



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Biophysikalische Untersuchung des muskelspezifischen
Intermediärfilament-Proteins Desmin und Mutanten**

Autor: Norbert Mücke
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule
Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Um einen der komplexesten „Self-Assembly“-Prozesse der Strukturbiologie eukaryontischer Zellen weiter aufzuklären, wurden im Rahmen dieser Arbeit die molekularen Mechanismen zur Bildung von löslichen Komplexen, Filamentvorstufen und Filamenten des muskelspezifischen Intermediärfilament-Proteins Desmin mit biophysikalischen Methoden untersucht. Dies war deshalb von großem Interesse, da in den letzten Jahren Mutationen im Desmin-Gen von Patienten als Ursache für die Entstehung von myofibrillären Myopathien nachgewiesen worden sind. Dabei ist in keinem Fall bekannt, inwieweit diese Mutationen die Filamentbildung direkt oder den Einbau der Filamente ins Zytoskelett der Muskelzelle betreffen.

Desmin ist ein fibrilläres Protein mit drei separat faltenden Subdomänen, der amino-terminalen nicht- α -helikalen „Kopf“-Domäne, der 40 nm langen zentralen α -helikalen „Stab“-Domäne sowie der carboxy-terminalen, nicht- α -helikalen „Schwanz“-Domäne. Humanes Desmin sowie entsprechende domänenverkürzte Desmin-Mutanten wurden rekombinant in Bakterien hergestellt, um so den Beitrag dieser einzelnen Domänen zu den funktionellen molekularen Wechselwirkungen für die Filamentbildung zu bestimmen. Die Renaturierung der in Harnstoff gelösten monomeren Proteine zu Assembly-kompetenten Komplexen, erfolgte durch eine Dialyse in Puffer geringer Ionenstärke. Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation wurde ermittelt, dass dabei tetramere Komplexe mit einem Sedimentationskoeffizienten von 5 S für das Wildtyp-Protein entstehen. Darauf aufbauend wurde die salzabhängige Bildung von höheren Oligomeren bis hin zu reifen Filamenten systematisch untersucht. Eine Filamentbildung wurde bei Wildtyp-Desmin und bei der Mutante, bei der die Schwanz-Domäne fehlt, beobachtet. Im Gegensatz dazu bildeten die kopfverkürzten Mutanten unter gleichen Bedingungen homogene Tetramere.

Quantitative Untersuchungen der aus Wildtyp-Desmin gebildeten Filamente mittels Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie ergaben, dass fibrilläre, lösliche Vorstufen - abhängig vom Puffersystem - gleichzeitig lateral und longitudinal assoziieren können. Im Zuge der elektronen- und rasterkraftmikroskopischen Messungen wurden drei Filamenttypen mit distinktem Durchmesser beobachtet. Ihre jeweiligen Persistenzlängen wurden mit Hilfe der Polymerstatistik bestimmt. Weiterhin wurden die linearen Massendichten dieser unterschiedlich dicken Filamente mit Hilfe des Rastertransmissionselektronenmikroskops in Kooperation mit dem Biozentrum in Basel bestimmt. Für die drei Filamenttypen wurden 30, 40 und 50 kDa pro Nanometer Filamentlänge ermittelt. Das entspricht einer Zahl von 24, 32 und 40 Monomeren pro Filamentquerschnitt. Diese Unterschiede in der Massendichte, zusammen mit den in der Anfangsphase der Filamentbildung beobachteten offenen kurzen, variablen Filamentstücken, ergeben einen wichtigen Hinweis darