelt wurden, sowie einzeln transfizierte Zellextrakte (wtDes, wtDes-GFP, wtDes-mKate2) verwendet.



**Abbildung 39 Relative Proteinexpression von kotransfizierten HEK293-Zellen.**

Die Proteinexpression von kotransfizierten HEK293-Zelllysaten wurden im Vergleich zu einzeln transfizierten (wt Desmin, wt Desmin-GFP, und wt Desmin-mKate2) mit unterschiedlicher Immunfärbung (gegen Desmin, GFP und mKate2) verglichen. Die 1:1 kotransfizierten Extrakte mit Desmin-GFP und Desmin-mKate2 ergaben aufsummiert nicht die relative Expression an Gesamtprotein-Desmin. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression detektiert werden. Die Messwerte sind als arithmetisches Mittel wiedergegeben (n=3)± Standardabweichung.

## 5 Zweifarbig Interaktionsstudien von mutiertem Desmin mit Wildtyp Desmin



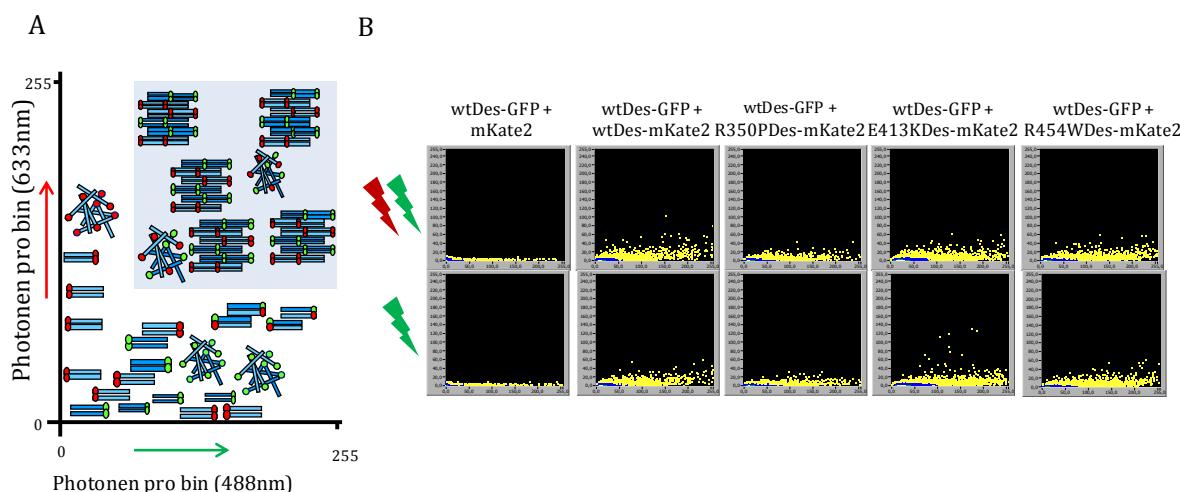
**Abbildung 40 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Interaktionsstudien.**

Aus den kotransfizierten Zellen der HEK293- und SW-13-Zelllinien wurden für *in vivo* Untersuchungen die Filamentbildung von zweifarbig markiertem Desmin in SW-13-Zellen untersucht und parallel über zwei unterschiedliche Lysataufschlüsse (*de novo* bzw. *nativ*) die Assemblierung *in vitro* in der Einzelmolekülspektroskopie und im Western-Blot auf molekularer Ebene charakterisiert.

Bei Patienten mit Desminopathien liegt das Wildtyp Desminallel neben einem mutierten Desminallel vor, sodass neben physiologisch funktionellem, auch pathologisches Desminprotein gebildet wird. Diese Protein-Proteininteraktionen im Patienten können mit Hilfe von Interaktionsstudien von physiologischer mit pathologischer Desminform nachgeahmt werden. Bei bereits veröffentlichten Koassemblierungsstudien konnte bestätigt werden, dass die meisten Punktmutationen einen dominant negativen Einfluss auf die funktionelle Desminassemblierung haben. Bis dato fehlen allerdings Aussagen über den genauen Ablauf der Filamentbildung bzw. über die resultierende Multimer- und Filament-Architektur bei einer Mischung von Wildtyp und Mutante. Die gleichzeitige Veranschaulichung von farblich unterscheidbaren Wildtyp Desmin und mutiertem Desminprotein auf molekularer (Einzelmolekülspektroskopie) und zellulärer Ebene (Fluoreszenzmikroskopie, Western-Blot) stellt dabei eine neue Strategie zur Klärung der offenen Fragen dar.

## 5.1 Koassemblierungsanalyse in der Einzelmolekülspektroskopie

Durch die theoretisch indirekte Anregbarkeit von mKate2 durch FRET über GFP im Insight Reader konnte auf die Architektur der Filamente bzw. Aggregate geschlossen werden. Die Charakterisierung des roten Farbstoffs mKate2 war Voraussetzung für zweifarbige Messungen auf molekularer Ebene. Es stellte sich heraus, dass die GFP und mKate2 getaggten Moleküle, die Dimere oder eine größere Spezies bilden, nur über direkte grüne und rote Laseranregung erkannt werden konnten (siehe 1.4). Dementsprechend konnte keine quantitative Aussage über die Architektur bzw. über den Anteil an physiologischen und pathologischen Desminmolekülen in den gebildeten Filamenten und Komplexen getroffen werden. Dagegen war der Anteil an zweifarbigem, interagierenden großen Teilchen bei equimolaren Mischungen aus Wildtyp Desmin und mutiertem Desmin in den Zellen über SIFT gut detektierbar. Die Verteilung der Photonen pro Zeitscheibe aus einer Messung wurde in einem 2D Histogramm farbkodiert aufsummiert. Es ermöglichte eine schnelle qualitative Aussage über Aggregate und Koaggregationsprozesse. (siehe Abbildung 41B).

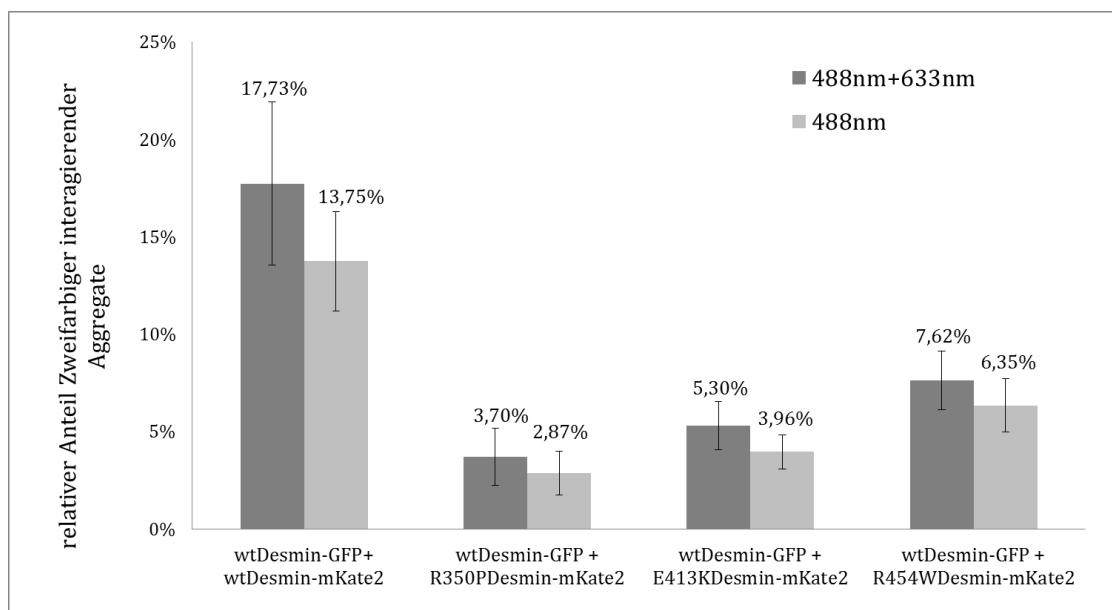


**Abbildung 41 Schematische Darstellung und Beispiele von Scatter Plots repräsentativer 2D SIFT Analysen.**

**A** Die Achsen des 2D Histogramms zeigen eine aufsteigende Signalintensität der detektierten Photonen/bin im grünen (X-Achse) und roten (Y-Achse) Kanal. Einfarbige Monomere befinden sich in der Nähe des Nullpunkts, einfarbige Multimere entsprechend ihrer Intensität in der Nähe der Achsen verteilt. Mit mKate2 markierte Partikel sind vor allem im grünen Kanal detektierbar. Zweifarbige Multimere, bestehend aus Desmin-GFP und Desmin-mKate2, werden in der Nähe der X-Achse und im oberen mittleren Bereich dargestellt. Für die Quantifizierung wurde der Ursprung (Origin) so verlegt, dass sich die zweifarbigen Signale von interagierenden großen Partikeln in einem definierten Abschnitt (hellblau hinterlegt) befinden.

**B** Scatter Plots von aufsummierten Photonen pro bin einer Messung mit 10 sec. SIFT Analyse von kotransfizierten nativen HEK293-Zellextrakten zeigten bei wt-wt Interaktion die meisten zweifarbigen Multimere, ebenso die Interaktion zwischen wt und R454W. R350P und E413K lagen bei Koassemblierung mit wt Desmin als kleinere Aggregate vor.

Der Anteil an zweifarbigen Polymeren an der Gesamtzahl der detektierten Teilchen lag bei stöchiometrisch äquimolar (1:1) eingesetztem Wildtyp Desmin-GFP und Wildtyp Desmin-mKate2 mit 17,73% bzw. 13,75% (rot-grüne bzw. grüne Anregung) im Vergleich zu koassemblierten mutierten Desmin mit Wildtyp-Desmin am höchsten. Die drei pathogenen Punktmutationen zeigten weniger zweifarbige interagierende große Spezies: So hatte R350P Desmin im Vergleich zu den anderen Mutanten den geringsten Anteil an zweifarbigen großen Molekülen (3,70% bzw. 2,87%). Es ist zu vermuten, dass überwiegend pathologische Aggregate gebildet werden, die einen geringen Anteil an zweifarbigen großen Partikeln haben. E413K zeigte einen ähnlichen Anteil von interagierenden großen Molekülspezies an der Gesamtteilchenzahl (5,30% bzw. 3,96%). Die R454W Desminmutante hatte, mit Wildtyp-Desmin koassembliert, die meisten unterschiedlich markierten Interaktionsspezies anteilig an der Gesamtzahl gemessener Partikel (7,62% bzw. 6,35%), was für das Vorliegen von physiologischen Assemblierungen spricht, jedoch in geringerer Menge als bei Wildtyp-Desmin.



**Abbildung 42 Anteil von zweifarbigen Multimeren an der Gesamtzahl der detektierten zweifarbigen Partikel.**

Der Anteil der zweifarbigen interagierenden großen Assemblierungsfragmente ist zwischen den wt Desminmolekülen am höchsten (17,73%). In der Interaktion mit wt Desmin zeigte R454W Desmin von den drei untersuchten Punktmutanten die meisten zweifarbigen Partikel (7,62%). R350P und E413K lagen nur zu einem geringen Teil als Assemblierungsspezies bestehend aus wt und Mutante vor (3,70% bzw. 5,30%). Dargestellt ist das arithmetische Mittel von drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung.

## 5.2 Zweifarbig Assemblierungsinteraktion von Desmin und mutiertem Desmin in SW-13-Zellen

Ergänzend zur Einzelmolekülanalyse wurden die zweifarbig fluoreszierenden Filamentnetzwerke über *in vivo* Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop charakterisiert. Für eine hohe Auflösung der IF-Filamente im konventionellen Mikroskop wurden SW-13-Zellen verwendet, die kein endogenes Desmin aufweisen und mit zwei fluoreszent unterscheidbaren Desminkonstrukten transient transfiziert wurden. Für die vorhandenen unterschiedlichen Transfektionsschemata wurden jeweils vier repräsentative Zellen gezeigt, die die Homogenität der gebildeten Assemblierung im Zellsystem belegten und den typischen Filamentaufbau zeigten. Bei den folgenden fluoreszenzmikroskopischen Analysen konnte im Vergleich zu nichtmarkiertem Desmin kein Einfluss der Tags GFP und mKate2 auf die physiologische Filamentbildung beobachtet werden.

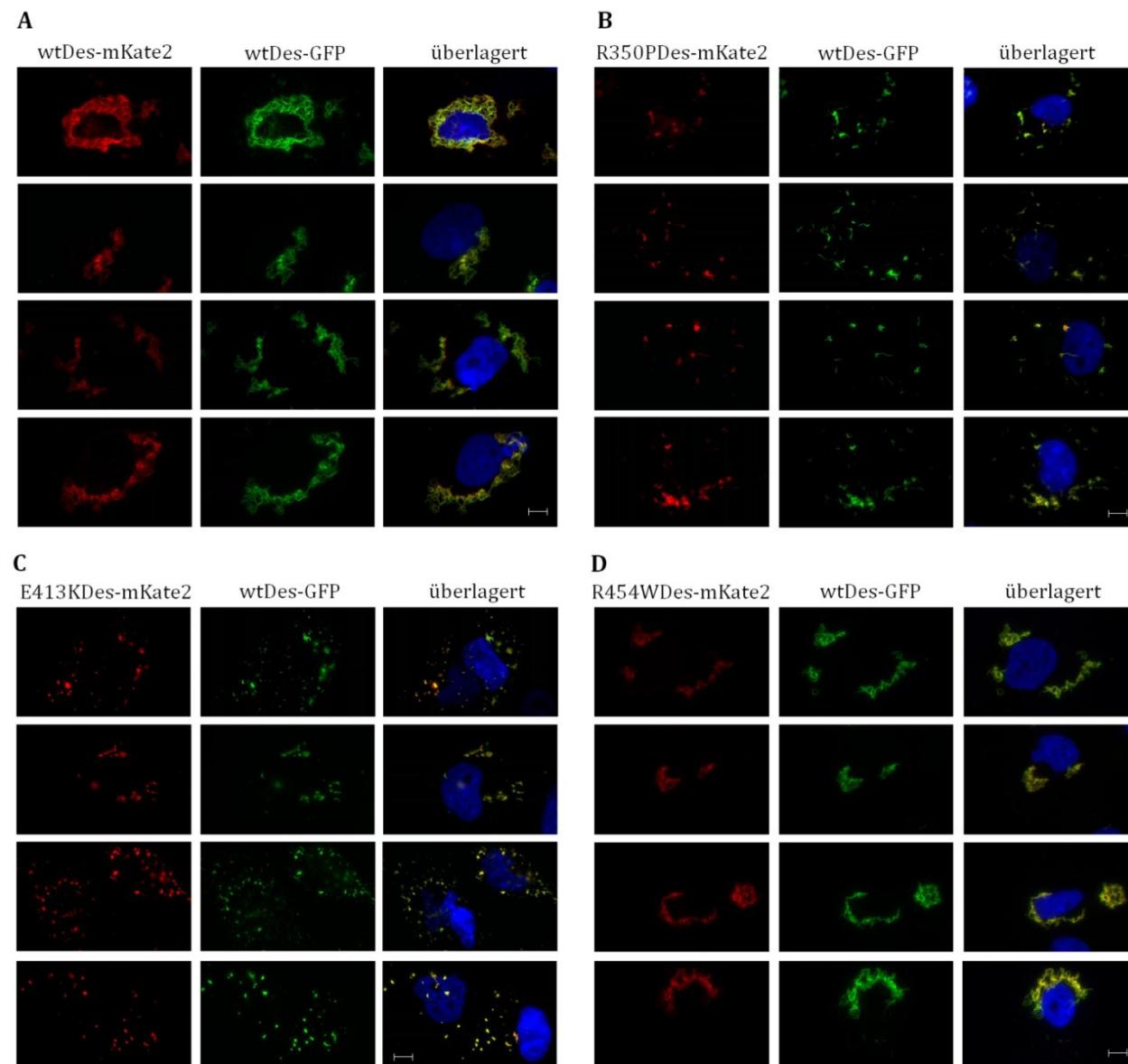
Es wurden bei allen drei untersuchten kotransfizierten Desminmutanten, bei denen funktionelles Desmin mit GFP und mutiertes Desmin mit mKate2 markiert war, Ähnliches beobachtet: Die entstandenen filamentösen Aggregate bzw. Assemblierungen bestanden aus kolokalisierten, physiologischen (Wildtyp) und pathologischen (Mutante) Proteinen. Wildtyp-Desmin-GFP und Wildtyp Desmin-mKate2 bilden ein ausgestrecktes, homogenes Filamentnetzwerk im Cytoplasma der Zellen aus. Die Koassemblierung mit je 50% Wildtyp Desmin-GFP und R350PDesmin-mKate2 zeigte eine Vielzahl einzelner Filamentbruchstücke, die aus beiden Desminformen bestanden und zum Teil nur als Proteinaggregate zu erkennen waren. Wildtyp-Desmin-GFP lag dabei nicht mehr als ausgebildetes Filament vor, sondern vielmehr als Filamentfasern unterschiedlicher Größe. E413K Desmin-mKate2 bildete vergleichsweise kleinere, punktförmige Aggregate mit einer geringeren Verteilung der Aggregatgrößen. R454W Desmin-mKate2 zeigte mit Wildtyp Desmin-GFP koassemblierte, ausgeprägte Filament-netzwerke. Bei allen drei Mutanten konnte eine Interaktion mit dem kompletten funktionellen Wildtyp-Desminprotein *in vivo* erkannt werden.

Verglichen mit dem gebildeten Filamentnetzwerk von Wildtyp Desmin-GFP und mutierten Desmin-mKate2-Konstrukten war bei den koassemblierten Desminfilamenten mit vertauschten Fluorophortags (Wildtyp Desmin-mKate2 und mutiertes Desmin-GFP) der gleiche kolokalisierende Effekt zu erkennen. Einzig bei der Mutation E413K Desmin-GFP mit Wildtyp Desmin-mKate2 lagen nur zum Teil kolokalisierende fluoreszierende Proteine und Proteinaggregate bei einzelnen Zellen vor. Dabei fanden sich E413K Desminproteine in Aggregaten und rotmarkiertes, funktionelles Wildtyp Desmin bildete Filamentfasern aus, die teilweise die Aggregate umgaben oder diese isoliert in das Fasernetzwerk integrierten.

Die zweifarbig markierten, reinen Mutanten ergaben zellulär betrachtet die selben Filamentstrukturen, wie bei den Koassemblierungen mit Wildtyp Desmin, was den dominant negativen Effekt für alle drei Mutanten auf die Wildtyp Filamentbildung bestätigt: R350P formte

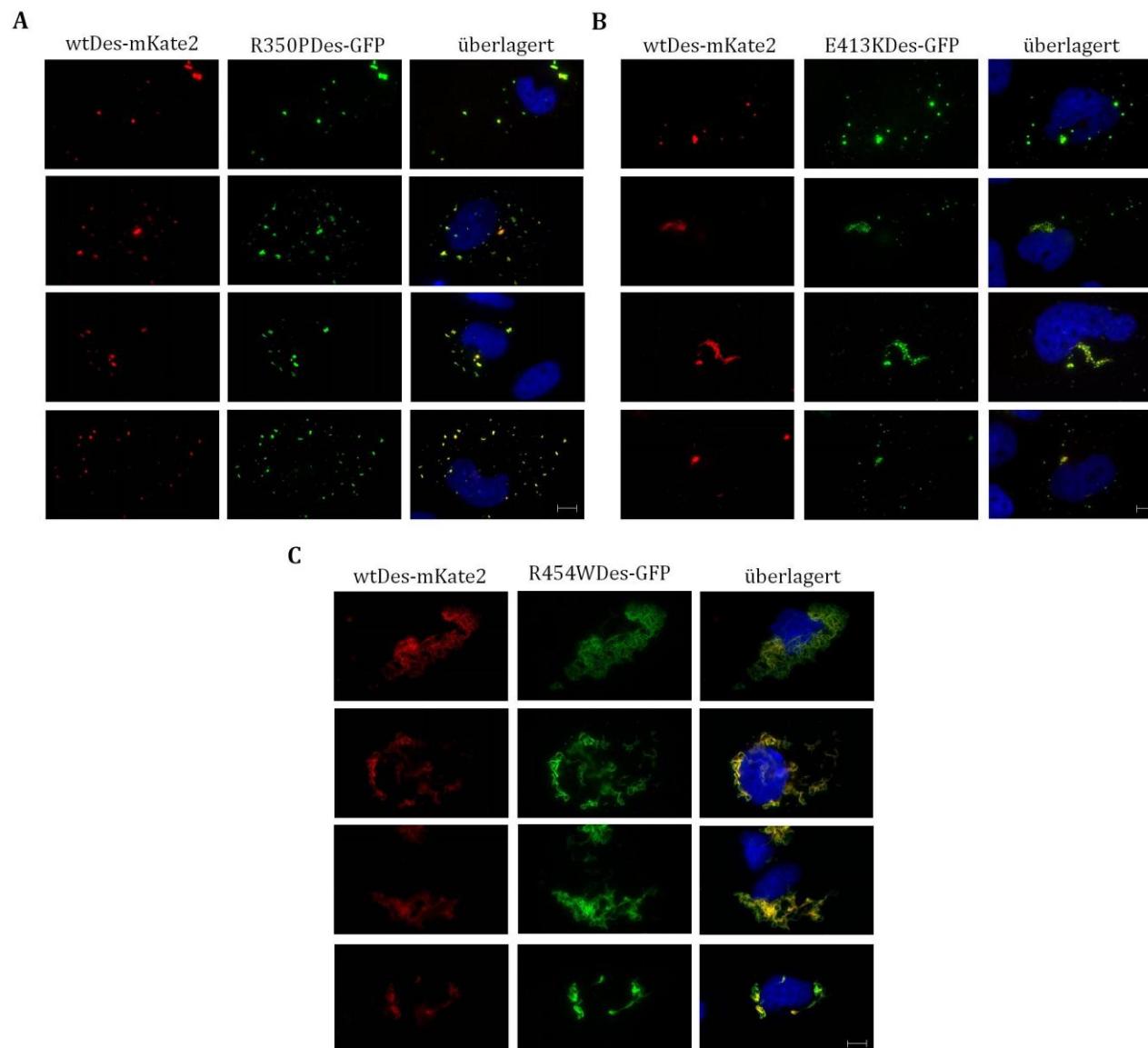
unregelmäßige Aggregate mit unterschiedlicher Größe; E413K Desmin lag als kleinere, punktförmige Filamentaggregate vor. R454W assemblierte ähnlich wie funktionelles Desmin zu einem scheinbar vollständigen regulären Filamentnetzwerk.

Um den Einfluss der Fluorophortags auf die Filamentbildung einzuschätzen, wurde zur Kontrolle die *in vivo* Filamentbildung von GFP oder mKate2 getaggetem Wildtyp Desmin mit nicht getaggetem pathogenen Desminprotein untersucht. Es ergab sich kein erkennbarer Unterschied zur Desminassemblierung bei gemischt getaggten Desminformen, sodass wiederum weder durch GFP noch durch mKate2 ein Einfluss auf die Filamentbildung sichtbar war (siehe Abbildung 46).



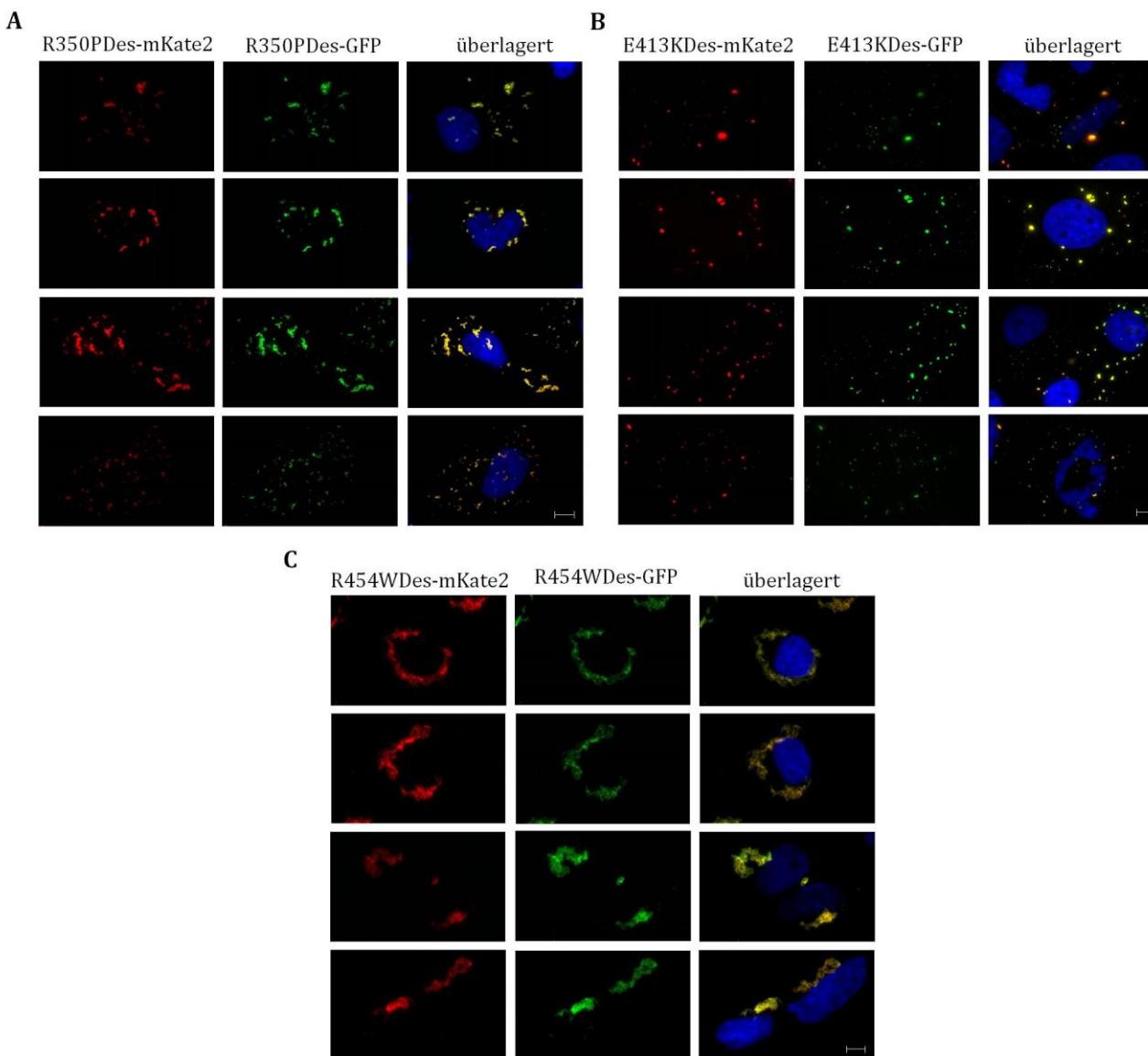
**Abbildung 43 SW-13 Zellen kotransfiziert mit wt Desmin-GFP und mutierten Desmin-mKate2 Varianten im Verhältnis 1:1.**

Dargestellt sind jeweils vier repräsentative Fluoreszenzbilder von SW-13-Zellen mit typischem Desminfilamentaufbau bzw. pathologischer Aggregatbildung bei koassembliertem wt- und mutiertem Desminprotein im Verhältnis 1:1 48 h nach Transfektion. **A** zeigt die vollständig ausgebildete Filamentassemblierung von zweifarbigem wt Desmin mit mKate2 bzw. GFP als Fluorophortag. **B** Kotransfektion von wt Desmin-GFP mit R350P Desmin-mKate2 ergab ein kolokaliertes, aber nicht durchgängiges Filamentgerüst, sondern mehr Proteinaggregate mit breiterer Größen-verteilung der Filamentbruchstücke und Aggregate. **C** E413K Desmin-mKate2 zeigte bei gleicher Proteinmenge mit wt Desmin-GFP kolokalierte, zahlreich kleinere, punktförmige Aggregate (ca. 20-50 pro Zelle). **D** R454W Desmin-mKate2 zeigte kotransfiziert mit wt Desmin-GFP keinen sichtbaren Unterschied zu reinem wt Desmin im Intermediärfilamentaufbau. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Maßstabsbalken 20µm.



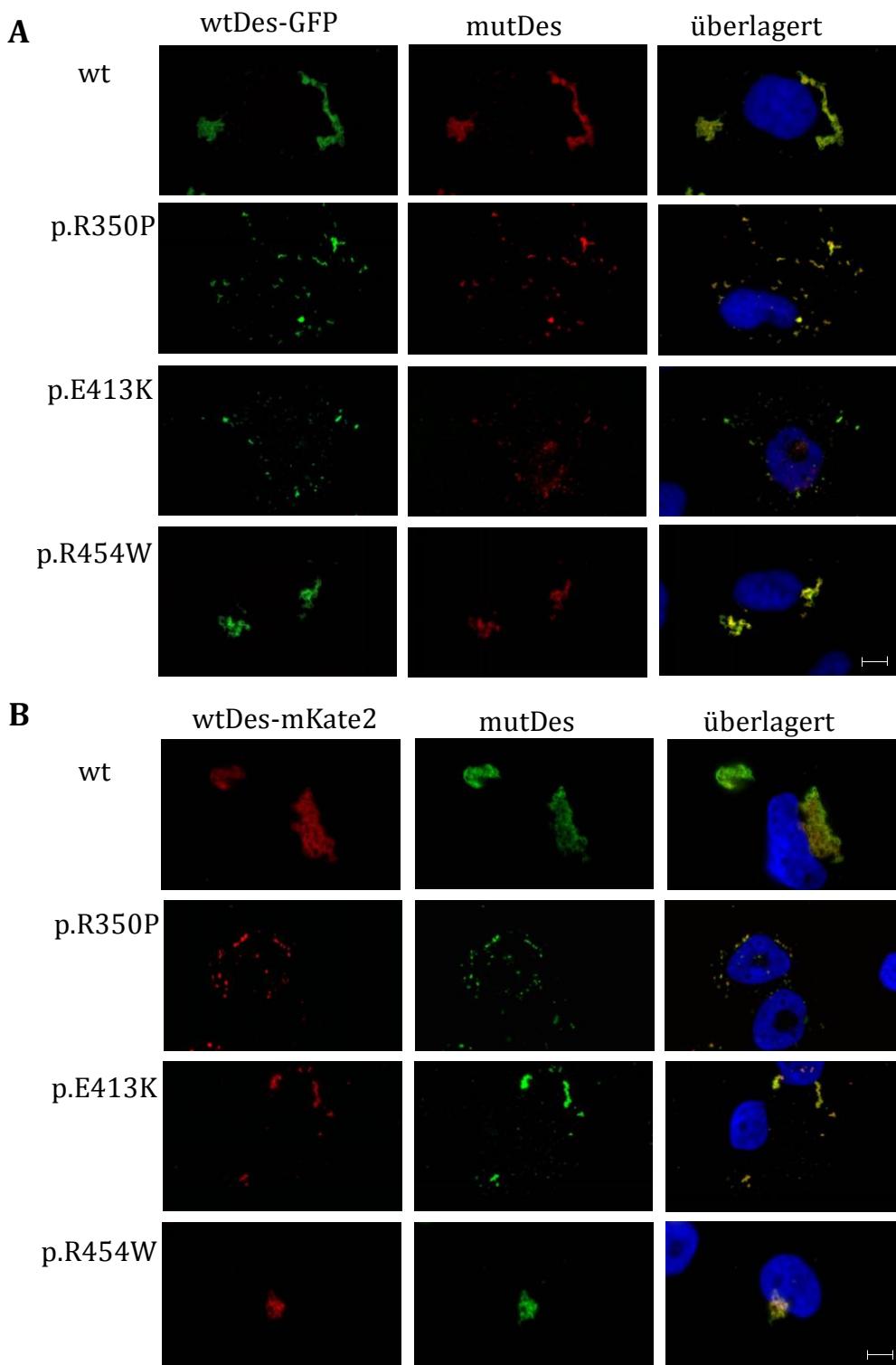
**Abbildung 44** SW-13 Zellen kotransfiziert mit wt Desmin-mKate2 und mutierten Desmin-GFP Varianten im Verhältnis 1:1.

Die jeweils vier dargestellten, repräsentativen Zellen von kotransfizierten wt Desmin-mKate2- mit mutiertem Desmin-GFP-Konstrukten zeigten repräsentativ den zellulären Aufbau von Desminfilamenten und -aggregaten in SW-13-Zellen 48 h nach Transfektion. **A** Wildtyp-Desmin-mKate2 bildete mit R350P Desmin-GFP kolokalisierte, unterschiedlich große Proteinaggregate und Filamentbruchstücke. **B** E413K Desmin-GFP zeigte wenig Interaktion mit wt Desmin-mKate2. Das mutierte Desmin lag vorwiegend in Aggregaten vor, wohingegen wt Desmin konsistent ein filamentöses Netzwerk bildete und nur zum Teil in den Aggregaten lag. **C** R454W Desmin-GFP bildete zusammen mit wt Desmin-mKate2 ein filamentartiges, zusammenhängendes Netzwerk. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Maßstabsbalken 20 µm.



**Abbildung 45 Kotransfektion von SW-13- Zellen kotransfiziert mit Desminmutanten getaggt mit GFP bzw. mKate2 im Verhältnis 1:1.**

Dargestellt sind jeweils vier typische SW-13-Zellen 48 h nach Transfektion, die koassembliertes und mutiertes Desmin-GFP mit mutiertem Desmin-mKate2 im Verhältnis 1:1 enthalten. **A** R350PDesmin zeigte eine flächendeckende, kolokalisierte Ansammlung an Proteinaggregaten mit unterschiedlichen Größen sowie Filamentbruchstücken. **B** E413K Desmin bildete kleinere, ähnlich große Proteinaggregate. **C** R454W Desmin koassemblierte mit sich selber zu einem ausgeprägten Filamentnetzwerk, das dem Wildtyp gleicht. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Maßstabsbalken 20µm.



**Abbildung 46** Kotransfizierte SW-13 Zellen im Verhältnis 1:1 mit getaggetem wt Desmin-GFP und mutiertem Desmin bzw. mit mutiertem Desmin-mKate2 und wtDesmin.

**A** Wildtyp-Desmin-GFP kolokalisiert mit mutiertem Desmin zu einem Desminfilament, das dem Filamentnetzwerk des getaggenen, zweifarbigem Gemisches aus wt und Mutante von Desmin entspricht: Wildtyp-Desmin bildet ein regelmäßiges, gleichförmiges Netzwerk aus. R350P Desmin kolokalisiert mit wt Desmin-GFP in großen Proteinaggregaten. E413K Desmin aggregierte zusammen mit wt Desmin-GFP zu gleichmäßig kleineren, punktförmigen Proteinaggregaten. R454W Desmin hatte auf wt Desmin-GFP keinen fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren Einfluss. **B** Wildtyp Desmin-mKate2 mit mutiertem Desmin, im Verhältnis 1:1 gemischt, ähnelt im Gerüstaufbau dem von **A**. Die Desminmutanten wurde mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Maßstabsbalken 20 µm.

## 6 Zweifarb-Fluoreszenzmarker-Ansatz: Interaktionen von Desmin im Zeitverlauf

Um eine Aussage treffen zu können, wie das pathologische und physiologische gemischtvorliegende Desminfilamentnetzwerk über eine gewisse Zeit entsteht und entsprechend vorliegt, wurde eine Zeitverlaufsanalyse der Filamentbildung von fixierten SW-13-Zellen an fünf verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion durchgeführt. Dazu wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 mit Wildtyp und mutiertem Desmin transfiziert, nach 8, 24, 48, 72, und 96 h fixiert und eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. Um den Einfluss der drei untersuchten Mutanten auf die physiologische Assemblierung zu untersuchen, wurden die Fusionsproteine Wildtyp-Desmin-GFP und die Mutanten bzw. der Wildtyp mit mKate2 getaggt im Verhältnis 1:1 wie folgt eingesetzt:

wt Desmin-GFP : wt Desmin-mKate2  
wt Desmin-GFP : R350P Desmin-mKate2  
wt Desmin-GFP : E413K Desmin-mKate2  
wt Desmin-GFP : R454W Desmin-mKate2

Nach 8 h konnte eine Verteilung der zunächst nur gering synthetisierten Proteine um den Zellkern bei allen Ansätzen erkannt werden. 24 h nach der Transfektion konnten bereits Desminfilamente bei reinem Wildtyp bzw. Aggregate bei Kotransfektionen mit mutiertem Desmin im Cytoskelett beobachtet werden. Bei allen transfizierten Desmingemischen kolokalisierte Wildtyp-Desmin mit dem pathologischen Protein spätestens nach 48 h.

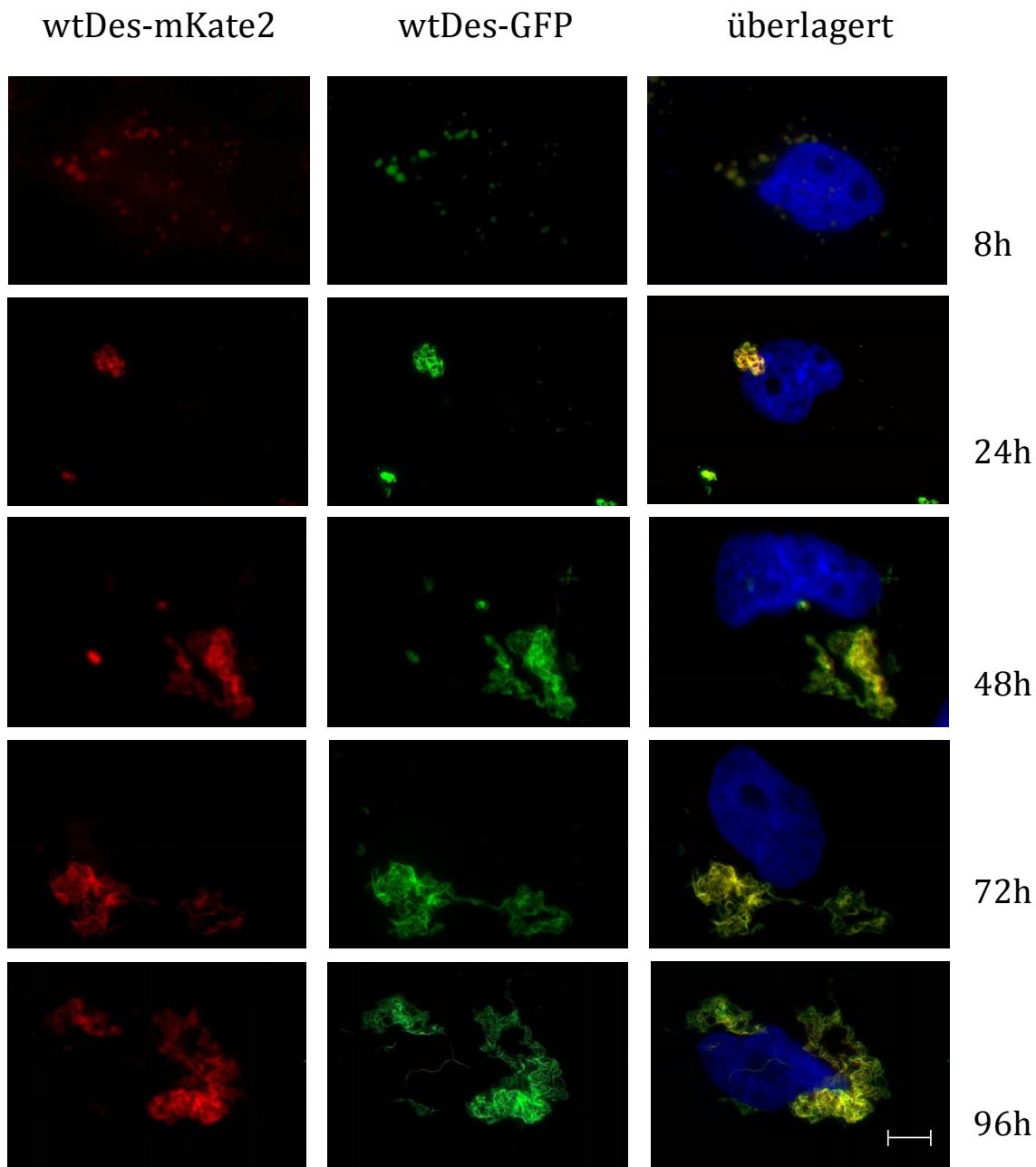
Im Vergleich zum 24 h-Zeitpunkt konnte nach 48 h ein vollständig ausgebildetes Desminfilamentnetzwerk bzw. Desminaggregate bei allen Ansätzen erkannt werden.

Bei reinem Wildtyp Desmin konnte sogar eine Zunahme des Filamentnetzwerks um das Fünffache der Fläche zwischen dem ersten und zweiten Tag nach Transfektion gezeigt werden.

Bei R350P Desmin war nach 24 h eine Ausbildung von Proteinaggregaten zu sehen, die sich 48 h nach Transfektion hinsichtlich Anzahl, Form und Größe nicht veränderten.

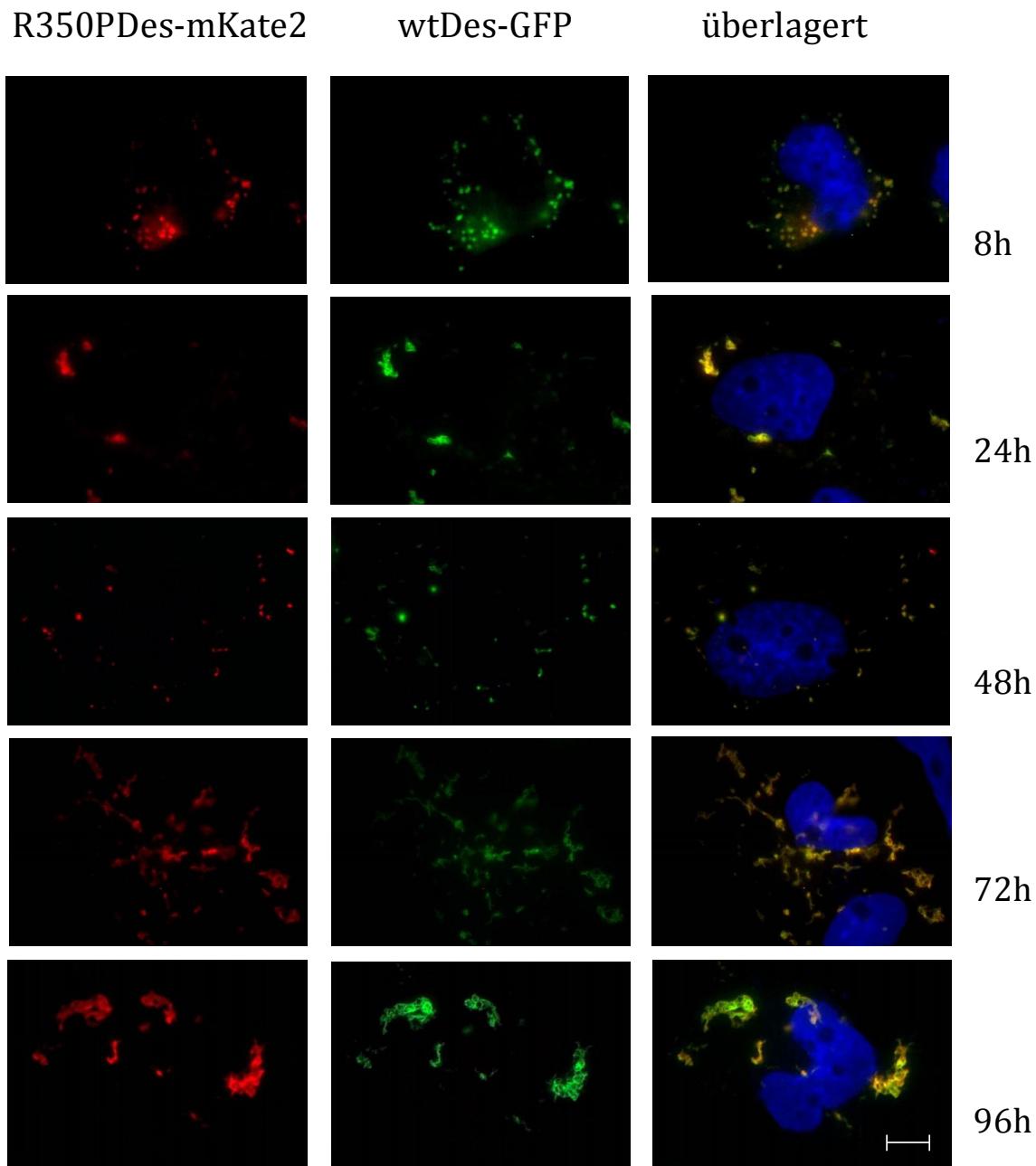
Bei Kotransfektion von Wildtyp- mit E413K Desmin-mKate2 war nach 48 h ein dominant negativer Einfluss der Mutante auf die physiologische Assemblierung zu erkennen, da bei diesem Zeitpunkt hauptsächlich punktförmige Aggregate vorlagen, die nach 24 h noch nicht zu sehen waren.

R454W Desmin-mKate2 zeigte nach 48 h eine sichtbare Kolokalisation mit Wildtyp Desmin-GFP. Die Desminfilamente von allen Konstrukten zeigten zum 72 h- bzw. 96 h- Zeitpunkt nach Transfektion im Vergleich zu 48 h keinen fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren, qualitativen Unterschied in Form, Häufigkeit und Größe des Desminnetzwerks.



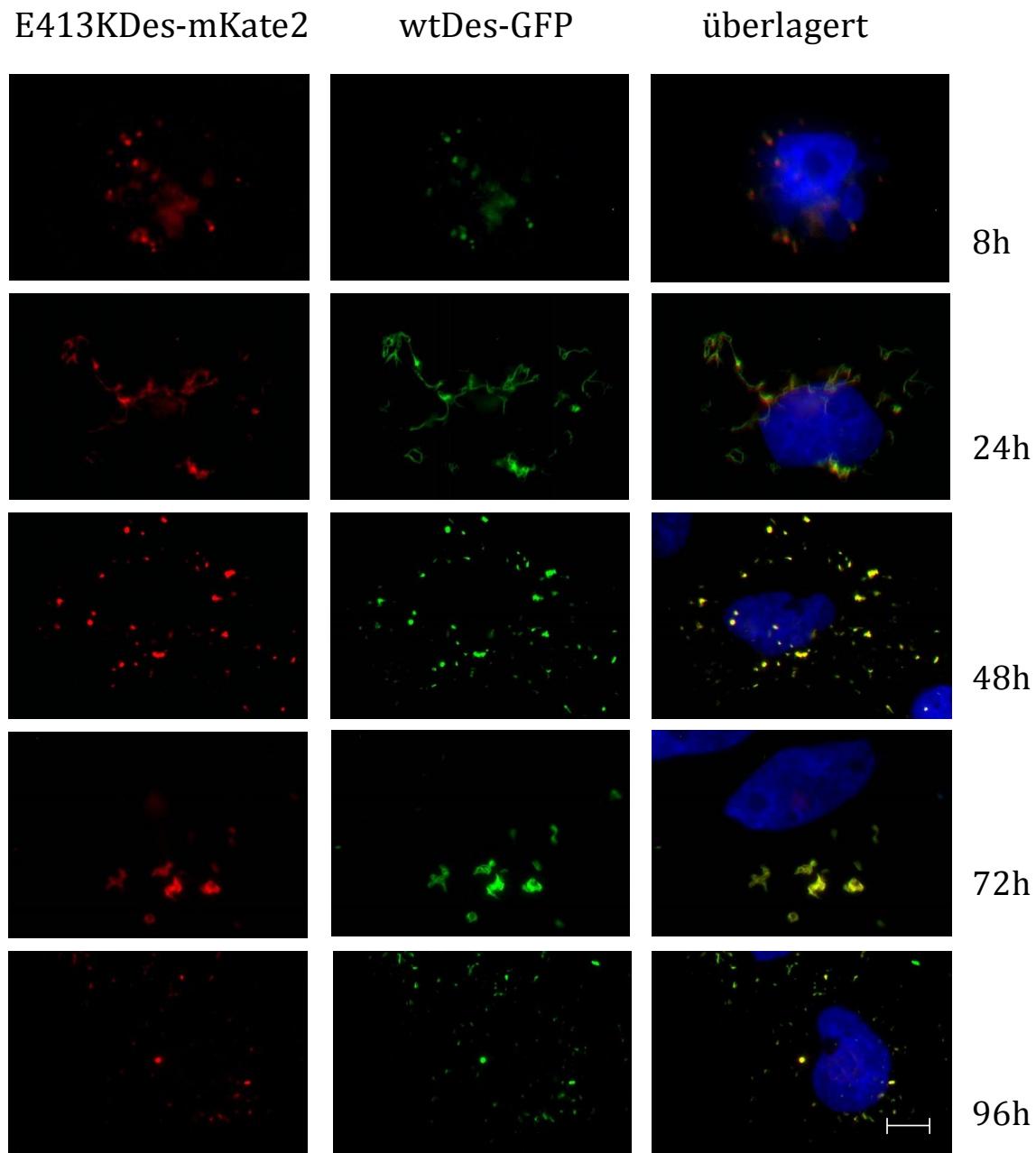
**Abbildung 47 Fluoreszenzmikroskopische Analyse im Zeitverlauf von kotransfiziertem wt Desmin-mKate2 und wt Desmin-GFP im Verhältnis 1:1 im SW-13-Zellkultursystem nach 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h transienter Transfektion.**

Die Desminexpression lag zu allen Zeitpunkten kolokalisiert vor. Nach 8 h lagen die fluoreszierenden Proteine in subzellulären Strukturen vor. Nach 48 h wurde ein vollständig ausgebildetes, physiologisches Filamentnetzwerk sichtbar, das auch nach 72 h bzw. 96 h noch persistierte und sich weder in Form, Häufigkeit und Größe im Zeitverlauf unterschied. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.



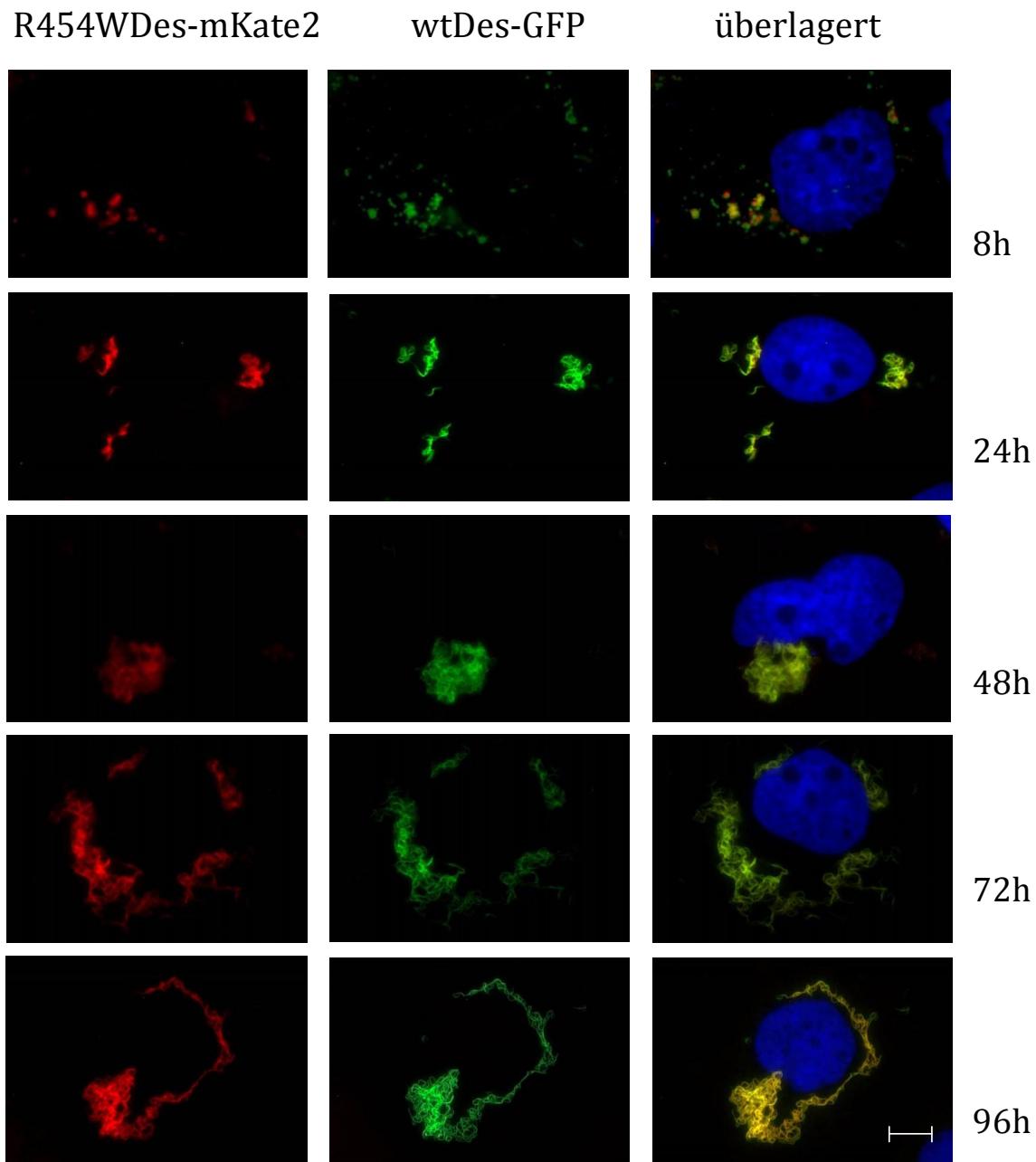
**Abbildung 48 Fluoreszenzmikroskopische Analyse im Zeitverlauf von kotransfiziertem wt Desmin-GFP und R350P Desmin-mKate2 im Verhältnis 1:1 in einem SW-13-Zellkultursystem nach 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h transienter Transfektion.**

Die Desminexpression beider Konstrukte lag zu allen Zeitpunkten kolokalisiert vor. Nach 8 h lagen die fluoreszierenden Proteine in subzellulären Strukturen vor, die am ehesten Endo- und Lysosomen entsprachen. Nach 24 h wurden pathologische Proteinaggregate gebildet, die nach 48 h ausgeprägter in Form, Häufigkeit und Größe vorlagen. Nach drei bzw. vier Tagen nach Transfektion konnten diese Aggregate im Vergleich zum 48 h-Zeitpunkt kaum unterschieden werden. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Maßstabsbalken 20 µm.



**Abbildung 49 Fluoreszenzmikroskopische Analyse im Zeitverlauf von kotransfiziertem wt Desmin-GFP und E413K Desmin-mKate2 im Verhältnis 1:1 im SW-13-Zellkultursystem nach 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h transienter Transfektion.**

Die grün- und rotfluoreszierenden Desminproteine lagen zu allen Zeitpunkten kolokalisiert vor. Nach 24 h fanden sich noch keine Aggregate. Erst nach 48 h entstanden punktförmige Proteinansammlungen, die denen bei Transfektion der Mutante ohne wt-Konstrukt glichen. Nach drei bzw. vier Tagen Transfektion konnten diese Aggregate von denen des 48 h-Zeitpunkts im Wesentlichen nicht unterschieden werden. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.



**Abbildung 50 Fluoreszenzmikroskopische Analyse im Zeitverlauf von kotransfiziertem wt Desmin-GFP und R454W Desmin-mKate2 im Verhältnis 1:1 in einem SW-13-Zellkultursystem nach 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h transiente Transfektion.**

Die grün- und rotfluoreszierenden Desminproteine lagen stets kolokalisiert vor. Nach 24 h waren erste Proteinfilamente erkennbar, die nach 48 h ein flächenmäßig größeres und ausgereifteres Filamentnetzwerk bildeten. Nach drei bzw. vier Tagen nach Transfektion durchzog ein dem wt Desmin ähnliches Filamentnetzwerk die ganze Zelle. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Maßstabsbalken 20 µm.

## 7 Immortalisierte Mausmyoblasten

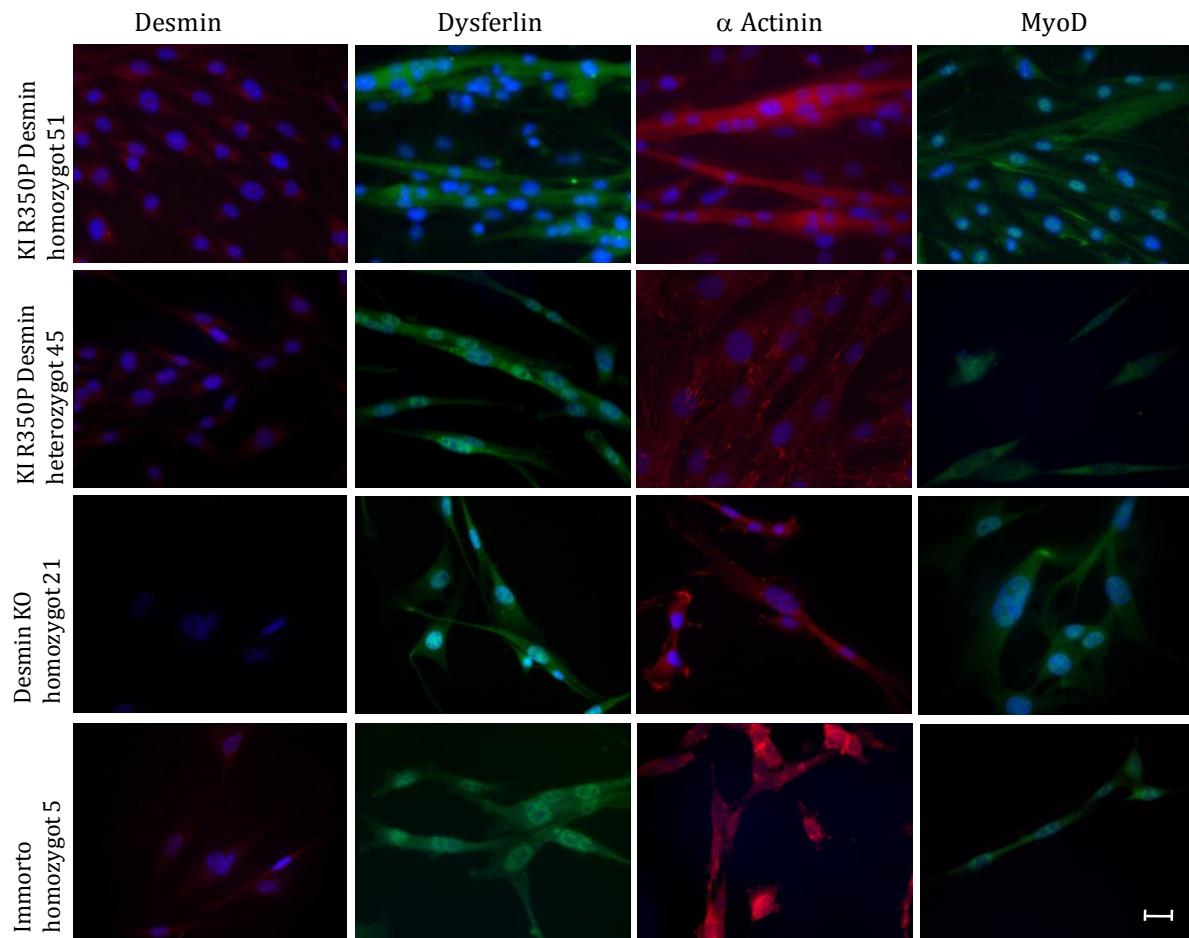
Nach der Isolierung der Mausmyoblasten und Kultivierung bei 33°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde versucht, die Myoblasten zu Myotuben zu differenzieren. Die Myoblasten wuchsen auf Kollagenbeschichteten Zellkulturplatten bzw. Deckgläsern hauptsächlich in regelmäßig angeordneten Kolonien. Nach Austausch von *Immortal Growth Medium* gegen Fusionsmedium mit 2% Pferdeserum konnte vereinzelt eine spontane Fusion der Myoblasten zu Myotuben bei hoher Zellkonfluenz beobachtet werden.

Dazu wurden folgende Myoblasten mit entsprechendem Genotyp erfolgreich isoliert und in höheren Passagen kultiviert:

Maus-Nummer	Vorhandener Genotyp in den Myoblasten	
	<i>Desmin</i>	<i>Immortogen</i>
Nr. 51	human p.R350P Knockin homozygot	heterozygot
Nr. 43	human p.R350P Knockin heterozygot	heterozygot
Nr. 21	Knockout homozygot	heterozygot
Nr. 05	-	homozygot

**Abbildung 51 Genotyp und Bezeichnung der isolierten immortalisierten Mausmyoblasten.**  
Das heterozygot vorliegende Transgen H-2Kb-tsA58 gewährleistet eine ausreichende Immortalisierung der Zellen und wurde entsprechend bei der Genotypisierung bestätigt (Morgan, Beauchamp et al. 1994).

Alle vier Zelllinien wurden unabhängig mit muskelspezifischen Proteinmarkern immunfluoreszent gefärbt. Für die Zelllinien Nr. 51, 43, und 05 konnten Desmin, Dysferlin, α-Actinin und MyoD in den Myotuben nachgewiesen werden, was den myogenen Charakter der Zellen bestätigte. Die Desmin Knockout Zelllinie (Nr. 21) besaß, wie erwartet, kein Desmin (siehe Abbildung 52).



**Abbildung 52 Immunfluoreszenzfärbung von immortalisierten Mausmyoblasten und Myotuben.**  
 Antikörper-Färbung verschiedener isolierter Mausmyoblasten-Linien gegen Marker der myogenen Differenzierung: Desmin, Dysferlin, alpha-Actinin und MyoD. Mausmyoblasten mit einem Knockin der humanpathogenen R350P Desminmutante in homozygoter und heterozygoter Form konnten zu Myotuben differenziert werden. Die Färbung mit den verwendeten muskelspezifischen Proteinmarkern war positiv mit Ausnahme von Desmin in der homozygoten Desmin KO-Zelllinie #21. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Maßstabsbalken 50 µm.

## F Diskussion

### 1 Einsatz von Far-Red anregbaren Fluorophoren in der SIFT Methode

Desminopathiepatienten mit den untersuchten pathogenen Desminmutationen p.R350P, p.E413K und p.R454W tragen neben dem mutierten Allel ein physiologisch funktionelles Wildtyp Desminallel. Die Pathomechanismen, die erst in späteren Lebensjahren zur klinischen Symptommanifestation führen, konnten bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Bereits in früheren Veröffentlichungen wurde bei Koexpression von aufgereinigtem Wildtyp Desmin und mutiertem Desminprotein ein dominant negativer Einfluss der Mutante gezeigt (Bar, Fischer et al. 2005, Bar, Mucke et al. 2006, Bar, Goudeau et al. 2007, Bar, Sharma et al. 2009). Die Zusammensetzung und molekulare Architektur der beobachteten, pathologischen Proteinansammlungen blieb bislang offen.

Die einfarbige Einzelmolekülfloreszenzanalyse ist eine gut etablierte Methode zur Charakterisierung von einzeln vorliegenden mutierten Desminproteinfilamenten und -aggregaten (Levin, Bulst et al. 2010). Um den pathogenen molekularen Mechanismus einer heterozygot vorliegenden Desminmutante neben dem funktionellen Wildtyp Desmin besser zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die Methodik der Einzelmolekülfloreszenzspektroskopie für *in vitro* Interaktionsanalysen im Zweifarbensatz erweitert. FCS und SIFT detektieren hochsensitiv die entstandenen zweifarbigen Oligomere fluoreszenzmarkierter Proteine. Der dafür eingesetzte FCS Reader konnte schon zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens von aufgereinigten Tau- und Synucleinproteinen eingesetzt werden, die eine zentrale Rolle in der molekularen Pathogenese der Alzheimer- bzw. Parkinsonerkrankung spielen (Bieschke, Giese et al. 2000, Giese, Bieschke et al. 2000, Giese, Bader et al. 2005). Allerdings wurden bei diesen Untersuchungen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper verwendet, um die untersuchten, verschiedenen Proteine durch Fluoreszenzanregung bei 488 oder 633 nm sichtbar zu machen. In der vorliegenden Arbeit wurde Desmin als Fusionsprotein mit fluoreszenten Proteinen in der Zellkultur rekombinant exprimiert und anschließend extrahiert. Der Einsatz von GFP als Fluoreszenzmarker wurde bei den bereits erwähnten einfarbigen Filamentcharakterisierungen etabliert. Für zweifarbige Einzelmolekülexperimente war neben dem validierten GFP ein Far-Red anregbares Fluoreszenzprotein notwendig, das idealerweise gering bleicht, monomer vorliegt und die Desminfilamentassemblierung nicht beeinflusst.

## 1.1 PSmOrange

Das erste in Frage kommende Fluorophor PSmOrange konnte erfolgreich photokonvertiert werden, was durch Messungen im Fluorimeter bestätigt wurde. Allerdings musste die Laserleistung für eine Photokonvertierung im Vergleich zu den veröffentlichten Daten (Subach, Patterson et al. 2011) um fast das 10fache erhöht werden, um ein Fluoreszenzsignal im Far-Red Bereich sehen zu können. Eine generell hohe erforderliche Laserleistung lässt sich durch die nicht lineare, zweifache Elektronenübertragung erklären. Für die Photokonvertierung von exprimiertem PSmOrange in Zellextrakten war in der entsprechenden Vorrichtung ein großes Zellvolumen nötig, das bei der anschließenden hochsensitiven SIFT Methode nicht erforderlich ist.

Eine erfolgreich durchgeführte Photokonvertierung von PSmOrange konnte in Zebrafischembryozellen mit einem 488 nm Laser und bei 17 bis 18 mW Leistung beobachtet werden (Beretta, Dross et al. 2013). Die Photokonvertierung von der orangefarbigen in das Far-Red anregbare Protein PSmOrange erfolgte nicht wie in der Literatur angegeben bei einer Anregungswellenlänge von  $480 \pm 40$  nm, bei der eine maximale Photokonvertierungsrate erreicht werden kann, sondern bei einer immer noch ausreichender Wellenlänge von 532 nm, um bei kotransfizierten GFP- und PSmOrange-getaggten Desminkonstrukten in Zelllysaten die Gefahr des Bleichens von GFP bei 480 nm Anregungswellenlänge über einige Minuten zu vermeiden. Die Messungen des photokonvertierten PSmOrange Fluorophors im Insight Reader ergaben eine zu geringe Helligkeit (kHz) pro Partikel, sodass die Verwendung für weitere zweifarbige Einzelmolekülversuche nicht sinnvoll war (siehe Abbildung 29). Die Messsensitivität von fluoreszenden Proteinen in Zelllysaten im FCS -Reader lag ohnehin im unteren Bereich des Sensitivitätsspektrums.

Der zweifarbige Ansatz mit PSmOrange als rotfluoreszierendem Farbstoff für zweifarbige Interaktionsstudien wurde aufgrund der zeitaufwändigen Photokonvertierung sowie der geringen Helligkeit in der Einzelmolekülanalyse nicht weiter verfolgt.

## 1.2 Fehlendes FRET-Potential von mKate2

Das zweite infrage kommende Far-Red anregbare Fluoreszenzprotein, das dabei nicht direkt mit 633 nm angeregt, sondern über FRET mittels GFP angeregt werden sollte, war mKate2. Die erforderliche geringe Distanz zwischen GFP und mKate2 unter 10 nm für Anregbarkeit über FRET ist theoretisch bei regulärer Dimerbildung von Desmin gegeben. Jedoch wurden keine differenzierten FRET-Signale erreicht und es stellte sich unerwarteterweise heraus, dass mKate2 direkt im Bereich von 488 nm angeregt werden konnte. Eine direkte und indirekte Anregung konnte nicht mehr unterschieden werden. Ein Interaktionsnachweis von GFP- und mKate2- getaggtem Desmin rein über FRET war deshalb nicht zielführend. Es konnte daraufhin nur der Anteil an zweifarbigem, großen Teilchen bestimmt werden, der keine quantitative, sondern nur

eine qualitative Aussage über die Zusammensetzung der Oligomere aus Wildtyp und mutierten Desminmolekülen zulässt.

Ein gelungenes FRET-Experiment bei Brodehl *et al.* mit dem Fluorophorpärchen eCFP (enhanced cyan fluorescent protein) und eYFP (enhanced yellow fluorescent protein) als C-terminale Tags an Wildtyp Desmin und Desminmutanten zeigte kcotransfiziert FRET-Signale, mit dem Ergebnis, dass die Desminfilamente und -aggregate heterogen aus beiden Desminvarianten bestehen (Brodehl, Hedde et al. 2012). Reines Wildtyp Desmin bildete Filamente mit unterschiedlicher Länge. Kcotransfiziert mit den unterschiedlichen pathogenen Desminmutanten ergaben sich FRET Signale, die nur bei einer entsprechender Interaktionsnähe von einem Wildtyp-Molekül mit einem mutiertem Desminmolekül entstehen können. Mutiertes Desmin verhinderte je nach Mutation teilweise oder ganz einen funktionellen Filamentaufbau (Brodehl, Hedde et al. 2012).

## 2 Verwendete Zellsysteme

Eine homozygote Transfektion von Desmin in verschiedenen Zellsystemen als *in vitro* Modell entspricht nicht der heterozygoten *in vivo* Situation in betroffenen Patienten. Um den heterozygoten Zustand *in vitro* kontrolliert nachzuahmen, musste Wildtyp Desmin endogen oder extrinsisch kcotransfiziert neben dem mutierten Desmin vorhanden sein. Für eine Reihe von Desmin-Filamentuntersuchungen wurden überwiegend Mausmyoblasten (C2C12, C2.7), MCF-7 Zellen (humane Brustkrebszellen) und SW-13-Zellen (humane Adenokarzinomzellen) verwendet, wobei MCF-7 und SW-13 Vimentin-negativ sind (Goudeau, Dagvadorj et al. 2001, Klauke, Kossmann et al. 2010, Segard, Delort et al. 2013). SW-13-Zellen sind ein ideales Zellkultursystem, um zu untersuchen, ob mutierte IF-Proteine physiologisch-funktionelle Filamente ausbilden (Muñoz-Marmol, Strasser et al. 1998, Dalakas, Park et al. 2000).

Es wurde in dieser Arbeit versucht, von dem bereits etablierten Ansatz von Levin *et al.* abzuweichen, in welchem die Desminfilamente sowohl in SW-13 als auch in HEK293-Zellen beschrieben und verglichen wurden. So sollte die zelluläre mit der molekularen Desminfilamentbildung in einem einzigen Zellsystem verglichen werden. Die fluoreszenzmikroskopische Auflösung der IF-Filamente erwies sich im HEK293-Zellkultursystem aufgrund der kleineren Zellgröße als zu gering und erschwerte die Beurteilung der rekombinanten Filament- und Aggregatspezies. Deshalb wurden Proteinextrakte von SW-13-Zellen in der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie vermessen. Jedoch befanden sich zu wenig messbare Fluoreszenzproteine in einem SW-13-Zelllysat, sodass der bewährte Vergleich der Desminfilamente auf zellulärer und molekularer Ebene zwischen SW-13- und HEK293-Zellen fortgesetzt wurde.

Die hier verwendeten Zellen für die zellulären, bildgebenden Daten waren SW-13-Zellen, da diese kein endogenes Desmin und ein vergleichsweise größeres Cytoplasma mit einer besseren Filamentauflösung besaßen. Für die molekularen Daten wurden HEK293-Zellen verwendet, da

sich diese bereits in der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bewährt hatten und die ausgewerteten Daten sich mit den Filamentbildungen aus den Fluoreszenzmikroskopiebildern deckten (Levin, Bulst et al. 2010). In anderen publizierten Arbeiten wurden HEK293-Zellen auch als stabil transfizierte Zelllinien eingesetzt, um das Aggregationsverhalten verschiedener Desminmutanten zu charakterisieren (Wang, Klevitsky et al. 2003, Liu, Chen et al. 2006).

Für die Einzelmolekülanalysen von aggregierten Proteinen, die eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer spielen, wurde aufgereinigtes Protein verwendet, das mit AlexaFluor-gekoppelten Antikörpern fluoreszenzmarkiert wurde. Im Gegensatz zu den mit Antikörpern markierten Proteinen besitzt ein Fluoreszenzproteininfusionskonstrukt konstant einen Fluorophor, sodass ein detektiertes Fluoreszenzsignal auch einem Desminmolekül entspricht. Generell liegt die Messsensitivität von nicht-aufgereinigten Proteinen, die aus Gesamtzelllysaten stammen und neben unspezifischen Zellbestandteilen vorliegen, im unteren Detektionsbereich z.B. bei der Einzelmolekülspektroskopie.

### 3 Überprüfung der quantitativen Proteinexpression

Die rekombinante Proteinexpression der transient transfizierten Zelllinien HEK293 und SW-13 wurde mit Hilfe von Western-Blots überprüft und densitometrisch über ImageJ semiquantitativ bestimmt. Generell ist die Quantifizierung über Western-Blot von mehreren Faktoren abhängig und kann eine hohe Schwankungsbreite bei multiplen unabhängigen Experimenten ergeben: Die eingesetzten primären und sekundären Antikörper können unterschiedlich spezifisch binden, was sich wiederum in der Fläche der detektierten Banden bemerkbar macht. Die Qualität der Zelllyse kann trotz gleicher Durchführung unterschiedlich effizient sein, was die extrahierte Proteinmenge von der Lyseart und Lysequalität abhängig macht.

Im Western-Blot konnte bei beiden Zelllinien gezeigt werden, dass die Expression der Fusionsproteine Desmin-GFP und Desmin-mKate2 in einer ähnlichen Größenordnung, aber generell niedriger als bei Desminkonstrukten ohne fluoreszentes Proteintag ist. Diese Gegebenheit lässt sich möglicherweise durch eine gewisse Zelltoxizität der Fluorophore erklären: Bei Liu *et al.* wurden vier unterschiedlichen Zelllinien, die mit GFP transfiziert wurden, in einem Zeitraum von 96 h beobachtet. Interessanterweise fand sich eine Apoptoseinduktion durch GFP (Liu, Jan et al. 1999). Dieser Zusammenhang zwischen der GFP Expression und der Zellapoptose konnte auch beobachtet werden, als GFP intensiv über einen längeren Zeitraum in lebenden Zellen angeregt wurde und sich toxische Radikale bildeten (Clontech 2001). Bei mKate2 wurde noch keine Zelltoxizität *in vitro* nachgewiesen. Der Hersteller des Fluorophors schließt allerdings eine niedrige Toxizität in lebenden Zellen nicht aus (Shcherbo, Murphy et al. 2009).

Die quantitative Expression von rekombinant überexprimierten Proteinen in Zelllysaten nach Auftrennung über SDS-PAGE kann auch über eine Coomassie Färbung des Proteingels

nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch die entsprechenden Proteinbanden nicht eindeutig den Fluorophoren bzw. den Fusionskonstrukten zugeordnet werden, da sich die gesuchte Bande im Vergleich zur Mock-transfizierten Kontrolle nicht durch vermehrte Intensität aus dem Bandenmuster des Hintergrunds hervorhob.

Der Proteinexpressionsnachweis über Western-Blot ergab Proteinbanden auf der zu erwartenden Höhe des bekannten Molekulargewichts. Es wurden keine unspezifischen Proteinbanden angefärbt, was möglicherweise auf proteolytisch abgebauten oder modifizierten Proteinen hinweisen könnte.

Vergleicht man die Expressionsrate von Desminproteinen in den SW-13-Zellen (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37), so zeigte sich eine signifikante Diskrepanz zwischen ungetaggtem Desmin und Desmin-mKate2 sowohl beim Wildtyp als auch bei den Mutanten. Möglicherweise lässt sich dieser Expressionsunterschied damit erklären, dass die Proteine auf zwei unterschiedlichen Nitrozellulose-Membranen aufgetrennt und miteinander verglichen wurden. Quantitativ fand sich jedoch kein Expressionsunterschied der Desmin-mKate2-Konstrukte in den vier untersuchten SW-13-Zellextrakten.

In den HEK293-Zelllysaten konnten keine signifikant abweichenden Proteinexpressionen zwischen Desmin und Desmin-GFP bzw. Desmin-mKate2 gezeigt werden. Die leichte Abweichung im Expressionsniveau der getaggten Desminkonstrukte lässt sich möglicherweise durch die zeitintensivere Translation der längeren Fusionsproteine begründen, sodass deren Expression nach einer gewissen Zeitspanne geringer ausfällt.

## 4 Qualitative und quantitative Interaktionsanalysen

Die Charakterisierung von zweifarbigem, nativ vorliegenden Desminfilamenten auf zellulärer und molekularer Ebene stieß durch mehrere Aspekte an ihre Grenzen: Der Vergleich von funktionellem Desmin mit den drei mutierten Desminformen R350P, E413K und R454W, hinsichtlich zellulärem und molekularem Verhalten konnte trotz Optimierung der Transfektionsrate nicht aus den gleichen Zelllinien erfolgen, sondern es wurde für die bildgebende Darstellung SW-13 und für die einzelmolekularen Analysen HEK293-Zellen verwendet. Die geeigneten Fluoreszenzproteinpärchen für einen rot-grünen Interaktionsansatz stellten sich im Verlauf des Projekts als wenig geeignet dar, um die Architektur von zweifarbig markierten Filamenten detaillierter zu beschreiben und konnten deshalb nur begrenzt eingesetzt werden. Die Adaption der Einzelmolekülanalyse im FCS Reader an Zelllysaten erreichte ihre Grenzen bezüglich der Messsensitivität, da die Desminaggregationsrate und somit die Anzahl an detektierbaren Teilchen gering ist. Zudem musste das Signal stark genug sein, um es aus dem hohen Hintergrundrauschen filtern zu können.

## 4.1 Konventionelle Mikroskopie

Da in dieser Arbeit von ca. zwanzig Zellen die nativ vorliegenden Desminassemblierungen bzw. -aggregate bei koexistierenden Wildtyp Desmin und mutiertem Desmin dokumentiert wurden, können die vier ausgewählten Zellen in Abbildung 43-46 als repräsentativ angesehen werden. Im Folgenden werden die Desminmutante und die Wildtypform ohne ihre Fluorophortags benannt, da außer bei der Kotransfektion E413K mit Wildtyp Desmin kein beträchtlicher Unterschied der Koassemblierung bei verschiedenen markierten Proteinen beobachtet werden konnte.

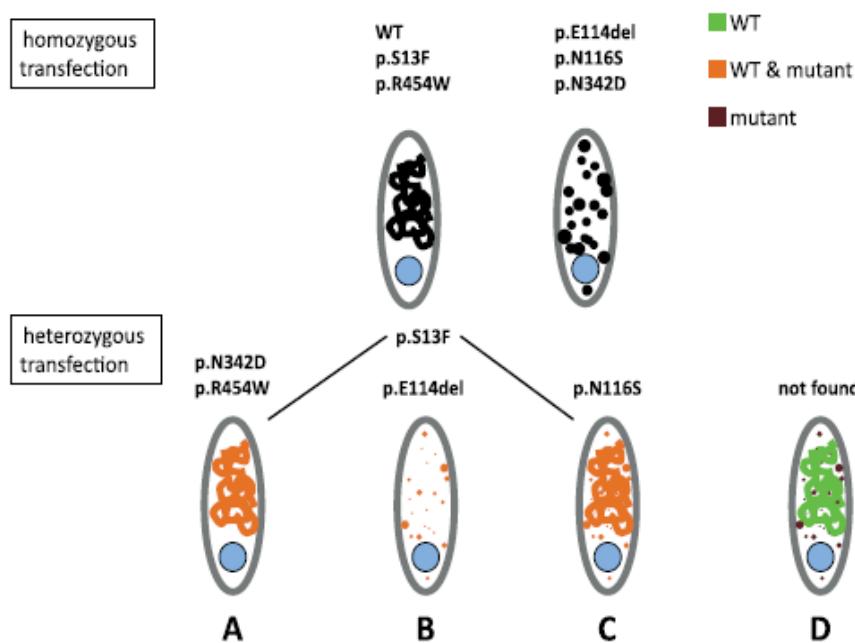
Der Einfluss der mutierten Desminspezies auf das funktionelle Wildtyp-Desmin konnte vor allem bei R350P Desmin und E413K Desmin offensichtlich erkannt werden, ungeachtet dessen, mit welchem Fluorophor es markiert vorlag: Bei Kopolymerisation von Wildtyp Desmin mit R350P Desmin lagen keine funktionellen, über das ganze Cytoplasma verteilten Desminfilamente mehr vor, sondern zweifarbig, kolokalisierte Aggregate neben Filamentbruchstücken. Die Filamentassemblierung unterschied sich bei heterozygot transfizierten Mutanten zur homozygoten Variante, wobei bei homozygoter Transfektion ausschließlich große Aggregate vorzufinden waren. Diese neue Erkenntnis bei der Mutante R350P deckt sich mit dem postulierten Modell von Brodehl *et al.* und würde dem schematischen Modell C entsprechen, bei welchem im Wildtyp Desmin-Netzwerk mutierte Desminmoleküle inkorporiert vorliegen (siehe Abbildung 53). Die heterogenen zellulären Resultate, wie sie bei R350P Desmin vorkommen, können den variablen Phänotyp der Erkrankung innerhalb einer betroffenen Familie mit R350P Desminmutation *in vivo* entsprechen.

E413K Desmin-mKate2 aggregierte mit Wildtyp Desmin-GFP ebenfalls in Proteinansammlungen, allerdings lagen diese punktförmig und gering grösßenverteilt vor. Eine Kolokalisation konnte auch hier bestätigt werden. Demnach müsste diese Mutante dem Schemata B aus Abbildung 53 entsprechen, da keine filamentartigen Strukturen zu beobachten waren. Bei der umgekehrten Markierung mit E413K Desmin-GFP und Wildtyp Desmin-mKate2 ergaben sich neben Aggregaten auch flächige Filamente, die nur aus Wildtyp Desmin-mKate2 bestanden und die Aggregate umgaben. Die Aggregate selbst bestanden sowohl aus grünmarkiertem E413K Desmin als auch aus rotmarkiertem funktionellem Wildtyp Desmin. Möglicherweise hatte bei dieser Kombination von E413K-Desmin und Wildtyp Desmin der Fluorophortag mit einer Größe von ca. der Hälfte des Molekulargewichts von Desmin einen Einfluss auf die Assemblierung.

R454W-Desmin zeigt keinen zellulären Einfluss auf die Assemblierung des IF-Proteins, da kotransfiziert mit Wildtyp Desmin ausgeprägte IF-Filamente über das ganze Cytoplasma verteilt vorlagen. Diese Mutante wurde ebenfalls bei Brodehl *et al.* hinsichtlich der Interaktion mit Wildtyp Molekülen untersucht. Die Arbeitsgruppe kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Mutante R454W-Desmin keinen fluoreszenzmikroskopisch fassbaren Einfluss auf die Filamentbildung hat und zusammen mit den Wildtyp Desminmolekülen im Filamentnetzwerk

koassembliert (Modell A Abbildung 53). Allerdings konnte auf molekularer Ebene ein geringerer Anteil an physiologisch interagierenden Desminteilchen im Vergleich zu Wildtyp Desmin detektiert werden.

Bei Brodehl *et al.* konnte mit anderen pathogenen Desminmutanten, die mit Wildtyp Desmin kotransfiziert wurden, auch eine Mischform aus den einzelnen postulierten Assemblierungsmodellen A-C gezeigt werden. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Desmin-Punktmutanten konnte dies nicht beobachtet werden, sondern die IF-Assemblierungen lagen konsistent, weitgehend wie in den Abb. 47-50 repräsentativ gezeigten Zellen vor.



**Abbildung 53 Vergleichendes Modell der Filament- und/oder Aggregatbildung bei homozygot und heterozygot transient transfizierten Desminmutanten in Kulturzellen.**

Brodehl *et al.* postulieren, dass bei heterozygot transfiziertem Desmin-Genotyp die Desminfilamente anders assemblieren als bei homozygot vorliegenden Desminmutanten. Die Auswirkungen bei Koexpression der Desminmutante können folgendermaßen beobachtet werden: **A** Reine Filamentbildung, Inkorporation von mutierten und Wildtyp-Molekülen in die gleichen Filamente. **B** Nur Aggregate entstehen, die aus gemischten Wildtyp- und mutierten Molekülen bestehen. **C** Aggregate und Filamente werden von kolokalisierten mutierten und Wildtyp-Desminmolekülen in einer Zelle gebildet. **D** Aggregate und Filamente befinden sich gleichzeitig in derselben Zelle, Wildtyp-Desmin bildet Filamente und mutiertes Desmin liegt unabhängig davon in Aggregaten vor. Die hier untersuchten Desminmutanten sind mit Kardiomyopathien assoziiert (Brodehl, Hedde *et al.* 2012).

In der Zeitverlaufsanalyse beobachteten wir 8 h nach Transfektion der SW-13-Zellen mit Wildtyp Desmin-GFP und mutiertem Desmin-mKate2 eine Lokalisation der fluoreszenzmarkierten Proteine um den Zellkern. Dies spricht für eine Aufnahme der DNA über Endo- und Lysosomen, jedoch gegen eine frühe Proteinsynthese in den Ribosomen (Coonrod, Li *et al.* 1997). Nach 24 h wurden die Filamente noch nicht vollständig in ihrer Größe gebildet. Erst nach 48 h konnten

komplett ausgereifte Filamente und Aggregate beobachtet werden. Eine Inkorporation von Wildtyp Desmin in das mutierte Desmingerüst konnte zu allen Zeitpunkten beobachtet werden, auch noch 96 h nach Transfektion.

## 4.2 Quantitative SIFT Analyse

Der heterogene, pathogene Molekularmechanismus von mutiertem Desmin konnte noch nicht geklärt werden. Ein dominant negativer Effekt der drei untersuchten Desminmutanten R350P, E413K und R454W auf das funktionelle Desminnetzwerk konnte bereits im Elektronenmikroskop bewiesen werden. Allerdings wurden hier aufgereinigte Proteine untersucht, bei denen die physiologischen, umgebenden Zellbedingungen fehlten. Deshalb wurden in dieser Arbeit Zellen ohne endogenes Desmin verwendet, die Desmin transient exprimieren.

Das Desminfilament stellt ein komplexes Geflecht dar, das die Muskelfasern in quergestreiften Muskelzellen organisiert. Um die veränderte molekulare Beschaffenheit des Filamentnetzwerks bei vorliegendem mutierten Desminprotein in Anwesenheit von funktionellem Wildtyp Desmin beschreiben zu können, wurden die rot und grün fluoreszenzmarkierten Desminformen *in vitro* exprimiert und in der Einzelmolekülanalyse im Hochdurchsatzverfahren untersucht. Eine Aussage über die detaillierte Architektur von entstandenen Desminfilamenten und -aggregate konnte jedoch nicht getroffen werden. Die verwendeten Fluorophore mKate2 und PSmOrange lieferten in Anwesenheit von GFP nicht auswertbare Daten: PSmOrange zeigte eine zu geringe Partikelhelligkeit wie auch mKate2, das sowohl direkt als auch indirekt über FRET wenig angeregt werden konnte. Die roten Fluorophore erwiesen somit eine limitierte Anwendung in der Einzelmolekülspektroskopie auf. Zudem stieß die Methodik an ihre Grenzen, da zu wenig detektierbare Aggregate in einem Zelllysat bei ebenso geringer Transfektionsrate vorhanden waren. Der Anteil der interagierenden großen Desminmoleküle an der Gesamtzahl der detektierten Teilchen konnte allerdings über die Einzelmolekülanalyse bei rotgrüner Fluoreszenzanregung bestimmt werden (siehe Abbildung 42).

Wildtyp Desmin zeigte den höchsten Anteil mit 17,73% an interagierenden Teilchen. Dies spricht für das Vorliegen von funktionellem Desmin als ausgebildete Filamente mit hoher molekularer Interaktion von farblich unterschiedlich markierten Molekülteilchen. Außerdem scheint die Architektur geordneter zu sein, da der Anteil an zweifarbigem Spezies hier am höchsten war.

R350P Desmin zeigte den geringsten Anteil mit 3,70%. Der geringe Anteil erklärt das überwiegende Vorliegen von pathologischen Aggregaten, bei dem mutierte Desminpartikel kaum mit Wildtyp Desminteilchen interagieren. Die beobachteten Filamentbruchstücke von R350P Desmin mit Wildtyp Desmin in SW-13-Zellen scheinen aus wenig koassemblierten R350PDesmin und Wildtyp zu bestehen, da sonst der zweifarbig Anteil an großen Molekülen höher wäre.

E413K Desmin-mKate2 und Wildtyp Desmin-GFP hatten einen Anteil an zweifarbig interagierenden größeren Molekülen von 5,30%. Der etwas erhöhte Wert gegenüber R350P

Desmin lässt sich durch das reine Vorliegen von zweifarbigem, kolokalisierten Aggregaten erklären. Dies lässt auf mehr Interaktionspotential zwischen der Mutante E413K und der Wildtypform des Desminproteins schließen.

Den am wenigsten ausgeprägten Phänotyp hinsichtlich der klinischen, zellulär filamentösen und molekularen Beschaffenheit besitzt p.R454W Desmin. In Anwesenheit von 50% Wildtyp Desminmolekülen assemblierte R454W Desmin nach wie vor zu einem Filamentnetzwerk, allerdings zeigt sich, molekular betrachtet, bei der Anteilsbestimmung der interagierenden zweifarbigem großen Partikel ein Unterschied zu reiner Wildtyp-Filamentbildung: Der errechnete Wert war bei 7,62% und lag somit signifikant unter dem Wert von Wildtyp Desmin. Dies spricht für das Vorliegen physiologischer Assemblierungen, jedoch in geringerer Menge. Der schwache Einfluss auf die Filamentbildung könnte durch ein geringeres Expressionsniveaus der Desminmutante oder durch eine zellprotektiven Funktion von Chaperonen erklärt werden (Bar, Goudeau et al. 2007). Generell spricht der geringere prozentuale Anteil der zweifarbigem großen Partikel bei den kotransfizierten Desminmutanten für eine geringere Ordnung der Filamente.

## 5 Möglicher Einsatz der immortalisierten Mausmyoblasten

Die isolierten Mausmyoblasten aus Desmin defizienten (-/-) Mäusen wie auch aus Mäusen mit einem Knockin der humanpathogenen R350P Desminvariante (heterozygot, homozygot) können aufgrund eines eingebauten Immortalisierungsgens in den Mäusen zeitlich relativ unbegrenzt in Kultur gehalten werden. Dieses immortalisierende Gen *H-2K<sup>b</sup>-tsA58* (thermolabile mutierte Form von Simian Virus 40 (SV40) „large T Antigen“ mit einem Interferon-induzierbaren murinen *H-2K<sup>b</sup>* Promotor) unterdrückt zum größten Teil das Tumorsuppressorprotein p53, wodurch keine geregelten Zellzyklen mehr ablaufen können. Im Gegensatz dazu können sich normalerweise primäre Muskelzellen 10-30 mal *in vitro* verdoppeln (Hauschka, Linkhart et al. 1979).

Ähnlich den p53 defizienten Fibroblasten, wird die Zellseneszenz nicht erreicht und die G1-Phase des Zellzyklus blockiert. Bei einem p53 Knockout von Mausfibroblasten wurden Passagen erreicht, die über den Wert 50 hinausgingen (Harvey, Sands et al. 1993).

Die Immortomäuse® zeigten über das Projekt hinweg eine gute Lebensfähigkeit, allerdings mit einer eingeschränkten Fertilität der Weibchen. Dieses Phänomen konnte auch bei p53 defizienten weiblichen Mäusen beobachtet werden, die Tumorwachstum nach einer gewissen Lebensdauer zeigten (Donehower 1996).

Morgan et al. erzeugten bereits 1994 konditionell immortalisierte myogene Zelllinien mit einem Dystrophin-Defizit (Morgan, Beauchamp et al. 1994). Muses et al. hatten es sich 2011 zur Aufgabe gemacht, stabil transfizierbare und aus Stammzellen gewonnene murine Zelllinien mit dem Immortogen *H-2K<sup>b</sup>-tsA58* zu etablieren. Die daraus entstandene Dystrophin-defiziente Zelllinie H2K 2B4 soll als Vorteil einen umfangreicheren Charakter als Muskelstammzellen gegenüber der proliferierten, myogenen Zelllinie von Morgan et al. besitzen (Muses, Morgan et al. 2011).

Neben myogenen immortalisierten H-2K<sup>b</sup>-tsA58 Zellen konnten aus der Immortomaus® u.a. auch Hepatozyten, Stromazellen, epitheliale Zellen und Osteoklasten-Vorläuferzellen isoliert werden (Chambers, Owens et al. 1993, Rops, van der Vlag et al. 2004, Matsuo, Koizumi et al. 2006, Amano, Handa et al. 2011, Istvanffy and Oostendorp 2013).

Die steuerbare Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben durch Austausch des Wachstumsmediums gegen ein Fusionsmedium (DMEM mit 5% Pferdeserum ohne IFN $\gamma$ ), konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden (Muses, Morgan et al. 2011). Es wurde eher eine sporadische und spontane Fusionierung beobachtet. So stellt sich die Frage, ob der ausgehende Membrandefekt in den isolierten immortalisierten Dystrophin defizienten Myoblasten für eine Differenzierung zu Myotuben von Vorteil ist. Dafür spricht, dass bei der myogenen Differenzierung normalerweise eine regulierte Verminderung eines membranständigen Proteins ( $\alpha_v\beta_3$  Integrin) auftritt. Dagegen konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von Dysferlin durch Dexamethason die Mausmyoblastenfusion *in vitro* verbessert (Blaschuk, Guerin et al. 1997, Belanto, Diaz-Perez et al. 2010).

Möglicherweise sind die isolierten murinen Desmin-defizienten und R350P Desmin Knockin Myoblasten in einem späteren myogenen Zellstadium, in dem sie nur bei einer gewissen Zelldichte zu mehrkernigen Myotuben fusionieren.

Durch simultane Transduktion von humanen Myoblasten mit Telomerase- und CDK4- (Cyclin abhängige Kinase 4) exprimierenden viralen Vektoren konnten Muskelstammzellen aus Patienten mit verschiedenen neuromuskulären Krankheiten immortalisiert werden, die ähnlich lang in Kultur gehalten werden konnten wie die hier entstandenen H-2K<sup>b</sup>-tsA58 immortalisierten Mausmyoblasten (Mamchaoui, Trollet et al. 2011).

Bei diesen Myoblasten könnte für eine Ausdifferenzierung zu Myotuben eine Transduktion mit MyoD-exprimierenden Viren hilfreich sein, die die myogene Differenzierung induzieren können (Lattanzi, Salvatori et al. 1998, Larsen, Pettersson et al. 2011). Über das temperaturabhängige large T Antigen könnte ebenso die Zelldifferenzierung kontrolliert und verbessert werden (Langley, Ramirez et al. 2003).

Die murinen Myoblasten mit dem Desmin Knockout könnten künftig experimentell als neues Zellkulturmodell einsetzt werden, wenn endogenes Desmin ausgeschlossen sein soll, aber myogene Eigenschaften erforderlich sind. Eine transiente Transfektion ist bei dieser Zelllinie möglich. Mason *et al* konnten bei immortalisierten, kardialen Endothelzellen eine Transfektionsrate von 40% erreichen (Mason 2001). Das etablierte murine Desmin Knockout Zellkulturmodell könnte künftig auch für Studien der myogenen Differenzierung *in vitro* genutzt werden oder für Interaktionsstudien von kotransfizierten humanen Desmin-Varianten mit Kofaktoren während der Myoblastenproliferation oder Myotubendifferenzierung.

## G Fazit und Ausblick

Die Charakterisierung der pathologischen molekularen Mechanismen parallel zu zellulären Phänotypen bei heterozygoten Desminmutation *in vitro* trägt zum Grundverständnis der Pathogenese von Desminopathien bei. Um die Fragen zu beantworten, welche pathogene Rolle mutiertes Desminprotein in der Zelle spielt und wie es sich auf funktionelles Wildtyp-Desmin auswirkt, wurden Koassemblierungsanalysen durchgeführt, die neue Erkenntnisse brachten: Das eingesetzte rote fluoreszente Protein zeigte sich erst im Verlauf der Experimente in der Einzelmolekülanalyse als weniger geeignet, um die molekulare Architektur bei koexistierenden Wildtyp- und mutierten Desminproteinen zu beschreiben. Vielmehr müsste dafür ein anderes, besser geeignetes Fluorophor, insbesondere mit höherer Quantenausbeute eingesetzt werden, um signifikante Aussagen treffen zu können. Dagegen konnte die Interaktion der einzelnen untersuchten humanpathogenen Mutanten mit funktionellem Wildtyp-Desmin in der Einzelmolekülspektroskopie charakterisiert werden, die sich jeweils quantitativ unterschied. Die gewonnenen Erkenntnisse deckten sich mit den entsprechenden mikroskopischen Daten, die bei den Mutanten eine variable Filamentbildung oder Aggregation zeigten.

Die Einzelmolekülspektroskopieanalyse hat sich in den letzten Jahren als wichtige Hochdurchsatzmethode für die Untersuchung des molekularen Pathomechanismus von Faktoren durchgesetzt, die mit pathologischer Proteinaggregation bei neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind. Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass die Messung von nicht-aufgereinigten Desminproteinen in Zelllysaten in der Einzelmolekülspektroskopie zur Analyse einzelner molekularer Partikel an die Grenzen der Messsensitivität und Datenauswertbarkeit stieß. Die Verwendung aufgereinigter Proteinspezies könnte die Aussagekraft der Interaktionsexperimente künftig verbessern.

Des Weiteren wäre dann auch ein effektives Screening von potentiellen antiaggregativen Substanzen mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie denkbar. So könnten Substanzen funktionell getestet werden, die gezielt pathologische Proteinoligomere auflösen können (Fiorino, Eiden et al. 2012). Entsprechende translationale Therapiekonzepte zur Anwendung am Patienten liegen aber noch in weiter Ferne.

Über Lasermikrodisektion konnten Proteine in den MFM assoziierten Proteinaggregaten im Skelettmuskel identifiziert werden, die am Proteinabbau (Ubiquitin-Proteasom-System, Autophagie) beteiligt sind. Die Dysfunktion in der Proteinqualitätskontrolle und des Proteinabbausystems über das UPS und den Autophagieweg scheinen eine wichtige pathogene Rolle bei allen Formen der Myofibrillären Myopathien zu spielen (Kley, Maerkens et al. 2013). Ein Eingriff in fehlregulierten Proteinqualitätskontrollsystmen könnte eine weitere Therapiemöglichkeit darstellen. So zeigte eine Überexpression des Proteins Bcl-2 in Mäusen eine physiologische Verbesserung bei Desmin-assozierten Kardiomyopathien (Weisleder, Taffet et al.

2004). Die Induktion von molekularen Chaperonen, wie Hitzeschockproteinen, könnte ein innovativer therapeutischer Ansatz sein, der die Qualitätskontrollmechanismen unterstützt und antiaggregativ wirkt. (Co-) Inducer von Hitzeschockproteinen wie z. B. Arimoclomol wirken auch gegen zusätzliche pathologische Mechanismen wie oxidativen Stress (Kalmar, Lu et al. 2014). Um die frühen Phasen der Krankheit zu untersuchen, ist es essentiell, weitere Mausmodelle zu generieren, die die pathogene Desminmutationen im Genom anstelle des Wildtyp-Allels tragen und deren Pathophysiologie relevant für die humane Pathogenese ist. Über einen Gentransfer oder über den Virus-vermittelten Einbau von Desminmutationen könnten solche Mausmodelle mit jeweiliger Desminmutante entstehen (Kostareva, Sjoberg et al. 2008, Joanne, Chourbagi et al. 2013). Tiermodelle, die möglichst genau die humane Pathophysiologie abbilden, sind von sehr großer Bedeutung, um in präklinischen Studien relevante Aussagen über den Nutzen neuerer translationaler Therapiestrategien zu treffen und eine Verbesserung der Lebensqualität der betroffenen Patienten zu erreichen.

## H Literaturverzeichnis

Amano, A., S. Handa, T. Aigaki, K. Shigemoto, N. Maruyama and A. Ishigami (2011). "Establishment and characterization of hepatocytes from an Immortomouse/SMP30/GNL knockout mouse hybrid lacking vitamin C to study vitamin C transport." *J Biochem* 150(6): 671-678.

Aragón, S. R. and R. Pecora (1975). "Fluorescence correlation spectroscopy and Brownian rotational diffusion Biopolymers Volume 14, Issue 1." *Biopolymers* 14(1): 119-137.

Bacia, K. and P. Schwille (2003). "A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy." *Methods* 29(1): 74-85.

Bar, H., D. Fischer, B. Goudeau, R. A. Kley, C. S. Clemen, P. Vicart, H. Herrmann, M. Vorgerd and R. Schroder (2005). "Pathogenic effects of a novel heterozygous R350P desmin mutation on the assembly of desmin intermediate filaments in vivo and in vitro." *Hum Mol Genet* 14(10): 1251-1260.

Bar, H., B. Goudeau, S. Walde, M. Casteras-Simon, N. Mucke, A. Shatunov, Y. P. Goldberg, C. Clarke, J. L. Holton, B. Eymard, H. A. Katus, M. Fardeau, L. Goldfarb, P. Vicart and H. Herrmann (2007). "Conspicuous involvement of desmin tail mutations in diverse cardiac and skeletal myopathies." *Hum Mutat* 28(4): 374-386.

Bar, H., A. Kostareva, G. Sjoberg, T. Sejersen, H. A. Katus and H. Herrmann (2006). "Forced expression of desmin and desmin mutants in cultured cells: impact of myopathic missense mutations in the central coiled-coil domain on network formation." *Exp Cell Res* 312(9): 1554-1565.

Bar, H., N. Mucke, A. Kostareva, G. Sjoberg, U. Aebi and H. Herrmann (2005). "Severe muscle disease-causing desmin mutations interfere with in vitro filament assembly at distinct stages." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(42): 15099-15104.

Bar, H., N. Mucke, P. Ringler, S. A. Muller, L. Kreplak, H. A. Katus, U. Aebi and H. Herrmann (2006). "Impact of disease mutations on the desmin filament assembly process." *J Mol Biol* 360(5): 1031-1042.

Bar, H., M. Schopferer, S. Sharma, B. Hochstein, N. Mucke, H. Herrmann and N. Willenbacher (2010). "Mutations in desmin's carboxy-terminal "tail" domain severely modify filament and network mechanics." *J Mol Biol* 397(5): 1188-1198.

Bar, H., S. Sharma, H. Kleiner, N. Mucke, H. Zentgraf, H. A. Katus, U. Aebi and H. Herrmann (2009). "Interference of amino-terminal desmin fragments with desmin filament formation." *Cell Motil Cytoskeleton* 66(11): 986-999.

Bar, H., S. V. Strelkov, G. Sjoberg, U. Aebi and H. Herrmann (2004). "The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation?" *J Struct Biol* 148(2): 137-152.

Belanto, J. J., S. V. Diaz-Perez, C. E. Magyar, M. M. Maxwell, Y. Yilmaz, K. Topp, G. Boso, C. H. Jamieson, N. A. Cacalano and C. A. Jamieson (2010). "Dexamethasone induces dysferlin in myoblasts and enhances their myogenic differentiation." *Neuromuscul Disord* 20(2): 111-121.

Beretta, C. A., N. Dross, P. Bankhead and M. Carl (2013). "The ventral habenulae of zebrafish develop in prosomere 2 dependent on Tcf7l2 function." *Neural Dev* 8: 19.

Bieschke, J., A. Giese, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr, S. Poser, M. Eigen and H. Kretzschmar (2000). "Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10): 5468-5473.

Blaschuk, K. L., C. Guerin and P. C. Holland (1997). "Myoblast alpha v beta3 integrin levels are controlled by transcriptional regulation of expression of the beta3 subunit and down-regulation of beta3 subunit expression is required for skeletal muscle cell differentiation." *Dev Biol* 184(2): 266-277.

Bonakdar, N., J. Luczak, L. Lautscham, M. Czonstke, T. M. Koch, A. Mainka, T. Jungbauer, W. H. Goldmann, R. Schroder and B. Fabry (2012). "Biomechanical characterization of a desminopathy in primary human myoblasts." *Biochem Biophys Res Commun* 419(4): 703-707.

Boriek, A. M., Y. Capetanaki, W. Hwang, T. Officer, M. Badshah, J. Rodarte and J. G. Tidball (2001). "Desmin integrates the three-dimensional mechanical properties of muscles." *Am J Physiol Cell Physiol* 280(1): C46-52.

Brodehl, A., P. N. Hedde, M. Dieding, A. Fatima, V. Walhorn, S. Gayda, T. Saric, B. Klauke, J. Gummert, D. Anselmetti, M. Heilemann, G. U. Nienhaus and H. Milting (2012). "Dual color photoactivation localization microscopy of cardiomyopathy-associated desmin mutants." *J Biol Chem* 287(19): 16047-16057.

Burkhard, P., J. Stetefeld and S. V. Strelkov (2001). "Coiled coils: a highly versatile protein folding motif." *Trends Cell Biol* 11(2): 82-88.

Capetanaki, Y., R. J. Bloch, A. Kouloumenta, M. Mavroidis and S. Psarras (2007). "Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles." *Exp Cell Res* 313(10): 2063-2076.

Chambers, T. J., J. M. Owens, G. Hattersley, P. S. Jat and M. D. Noble (1993). "Generation of osteoclast-inductive and osteoclastogenic cell lines from the H-2KbtsA58 transgenic mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(12): 5578-5582.

Chernyatina, A. A., S. Nicolet, U. Aebi, H. Herrmann and S. V. Strelkov (2012). "Atomic structure of the vimentin central alpha-helical domain and its implications for intermediate filament assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(34): 13620-13625.

Claeys, K. G., P. F. van der Ven, A. Behin, T. Stojkovic, B. Eymard, O. Dubourg, P. Laforet, G. Faulkner, P. Richard, P. Vicart, N. B. Romero, G. Stoltenburg, B. Udd, M. Fardeau, T. Voit and D. O. Furst (2009). "Differential involvement of sarcomeric proteins in myofibrillar myopathies: a morphological and immunohistochemical study." *Acta Neuropathol* 117(3): 293-307.

Clemen, C. S., D. Fischer, J. Reimann, L. Eichinger, C. R. Muller, H. D. Muller, H. H. Goebel and R. Schroder (2009). "How much mutant protein is needed to cause a protein aggregate myopathy *in vivo*? Lessons from an exceptional desminopathy." *Hum Mutat* 30(3): E490-499.

Clemen, C. S., H. Herrmann, S. V. Strelkov and R. Schroder (2013). "Desminopathies: pathology and mechanisms." *Acta Neuropathol* 125(1): 47-75.

Clontech (2001). *Living Colors® User Manual PT2040-1*. I. Clontech Laboratories, Palo Alto CA.

Coonrod, A., F. Q. Li and M. Horwitz (1997). "On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses." *Gene Ther* 4(12): 1313-1321.

Dalakas, M. C., K. Y. Park, C. Semino-Mora, H. S. Lee, K. Sivakumar and L. G. Goldfarb (2000). "Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene." *N Engl J Med* 342(11): 770-780.

De Bleecker, J. L., A. G. Engel and B. B. Ertl (1996). "Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin positivity. II. Immunocytochemical analysis reveals accumulation of multiple other proteins." *J Neuropathol Exp Neurol* 55(5): 563-577.

Donehower, L. A. (1996). "The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies." *Semin Cancer Biol* 7(5): 269-278.

Ehrenberg, M. and R. Rigler (1974). "Rotational brownian motion and fluorescence intensify fluctuations." *Chemical Physics* 4(3): 390-401.

Ehrenberg, M. and R. Rigler (1976). "Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules." *Q Rev Biophys* 9(1): 69-81.

Eigen, M. and R. Rigler (1994). "Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13): 5740-5747.

Evotec (2001). FCS+ Plus Theory and Handling. Hamburg.

Ferrer, I., M. Carmona, R. Blanco, D. Moreno, B. Torrejon-Escribano and M. Olive (2005). "Involvement of clusterin and the aggresome in abnormal protein deposits in myofibrillar myopathies and inclusion body myositis." *Brain Pathol* 15(2): 101-108.

Ferrer, I. and M. Olive (2008). "Molecular pathology of myofibrillar myopathies." *Expert Rev Mol Med* 10: e25.

Fiorino, F., M. Eiden, A. Giese, B. Severino, A. Esposito, M. H. Groschup, E. Perissutti, E. Magli, G. M. Incisivo, A. Ciano, F. Frecentese, H. A. Kretzschmar, J. Wagner, V. Santagada and G. Caliendo (2012). "Synthesis of benzamide derivatives and their evaluation as antiprion agents." *Bioorg Med Chem* 20(16): 5001-5011.

Giese, A., B. Bader, J. Bieschke, G. Schaffar, S. Odoy, P. J. Kahle, C. Haass and H. Kretzschmar (2005). "Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation." *Biochem Biophys Res Commun* 333(4): 1202-1210.

Giese, A., J. Bieschke, M. Eigen and H. A. Kretzschmar (2000). "Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases." *Arch Virol Suppl*(16): 161-171.

Giese, A. M., U. S. Bertsch, H. W. Kretzschmar, M. M. Habeck, T. S. Hirschberger, P. M. Tavan, C. G. Griesinger, A. G. Leonov, S. G. Ryazanov, P. M. Weber, M. B. i. d. N. Geissen, M. H. W. Groschup and J. M. Wagner (2011). NEW DRUG FOR INHIBITING AGGREGATION OF PROTEINS INVOLVED IN DISEASES LINKED TO PROTEIN AGGREGATION AND/OR NEURODEGENERATIVE DISEASES. US. 12996833.

Goebel, H. H. (1997). "Desmin-related myopathies." *Curr Opin Neurol* 10(5): 426-429.

Goebel, H. H. and A. Bornemann (1993). "Desmin pathology in neuromuscular diseases." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64(3): 127-135.

Goebel, H. H., M. Fardeau, M. Olive and R. Schroder (2008). "156th ENMC International Workshop: desmin and protein aggregate myopathies, 9-11 November 2007, Naarden, The Netherlands." *Neuromuscul Disord* 18(7): 583-592.

Goebel, H. H. and H. D. Muller (2006). "Protein aggregate myopathies." *Semin Pediatr Neurol* 13(2): 96-103.

Goldfarb, L. G., M. Olive, P. Vicart and H. H. Goebel (2008). "Intermediate filament diseases: desminopathy." *Adv Exp Med Biol* 642: 131-164.

Goldfarb, L. G., K. Y. Park, L. Cervenakova, S. Gorokhova, H. S. Lee, O. Vasconcelos, J. W. Nagle, C. Semino-Mora, K. Sivakumar and M. C. Dalakas (1998). "Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy." *Nat Genet* 19(4): 402-403.

Goldfarb, L. G., P. Vicart, H. H. Goebel and M. C. Dalakas (2004). "Desmin myopathy." *Brain* 127(Pt 4): 723-734.

Goudeau, B., A. Dagvadorj, F. Rodrigues-Lima, P. Nedellec, M. Casteras-Simon, E. Perret, S. Langlois, L. Goldfarb and P. Vicart (2001). "Structural and functional analysis of a new desmin variant causing desmin-related myopathy." *Hum Mutat* 18(5): 388-396.

Griggs, R., A. Vihola, P. Hackman, K. Talvinen, H. Haravuori, G. Faulkner, B. Eymard, I. Richard, D. Selcen, A. Engel, O. Carpen and B. Udd (2007). "Zaspopathy in a large classic late-onset distal myopathy family." *Brain* 130(Pt 6): 1477-1484.

Harvey, M., A. T. Sands, R. S. Weiss, M. E. Hegi, R. W. Wiseman, P. Pantazis, B. C. Giovanella, M. A. Tainsky, A. Bradley and L. A. Donehower (1993). "In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice." *Oncogene* 8(9): 2457-2467.

Hauschka, S. D., T. A. Linkhart, C. H. Clegg and G. F. Merrill (1979). "Clonal studies of human and mouse muscle." In *Muscle Regeneration* A. Mauno, editor. Raven Press, New York: 311-322

Haustein, E. and P. Schwille (2003). "Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy." *Methods* 29(2): 153-166.

Hedberg, K. K. and L. B. Chen (1986). "Absence of intermediate filaments in a human adrenal cortex carcinoma-derived cell line." *Exp Cell Res* 163(2): 509-517.

Herrmann, H., M. Haner, M. Brettel, S. A. Muller, K. N. Goldie, B. Fedtke, A. Lustig, W. W. Franke and U. Aebi (1996). "Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains." *J Mol Biol* 264(5): 933-953.

Istvanffy, R. and R. A. Oostendorp (2013). "Generation and establishment of murine adherent cell lines." *Methods Mol Biol* 946: 301-314.

Janue, A., M. A. Odena, E. Oliveira, M. Olive and I. Ferrer (2007). "Desmin is oxidized and nitrated in affected muscles in myotilinopathies and desminopathies." *J Neuropathol Exp Neurol* 66(8): 711-723.

Janue, A., M. Olive and I. Ferrer (2007). "Oxidative stress in desminopathies and myotilinopathies: a link between oxidative damage and abnormal protein aggregation." *Brain Pathol* 17(4): 377-388.

Jat, P. S., M. D. Noble, P. Ataliotis, Y. Tanaka, N. Yannoutsos, L. Larsen and D. Kioussis (1991). "Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(12): 5096-5100.

Joanne, P., O. Chourbagi, C. Hourde, A. Ferry, G. Butler-Browne, P. Vicart, J. Dumonceaux and O. Agbulut (2013). "Viral-mediated expression of desmin mutants to create mouse models of myofibrillar myopathy." *Skelet Muscle* 3(1): 4.

Kalmar, B., C. H. Lu and L. Greensmith (2014). "The role of heat shock proteins in Amyotrophic Lateral Sclerosis: The therapeutic potential of Arimoclomol." *Pharmacol Ther* 141(1): 40-54.

Kask, P., K. Palo, N. Fay, L. Brand, U. Mets, D. Ullmann, J. Jungmann, J. Pschorr and K. Gall (2000). "Two-dimensional fluorescence intensity distribution analysis: theory and applications." *Biophys J* 78(4): 1703-1713.

Kask, P., K. Palo, D. Ullmann and K. Gall (1999). "Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 13756-13761.

Kern, G. and B. E. Flucher (2005). "Localization of transgenes and genotyping of H-2kb-tsA58 transgenic mice." *Biotechniques* 38(1): 38, 40, 42.

Klauke, B., S. Kossmann, A. Gaertner, K. Brand, I. Stork, A. Brodehl, M. Dieding, V. Walhorn, D. Anselmetti, D. Gerdes, B. Bohms, U. Schulz, E. Zu Knyphausen, M. Vorgerd, J. Gummert and H. Milting (2010). "De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy." *Hum Mol Genet* 19(23): 4595-4607.

Kley, R. A., Y. Hellenbroich, P. F. van der Ven, D. O. Furst, A. Huebner, V. Bruchertseifer, S. A. Peters, C. M. Heyer, J. Kirschner, R. Schroder, D. Fischer, K. Muller, K. Tolksdorf, K. Eger, A. Germing, T. Brodherr, C. Reum, M. C. Walter, H. Lochmuller, U. P. Ketelsen and M. Vorgerd (2007). "Clinical and morphological phenotype of the filamin myopathy: a study of 31 German patients." *Brain* 130(Pt 12): 3250-3264.

Kley, R. A., A. Maerkens, Y. Leber, V. Theis, A. Schreiner, P. F. van der Ven, J. Uszkoreit, C. Stephan, S. Eulitz, N. Euler, J. Kirschner, K. Muller, H. E. Meyer, M. Tegenthoff, D. O. Furst, M. Vorgerd, T. Muller and K. Marcus (2013). "A combined laser microdissection and mass spectrometry approach reveals new disease relevant proteins accumulating in aggregates of filaminopathy patients." *Mol Cell Proteomics* 12(1): 215-227.

Kostareva, A., G. Sjoberg, J. Bruton, S. J. Zhang, J. Balogh, A. Gudkova, B. Hedberg, L. Edstrom, H. Westerblad and T. Sejersen (2008). "Mice expressing L345P mutant desmin exhibit morphological and functional changes of skeletal and cardiac mitochondria." *J Muscle Res Cell Motil* 29(1): 25-36.

Kreplak, L. and H. Bar (2009). "Severe myopathy mutations modify the nanomechanics of desmin intermediate filaments." *J Mol Biol* 385(4): 1043-1051.

Langley, R. R., K. M. Ramirez, R. Z. Tsan, M. Van Arsdall, M. B. Nilsson and I. J. Fidler (2003). "Tissue-specific microvascular endothelial cell lines from H-2K(b)-tsA58 mice for studies of angiogenesis and metastasis." *Cancer Res* 63(11): 2971-2976.

Larsen, J., O. J. Pettersson, M. Jakobsen, R. Thomsen, C. B. Pedersen, J. M. Hertz, N. Gregersen, T. J. Corydon and T. G. Jensen (2011). "Myoblasts generated by lentiviral mediated MyoD transduction of myotonic dystrophy type 1 (DM1) fibroblasts can be used for assays of therapeutic molecules." *BMC Res Notes* 4: 490.

Lattanzi, L., G. Salvatori, M. Coletta, C. Sonnino, M. G. Cusella De Angelis, L. Gioglio, C. E. Murry, R. Kelly, G. Ferrari, M. Molinaro, M. Crescenzi, F. Mavilio and G. Cossu (1998). "High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies." *J Clin Invest* 101(10): 2119-2128.

Levin, J., S. Bulst, C. Thirion, F. Schmidt, K. Botzel, S. Krause, C. Pertl, H. Kretzschmar, M. C. Walter, A. Giese and H. Lochmuller (2010). "Divergent molecular effects of desmin mutations on protein assembly in myofibrillar myopathy." *J Neuropathol Exp Neurol* 69(4): 415-424.

Li, Z., E. Colucci-Guyon, M. Pincon-Raymond, M. Mericskay, S. Pournin, D. Paulin and C. Babinet (1996). "Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin." *Dev Biol* 175(2): 362-366.

Li, Z. L., A. Lilienbaum, G. Butler-Browne and D. Paulin (1989). "Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development." *Gene* 78(2): 243-254.

Liu, H. S., M. S. Jan, C. K. Chou, P. H. Chen and N. J. Ke (1999). "Is green fluorescent protein toxic to the living cells?" *Biochem Biophys Res Commun* 260(3): 712-717.

Liu, J., Q. Chen, W. Huang, K. M. Horak, H. Zheng, R. Mestril and X. Wang (2006). "Impairment of the ubiquitin-proteasome system in desminopathy mouse hearts." *FASEB J* 20(2): 362-364.

Lowe, T., R. A. Kley, P. F. van der Ven, M. Himmel, A. Huebner, M. Vorgerd and D. O. Furst (2007). "The pathomechanism of filaminopathy: altered biochemical properties explain the cellular phenotype of a protein aggregation myopathy." *Hum Mol Genet* 16(11): 1351-1358.

Maddison, P., M. S. Damian, C. Sewry, C. McGorrian, J. B. Winer, Z. Odgerel, A. Shatunov, H. S. Lee and L. G. Goldfarb (2012). "Clinical and myopathological characteristics of desminopathy caused by a mutation in desmin tail domain." *Eur Neurol* 68(5): 279-286.

Magde, D., E. Elson and W. W. Webb (1972). "Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy." *Physical Review Letters* 29(11): 705-708.

Magde, D., E. L. Elson and W. W. Webb (1974). "Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization Biopolymers Volume 13, Issue 1." *Biopolymers* 13(1): 29-61.

Mamchaoui, K., C. Trollet, A. Bigot, E. Negroni, S. Chaouch, A. Wolff, P. K. Kandalla, S. Marie, J. Di Santo, J. L. St Guily, F. Muntoni, J. Kim, S. Philippi, S. Spuler, N. Levy, S. C. Blumen, T. Voit, W. E. Wright, A. Aamiri, G. Butler-Browne and V. Mouly (2011). "Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders." *Skelet Muscle* 1: 34.

Mason, J. C. L., E.A.; Rao, R.M.; Marelli-Berg, F.M.; Jat, P.S.; Haskard, D.O. (2001). "Use of H-2Kb-tsA58 transgenic mice to generate conditionally immortalized, growth factor responsive mouse cardiac endothelial cells for in vitro studies." *FASEB J* 15(6): A947 - A947.

Matsuo, M., K. Koizumi, S. Yamada, M. Tomi, R. Takahashi, M. Ueda, T. Terasaki, M. Obinata, K. Hosoya, O. Ohtani and I. Saiki (2006). "Establishment and characterization of conditionally immortalized endothelial cell lines from the thoracic duct and inferior vena cava of tsA58/EGFP double-transgenic rats." *Cell Tissue Res* 326(3): 749-758.

Meseth, U., T. Wohland, R. Rigler and H. Vogel (1999). "Resolution of fluorescence correlation measurements." *Biophys J* 76(3): 1619-1631.

Morgan, J. E., J. R. Beauchamp, C. N. Pagel, M. Peckham, P. Ataliotis, P. S. Jat, M. D. Noble, K. Farmer and T. A. Partridge (1994). "Myogenic cell lines derived from transgenic mice carrying a thermolabile T antigen: a model system for the derivation of tissue-specific and mutation-specific cell lines." *Dev Biol* 162(2): 486-498.

Mullis, K. B. (1990). "Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction." *Ann Biol Clin (Paris)* 48(8): 579-582.

Munoz-Marmol, A. M., G. Strasser, M. Isamat, P. A. Coulombe, Y. Yang, X. Roca, E. Vela, J. L. Mate, J. Coll, M. T. Fernandez-Figueras, J. J. Navas-Palacios, A. Ariza and E. Fuchs (1998). "A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(19): 11312-11317.

Muses, S., J. E. Morgan and D. J. Wells (2011). "A new extensively characterised conditionally immortal muscle cell-line for investigating therapeutic strategies in muscular dystrophies." *PLoS One* 6(9): e24826.

Nakano, S., A. G. Engel, I. Akiguchi and J. Kimura (1997). "Myofibrillar myopathy. III. Abnormal expression of cyclin-dependent kinases and nuclear proteins." *J Neuropathol Exp Neurol* 56(8): 850-856.

Nakano, S., A. G. Engel, A. J. Waclawik, A. M. Emslie-Smith and N. A. Busis (1996). "Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin positivity. I. Light and electron microscopy analysis of 10 cases." *J Neuropathol Exp Neurol* 55(5): 549-562.

Odgerel, Z., A. Sarkozy, H. S. Lee, C. McKenna, J. Rankin, V. Straub, H. Lochmuller, F. Paola, A. D'Amico, E. Bertini, K. Bushby and L. G. Goldfarb (2010). "Inheritance patterns and phenotypic features of myofibrillar myopathy associated with a BAG3 mutation." *Neuromuscul Disord* 20(7): 438-442.

Ohlsson, M., C. Hedberg, B. Bradvik, C. Lindberg, H. Tajsharghi, O. Danielsson, A. Melberg, B. Udd, T. Martinsson and A. Oldfors (2012). "Hereditary myopathy with early respiratory failure associated with a mutation in A-band titin." *Brain* 135(Pt 6): 1682-1694.

Olive, M. (2009). "Extralyosomal protein degradation in myofibrillar myopathies." *Brain Pathol* 19(3): 507-515.

Olive, M., L. Goldfarb, D. Moreno, E. Laforet, A. Dagvadorj, N. Sambuughin, J. A. Martinez-Matos, F. Martinez, J. Alio, E. Farrero, P. Vicart and I. Ferrer (2004). "Desmin-related myopathy: clinical, electrophysiological, radiological, neuropathological and genetic studies." *J Neurol Sci* 219(1-2): 125-137.

Olive, M., L. G. Goldfarb, A. Shatunov, D. Fischer and I. Ferrer (2005). "Myotilinopathy: refining the clinical and myopathological phenotype." *Brain* 128(Pt 10): 2315-2326.

Olive, M., R. A. Kley and L. G. Goldfarb (2013). "Myofibrillar myopathies: new developments." *Curr Opin Neurol* 26(5): 527-535.

Olive, M., Z. Odgerel, A. Martinez, J. J. Poza, F. G. Bragado, R. J. Zabalza, I. Jerico, L. Gonzalez-Mera, A. Shatunov, H. S. Lee, J. Armstrong, E. Maravi, M. R. Arroyo, J. Pascual-Calvet, C. Navarro, C. Paradas, M. Huerta, F. Marquez, E. G. Rivas, A. Pou, I. Ferrer and L. G. Goldfarb (2011). "Clinical and myopathological evaluation of early- and late-onset subtypes of myofibrillar myopathy." *Neuromuscul Disord* 21(8): 533-542.

Otten, E., A. Asimaki, A. Maass, I. M. van Langen, A. van der Wal, N. de Jonge, M. P. van den Berg, J. E. Saffitz, A. A. Wilde, J. D. Jongbloed and J. P. van Tintelen (2010). "Desmin mutations as a cause of right ventricular heart failure affect the intercalated disks." *Heart Rhythm* 7(8): 1058-1064.

Pfeffer, G., R. Barresi, I. J. Wilson, S. A. Hardy, H. Griffin, J. Hudson, H. R. Elliott, A. V. Ramesh, A. Radunovic, J. B. Winer, S. Vaidya, A. Raman, M. Busby, M. E. Farrugia, A. Ming, C. Everett, H. C. Emsley, R. Horvath, V. Straub, K. Bushby, H. Lochmuller, P. F. Chinnery and A. Sarkozy (2013). "Titin founder mutation is a common cause of myofibrillar myopathy with early respiratory failure." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.

Pfeffer, G., H. R. Elliott, H. Griffin, R. Barresi, J. Miller, J. Marsh, A. Evila, A. Vihola, P. Hackman, V. Straub, D. J. Dick, R. Horvath, M. Santibanez-Koref, B. Udd and P. F. Chinnery (2012). "Titin mutation segregates with hereditary myopathy with early respiratory failure." *Brain* 135(Pt 6): 1695-1713.

Pinol-Ripoll, G., A. Shatunov, A. Cabello, P. Larrode, I. de la Puerta, J. Pelegrin, F. J. Ramos, M. Olive and L. G. Goldfarb (2009). "Severe infantile-onset cardiomyopathy associated with a homozygous deletion in desmin." *Neuromuscul Disord* 19(6): 418-422.

Price, M. G. (1987). "Skelemins: cytoskeletal proteins located at the periphery of M-discs in mammalian striated muscle." *J Cell Biol* 104(5): 1325-1336.

Pruszczyk, P., A. Kostera-Pruszczyk, A. Shatunov, B. Goudeau, A. Draminska, K. Takeda, N. Sambuughin, P. Vicart, S. V. Strelkov, L. G. Goldfarb and A. Kaminska (2007). "Restrictive cardiomyopathy with atrioventricular conduction block resulting from a desmin mutation." *Int J Cardiol* 117(2): 244-253.

Rigler, R. (1995). "Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology." *J Biotechnol* 41(2-3): 177-186.

Rops, A. L., J. van der Vlag, C. W. Jacobs, H. B. Dijkman, J. F. Lensen, T. J. Wijnhoven, L. P. van den Heuvel, T. H. van Kuppevelt and J. H. Berden (2004). "Isolation and characterization of conditionally immortalized mouse glomerular endothelial cell lines." *Kidney Int* 66(6): 2193-2201.

Schessl, J., Y. Zou, M. J. McGrath, B. S. Cowling, B. Maiti, S. S. Chin, C. Sewry, R. Battini, Y. Hu, D. L. Cottle, M. Rosenblatt, L. Spruce, A. Ganguly, J. Kirschner, A. R. Judkins, J. A. Golden, H. H. Goebel, F. Muntoni, K. M. Flanigan, C. A. Mitchell and C. G. Bonnemann (2008). "Proteomic identification of FHL1 as the protein mutated in human reducing body myopathy." *J Clin Invest* 118(3): 904-912.

Schroder, R., W. S. Kunz, F. Rouan, E. Pfendner, K. Tolksdorf, K. Kappes-Horn, M. Altenschmidt-Mehring, R. Knoblich, P. F. van der Ven, J. Reimann, D. O. Furst, I. Blumcke, S. Vielhaber, D. Zillikens, S. Eming, T. Klockgether, J. Uitto, G. Wiche and A. Rolfs (2002). "Disorganization of the desmin cytoskeleton and mitochondrial dysfunction in plectin-related epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy." *J Neuropathol Exp Neurol* 61(6): 520-530.

Schroder, R. and B. Schoser (2009). "Myofibrillar myopathies: a clinical and myopathological guide." *Brain Pathol* 19(3): 483-492.

Schroder, R., A. Vrabie and H. H. Goebel (2007). "Primary desminopathies." *J Cell Mol Med* 11(3): 416-426.

Schwille, P., J. Bieschke and F. Oehlenschlager (1997). "Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies." *Biophys Chem* 66(2-3): 211-228.

Schwille, P., F. J. Meyer-Almes and R. Rigler (1997). "Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution." *Biophys J* 72(4): 1878-1886.

Segard, B. D., F. Delort, V. Bailleux, S. Simon, E. Leccia, B. Gausseres, F. Briki, P. Vicart and S. Batonnet-Pichon (2013). "N-acetyl-L-cysteine prevents stress-induced desmin aggregation in cellular models of desminopathy." *PLoS One* 8(10): e76361.

Selcen, D. (2011). "Myofibrillar myopathies." *Neuromuscul Disord* 21(3): 161-171.

Selcen, D. and A. G. Engel (2003). "Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations." *Ann Neurol* 54(6): 804-810.

Selcen, D. and A. G. Engel (2004). "Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy." *Neurology* 62(8): 1363-1371.

Selcen, D. and A. G. Engel (2005). "Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans." *Ann Neurol* 57(2): 269-276.

Selcen, D., F. Muntoni, B. K. Burton, E. Pegoraro, C. Sewry, A. V. Bite and A. G. Engel (2009). "Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy." *Ann Neurol* 65(1): 83-89.

Selcen, D., K. Ohno and A. G. Engel (2004). "Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients." *Brain* 127(Pt 2): 439-451.

Shalaby, S., Y. K. Hayashi, I. Nonaka, S. Noguchi and I. Nishino (2009). "Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy." *Neurology* 72(4): 375-376.

Sharma, S., N. Mucke, H. A. Katus, H. Herrmann and H. Bar (2009). "Disease mutations in the "head" domain of the extra-sarcomeric protein desmin distinctly alter its assembly and network-forming properties." *J Mol Med (Berl)* 87(12): 1207-1219.

Shcherbo, D., C. S. Murphy, G. V. Ermakova, E. A. Solovieva, T. V. Chepurnykh, A. S. Shcheglov, V. V. Verkhusha, V. Z. Pletnev, K. L. Hazelwood, P. M. Roche, S. Lukyanov, A. G. Zaraisky, M. W. Davidson and D. M. Chudakov (2009). "Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues." *Biochem J* 418(3): 567-574.

Shimizu, H., Y. Takizawa, L. Pulkkinen, S. Murata, M. Kawai, H. Hachisuka, M. Udon, J. Uitto and T. Nishikawa (1999). "Epidermolysis bullosa simplex associated with muscular dystrophy: phenotype-genotype correlations and review of the literature." *J Am Acad Dermatol* 41(6): 950-956.

Sjoberg, G., C. A. Saavedra-Matiz, D. R. Rosen, E. M. Wijsman, K. Borg, S. H. Horowitz and T. Sejersen (1999). "A missense mutation in the desmin rod domain is associated with autosomal dominant distal myopathy, and exerts a dominant negative effect on filament formation." *Hum Mol Genet* 8(12): 2191-2198.

Sokolova, A. V., L. Kreplak, T. Wedig, N. Mucke, D. I. Svergun, H. Herrmann, U. Aebi and S. V. Strelkov (2006). "Monitoring intermediate filament assembly by small-angle x-ray scattering reveals the molecular architecture of assembly intermediates." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44): 16206-16211.

Subach, O. M., G. H. Patterson, L. M. Ting, Y. Wang, J. S. Condeelis and V. V. Verkhusha (2011). "A photoswitchable orange-to-far-red fluorescent protein, PSmOrange." *Nat Methods* 8(9): 771-777.

Taylor, M. R., D. Slavov, L. Ku, A. Di Lenarda, G. Sinagra, E. Carniel, K. Haubold, M. M. Boucek, D. Ferguson, S. L. Graw, X. Zhu, J. Cavanaugh, C. C. Sucharov, C. S. Long, M. R. Bristow, P. Lavori, L. Mestroni, R. Familial Cardiomyopathy and B. D. Bank (2007). "Prevalence of desmin mutations in dilated cardiomyopathy." *Circulation* 115(10): 1244-1251.

van Spaendonck-Zwarts, K. Y., L. van Hessem, J. D. Jongbloed, H. E. de Walle, Y. Capetanaki, A. J. van der Kooi, I. M. van Langen, M. P. van den Berg and J. P. van Tintelen (2011). "Desmin-related myopathy." *Clin Genet* 80(4): 354-366.

Vicart, P., A. Caron, P. Guicheney, Z. Li, M. C. Prevost, A. Faure, D. Chateau, F. Chapon, F. Tome, J. M. Dupret, D. Paulin and M. Fardeau (1998). "A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy." *Nat Genet* 20(1): 92-95.

Vrabie, A., L. G. Goldfarb, A. Shatunov, A. Nagele, P. Fritz, I. Kaczmarek and H. H. Goebel (2005). "The enlarging spectrum of desminopathies: new morphological findings, eastward geographic spread, novel exon 3 desmin mutation." *Acta Neuropathol* 109(4): 411-417.

Wagner, J., S. Ryazanov, A. Leonov, J. Levin, S. Shi, F. Schmidt, C. Prix, F. Pan-Montojo, U. Bertsch, G. Mitteregger-Kretzschmar, M. Geissen, M. Eiden, F. Leidel, T. Hirschberger, A. A. Deeg, J. J. Krauth, W. Zinth, P. Tavan, J. Pilger, M. Zweckstetter, T. Frank, M. Bahr, J. H. Weishaupt, M. Uhr, H. Urlaub, U. Teichmann, M. Samwer, K. Botzel, M. Groschup, H. Kretzschmar, C. Griesinger and A. Giese (2013). "Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease." *Acta Neuropathol* 125(6): 795-813.

Walter, M. C., P. Reilich, A. Huebner, D. Fischer, R. Schroder, M. Vorgerd, W. Kress, C. Born, B. G. Schoser, K. H. Krause, U. Klutzny, S. Bulst, J. R. Frey and H. Lochmuller (2007). "Scapuloperoneal syndrome type Kaeser and a wide phenotypic spectrum of adult-onset, dominant myopathies are associated with the desmin mutation R350P." *Brain* 130(Pt 6): 1485-1496.

Wang, X., R. Klevitsky, W. Huang, J. Glasford, F. Li and J. Robbins (2003). "AlphaB-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin." *Circ Res* 93(10): 998-1005.

Weisleder, N., G. E. Taffet and Y. Capetanaki (2004). "Bcl-2 overexpression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(3): 769-774.

## I Anhang

### 1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
BAG3	Bcl-2 Associated Athanogene 3
Bcl-2	B-Zellenlymphom 2
bp	Basenpaar/e
bzw.	beziehungsweise
Bsp.	Beispiel
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ch1, Ch2	Kanal 1, Kanal 2
CK	Creatin-Kinase
cm	Zentimeter
COX	Cytochrom C Oxidase
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cpp	Counts per particle
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Des	Desmin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBS-MD	Epidermolysis bullosa simplex mit Muskeldystrophie
ECL	Enhanced Chemiluminescene
EDTA	Ethyldiamin-Tetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
EtOH	Ethanol
1K FIDA	One component fluorescence intensity distribution analysis
2K FIDA	Two components fluorescence intensity distribution analysis
FCS	Fluorescence-correlation-spectroscopy
FCS	Fetal Calf Serum
FHL1	Four and a half LIM Domain Protein 1
fl	Femtoliter

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
FLN C	Filamin C
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HRP	Horseradish Peroxidase
HMERF	Hereditäre Myopathie mit früher respiratorischer Insuffizienz
IF	Intermediärfilament/e
IF	Immunfluoreszenz
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IHC	Immunhistochemie
I <sub>tot</sub>	Gesamthelligkeit [kHz]
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
KI	Knockin
KO	Knockout
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	Mol [mol/l]
MFM	Myofibrilläre Myopathie
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
min	Minute(n)
mM	millimolar
mut	mutiert
MW	Molecular weight
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ W	Mikrowatt
NADH-TR	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid Tetrazolium Reduktase
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde
NaCl	Natriumchlorid

---

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde(n)
SIFT 2D	Scanning for intensely fluorescent targets two dimension
Strep	Streptomycin
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TBST	Tris buffered saline with Tween
Tg	Transgen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
ULF	Unit length filaments
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
USA	United States of America
u.v.m.	und viele(s) mehr
V	Volt
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
W/cm <sup>2</sup>	Watt pro Quadratzentimeter
ZASP	Z-band Alternatively Spliced PDZ-motif Protein/LDB3
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

---

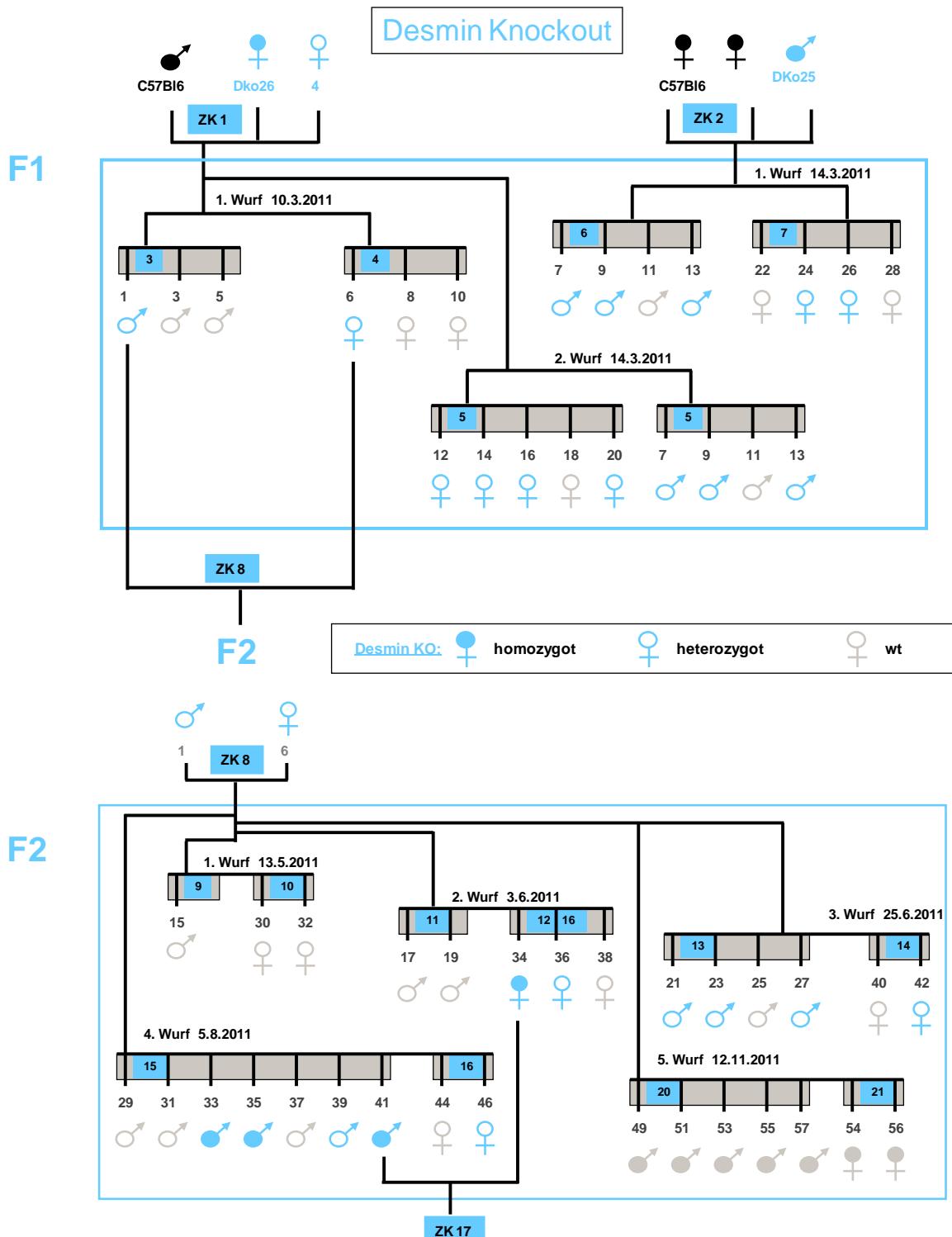
## 2 Antikörper

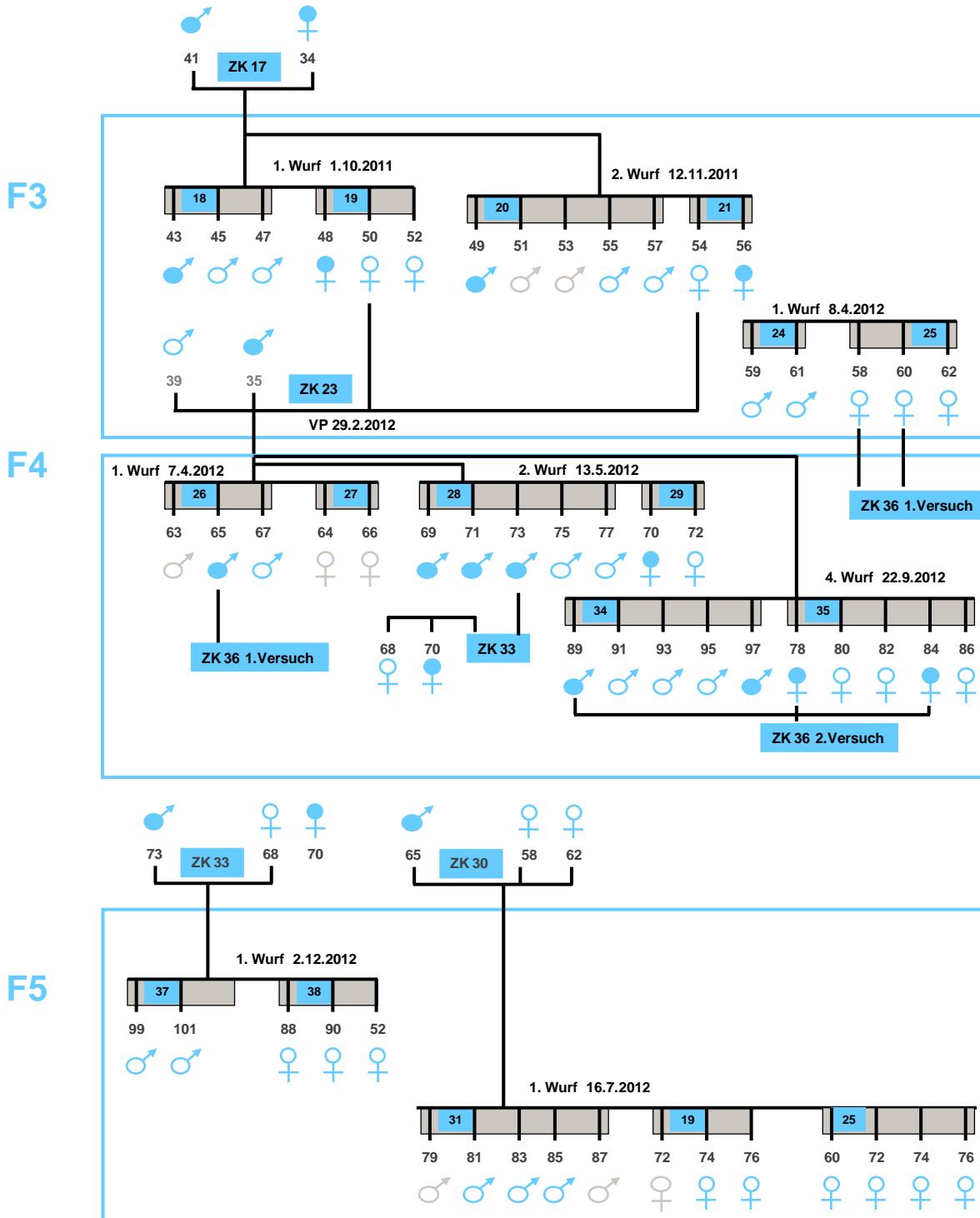
Antigen	Produktbezeichnung	Wirts- spezies	Klon	Produktnr.	Hersteller	Verdünnung
<b>Primäre Antikörper</b>						
Actinin	Monoclonal Anti- $\alpha$ -Actinin (Sarcomeric) antibody produced in mouse	Maus	monoclonal	A7811	Sigma-Aldrich	IF 1:100
Desmin	Monoclonal Mouse anti-Human Desmin	Maus	Monoclonal	M 0760	DAKO	IF 1:100
Desmin	Desmin antibody	Kaninchen	Polyclonal	4024	Cell Signaling	WB 1:100 IF 1:25
Dysferlin	Dysferlin antibody	Kaninchen	Polyclonal	GTx15108	Genetex	IF 1:50
GAPDH	Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Antibody	Maus	Monoclonal	MAB374	Millipore	WB 1:500
GFP	Anti-GFP antibody	Kaninchen	Polyclonal	ab6556	Abcam	WB 1:1000
MyoD	MyoD antibody (M-318)	Kaninchen	Polyclonal	sc-760	Santa Cruz	
t-RFP	Anti-tRFP antibody	Kaninchen	Polyclonal	AB234	evrogen	WB 1:1000
<b>Sekundäre Antikörper</b>						
Maus	anti-mouse HRP	Ziege	Polyclonal	115-035-146	dianova	WB 1:15000
Maus IgG/M/A	Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Kaninchen	Polyclonal	P0260	Dako	WB 1:10000
Kaninchen	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Ziege	Polyclonal	7074	Cell Signaling	WB 1:5000
Maus IgG	Alexa Fluor® 488 F(ab')2 Fragment of Goat anti-Mouse IgG (H+L)	Ziege		A-11017	Invitrogen	IF 1:500
Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Ziege		A-11008	Invitrogen	IF 1:500
Maus IgG	Alexa Fluor® 594 Goat anti-Mouse IgG (H+L), highly cross-adsorbed	Ziege		A-11032	Invitrogen	IF 1:500
Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 594 Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Ziege		A-11012	Invitrogen	IF 1:500

### 3 Stammbäume der transgenen Mäuse

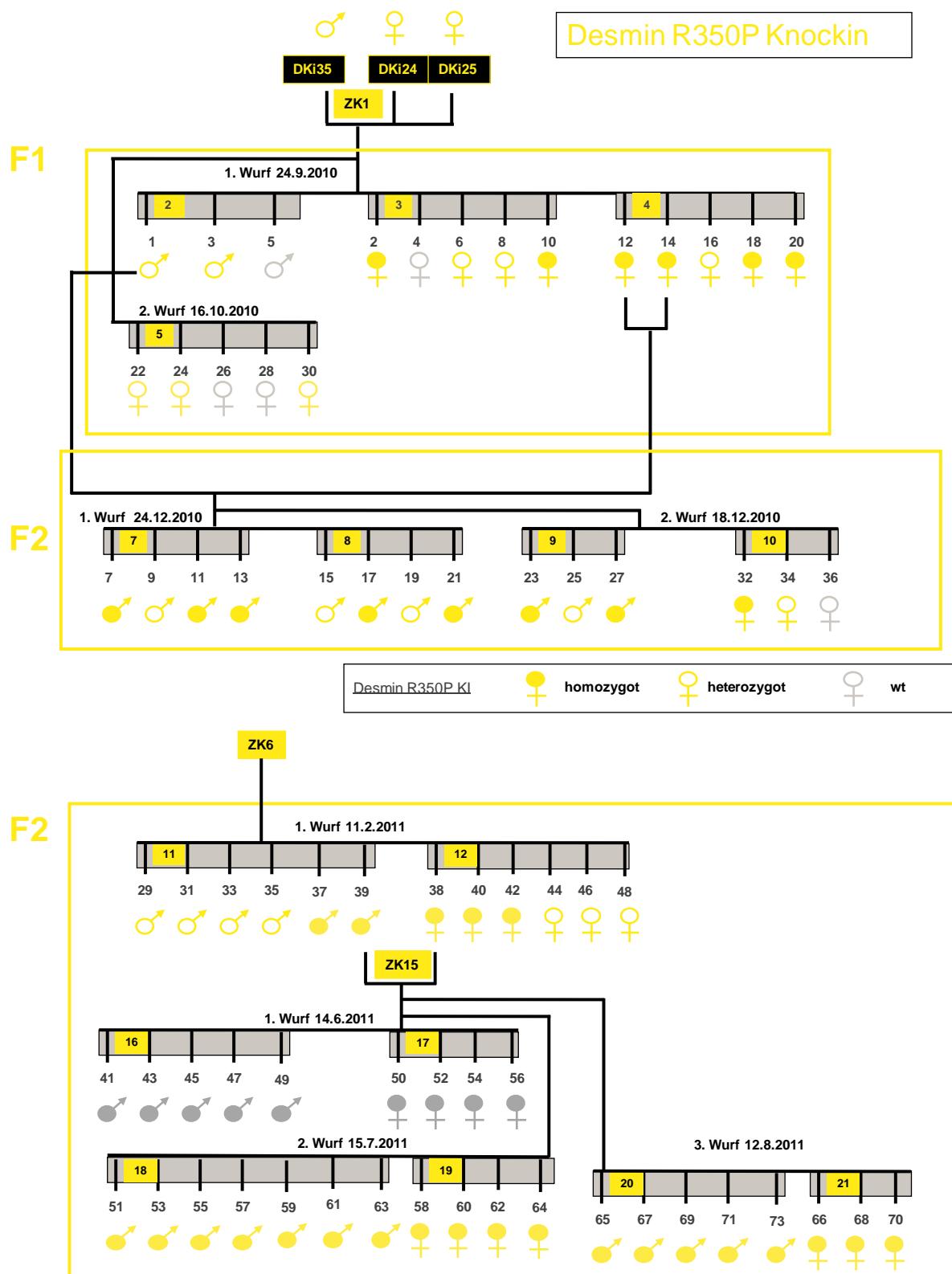
Aus der Verpaarung von transgenen Mäusen mit Immortomäusen® gab es relevante Nachkommen, aus denen immortalisierte primäre Myoblasten isoliert wurden (rot umrandete Tiere). VP: Verpaarung; ZK: Zuchtkäfig.

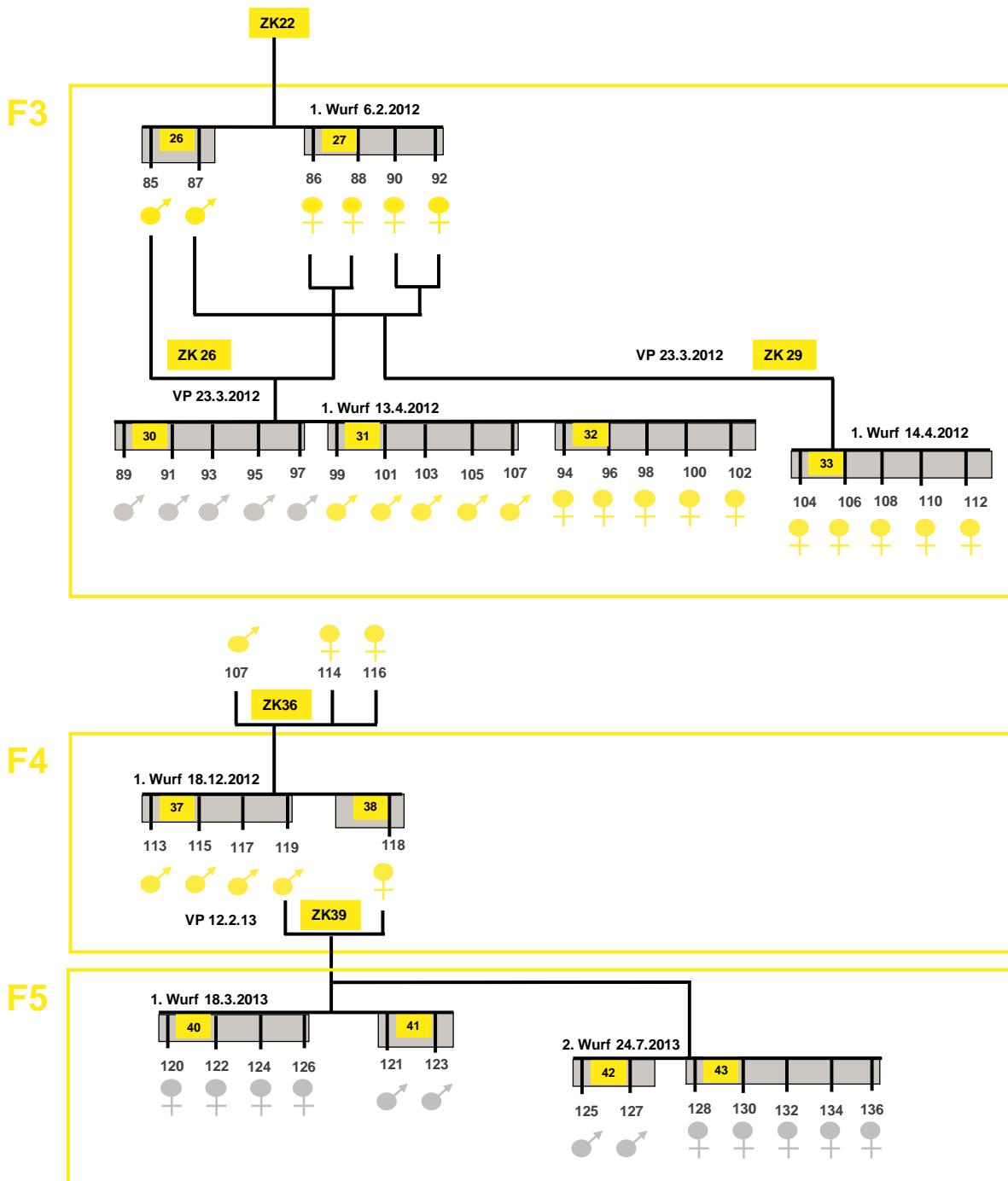
#### 3.1 Stammbaum Desmin Knockout Maus



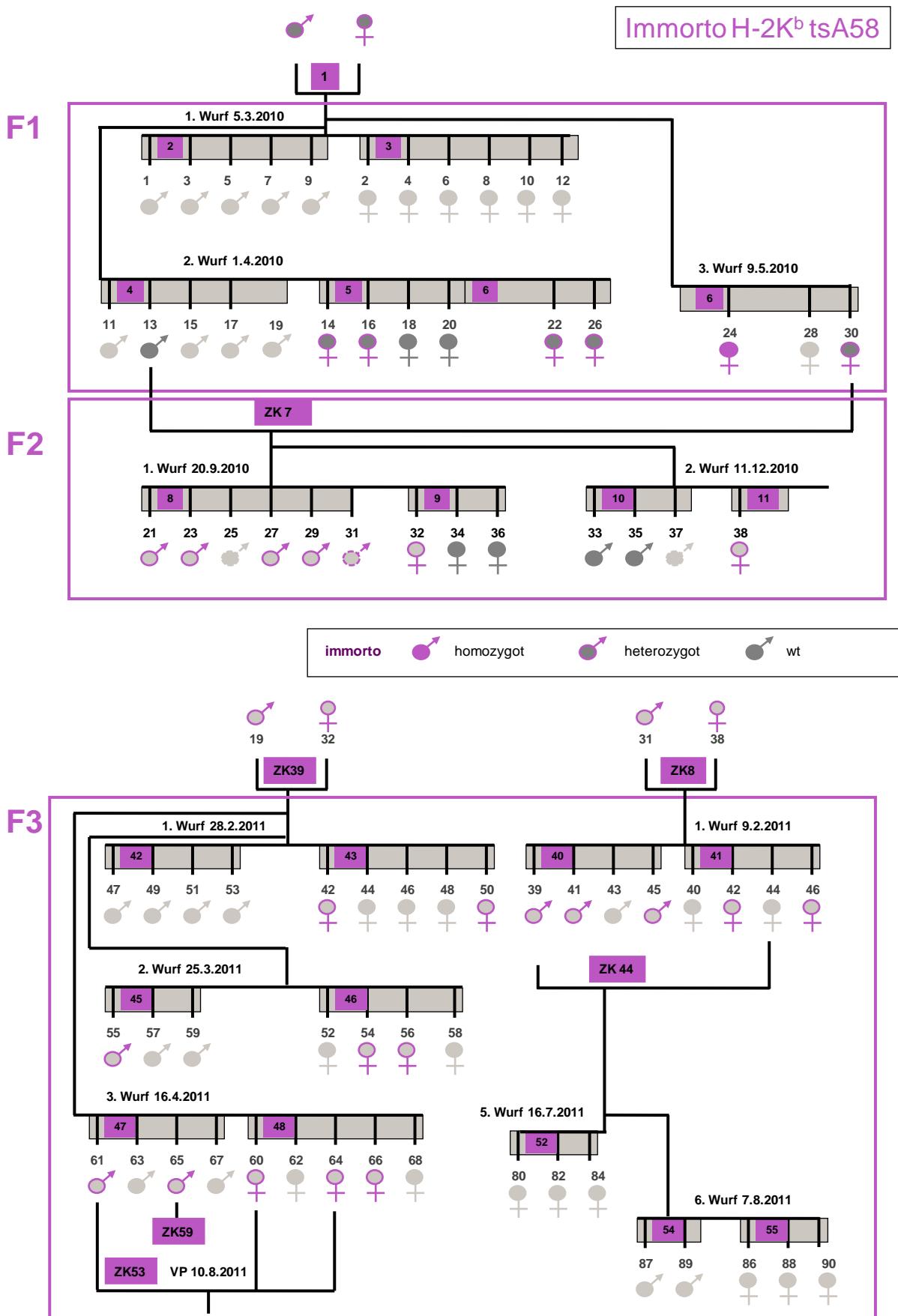


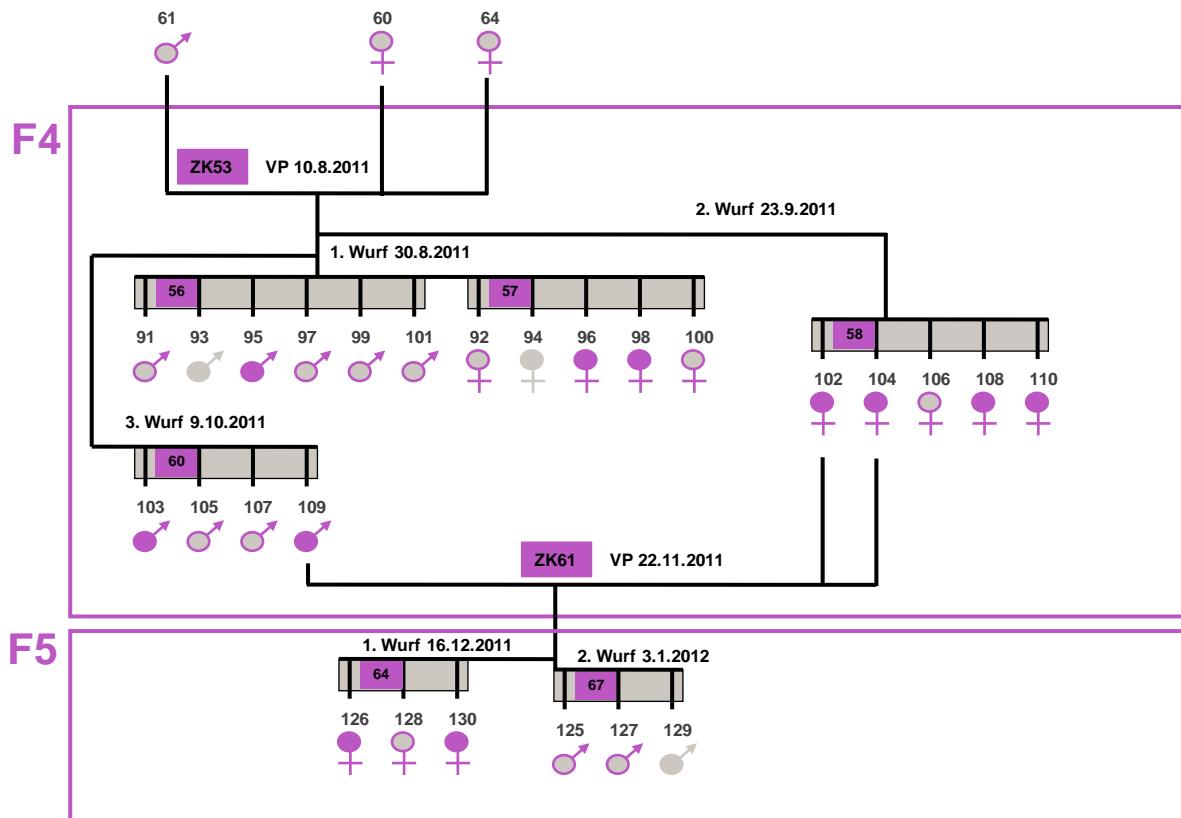
### 3.2 Stammbaum Desmin Knockin



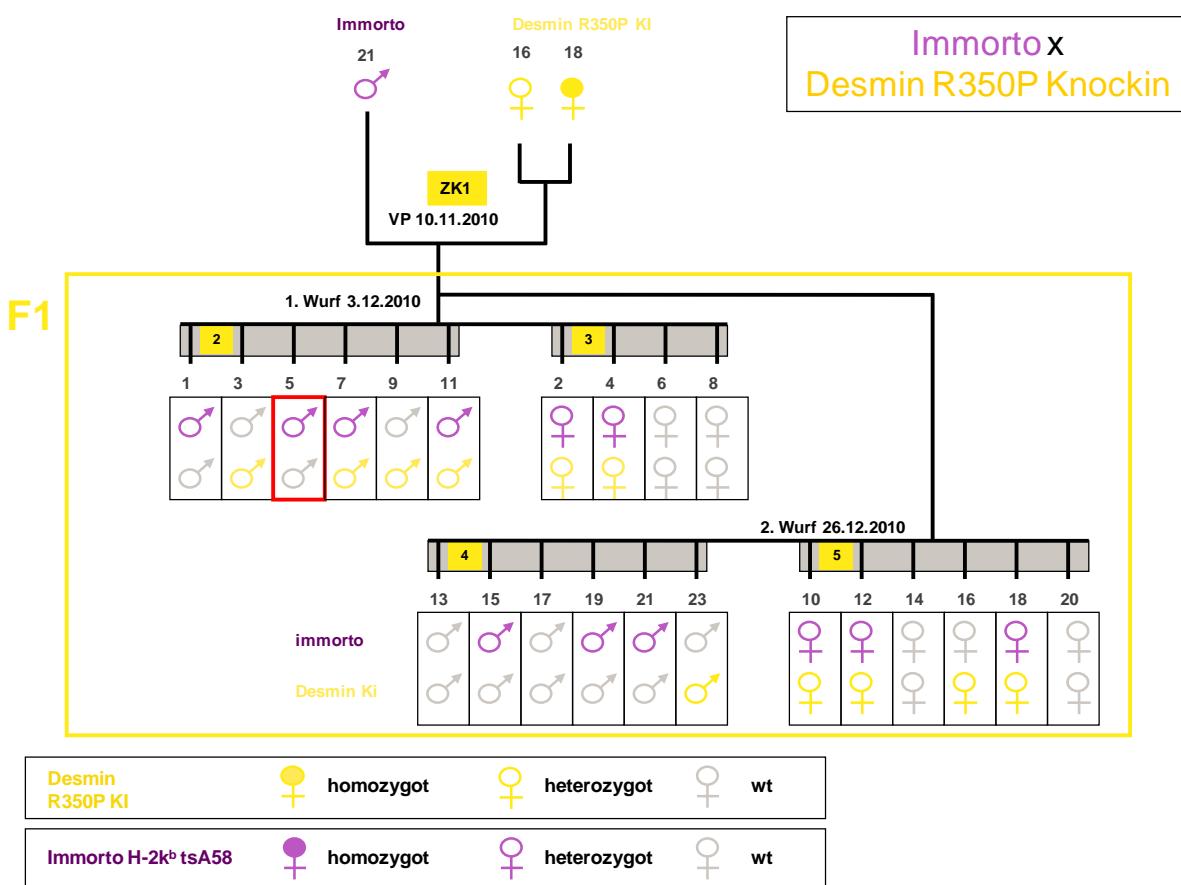


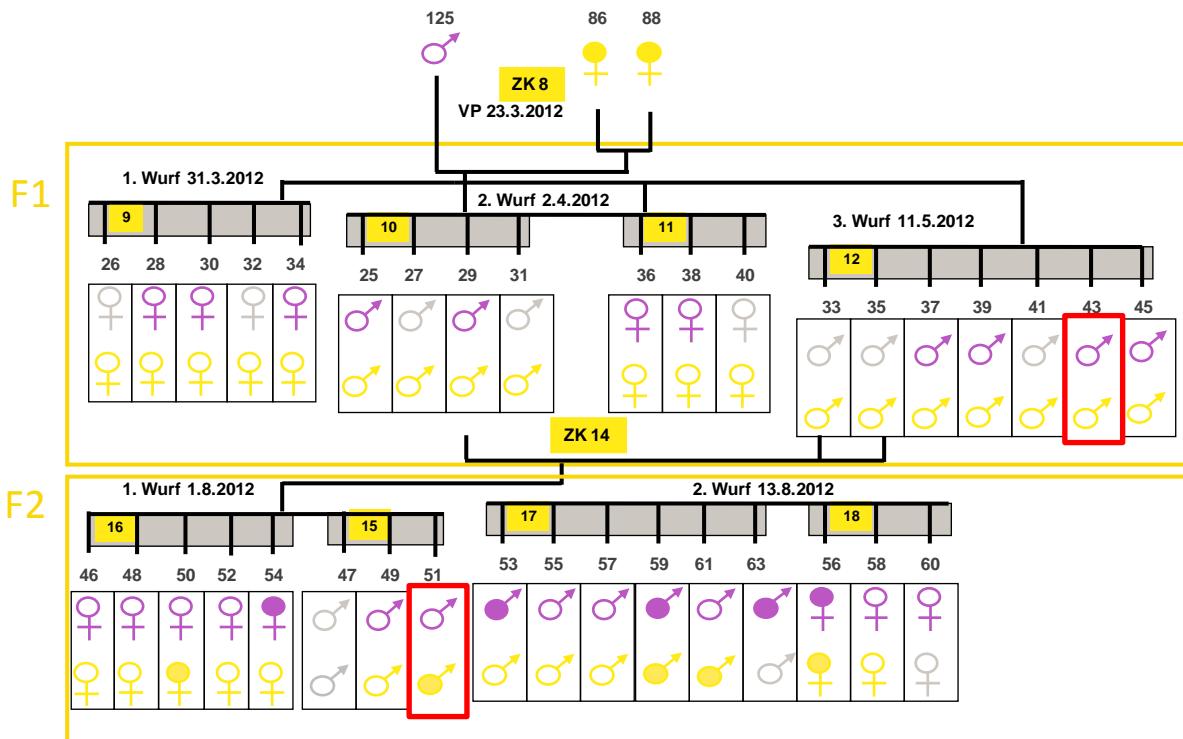
### 3.3 Stammbaum Immortomaus®



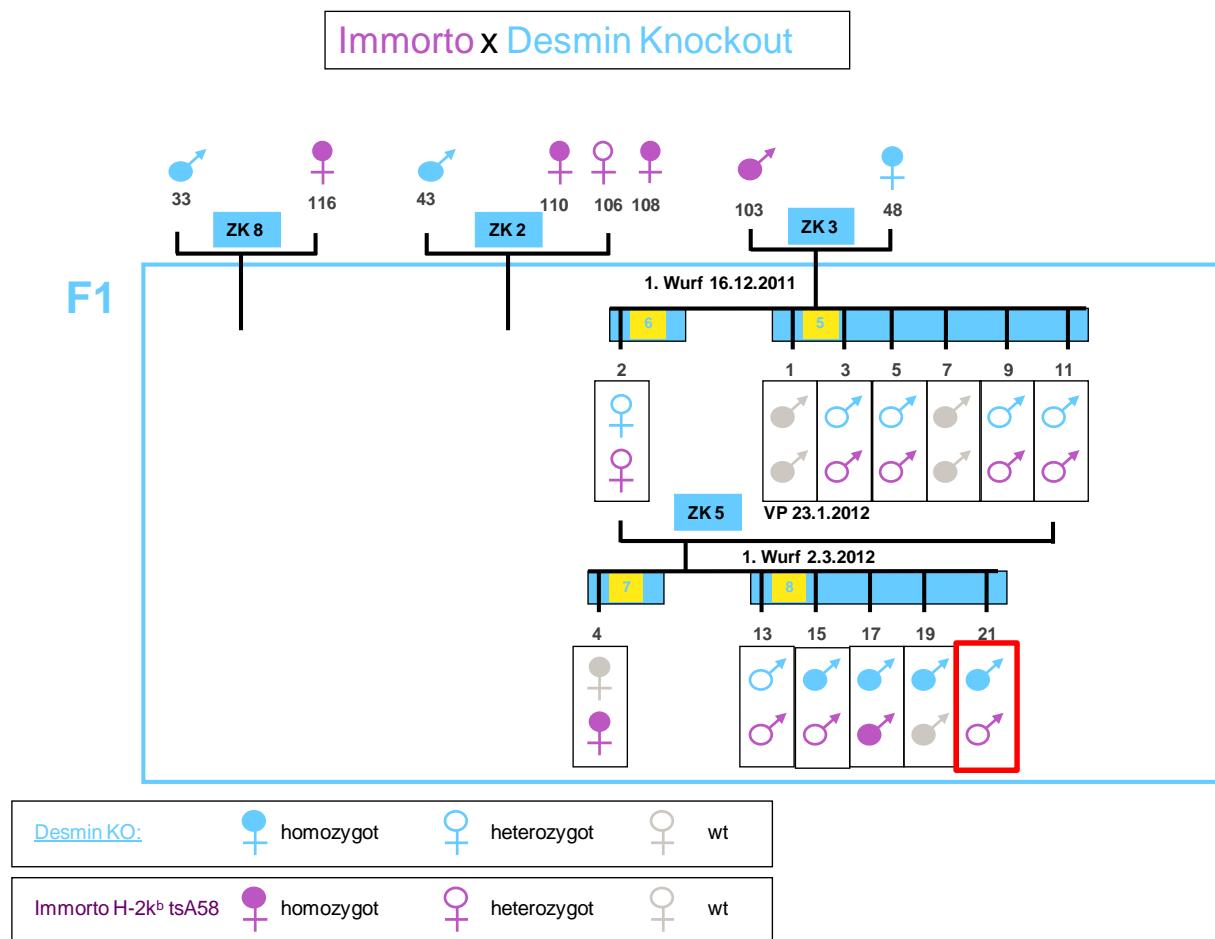


### 3.4 Verpaarung Immortomaus® x Desmin R350P Knockin





### 3.5 Verpaarung Immortomaus® x Desmin Knockout



## Danksagung

Frau Prof. Dr. Marianne Dieterich danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation unter hervorragenden Arbeitsbedingungen am Friedrich-Baur-Institut durchführen zu können.

Recht herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Maggie Walter, M.A. für die Möglichkeit einer Promotion, für die stets sehr gute Betreuung und für die wissenschaftliche und akademische Unterstützung, die mir zu Teil wurde, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Giese für die hervorragende Betreuung bei der Einzelmolekülspektroskopie, für die Motivation, Offenheit und Ideenfülle. Auch danke ich meiner Betreuerin Frau PD Dr. Dr. Sabine Krause sehr herzlich. Nicht nur für ihre kontinuierliche Betreuung, sondern auch für so manche Anregungen, Hilfestellungen, Ideen und für ihr Durchhaltevermögen. Ihre herausragende Expertise konnte mich immer wieder bei wichtigen Fragestellungen während des Projekts weiterbringen.

Besonders bin ich Marina Dusl, MSc., Dipl.-Ing. Christiana Kubny, Dipl.-Ing. Manuela Zitzelsberger, Dr. Sarah Feldkirchner, Dr. Rolf Stucka, Dr. Cordula Pertl, und Johannes Vogel für ihre kollegiale Unterstützung zu Dank verpflichtet. Als erste Anlaufstelle bei Problemstellungen und Fragen waren sie, auch freundschaftlich gesehen, unersetzlich.

Weiterhin bin ich Vielen zu Dank verpflichtet, die das Projekt in Ihrem Fortschreiten unterstützt haben. Dazu gehören das „FCS-Labor“, allen voran Martin Bartels, Felix Schmidt, Dr. Georg Nübling und Dr. Johannes Levin. Nicht nur deren kritisches Hinterfragen war entscheidend, sondern auch ihre moralische Unterstützung und Motivation waren weitreichend unabdingbar. Mein Dank gilt auch Dr. Andreas Deeg und Anne Reiner, die mir Einblicke in die biophysikalischen Analysen gewährt haben, Maria Schmuck für die unendliche Geduld bei Mikroskopiefragen und denen, die nicht namentlich erwähnt wurden, aber zum Gelingen dieser Arbeit mit ihrem Wissen beigetragen haben.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinen Geschwistern und Christopher für die unendliche Geduld und bedingungslose Unterstützung während dieser Zeit und für deren Rat und Kritik in vielerlei Hinsicht.

## Vorträge

**Kammermeier I, Krause S, Giese A, Walter MC:** Pathological desmin aggregation in myofibrillar myopathies studied at the single particle level. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie e.V. (DGNN, September 2012), Erlangen. Vortrag (abstract- 12dggnOP04 )

**Kammermeier I, Krause S, Giese A, Walter MC:** Pathologische Desmin-Aggregation bei Myofibrillären Myopathien auf Einzelmolekülebene. Kongress der deutschen Gesellschaft für Muskelkranke(DGM, Februar 2013), Aachen. Poster.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Zelluläre und molekulare Modelle von Desminopathien**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den ..... ....

(Irene Kammermeier)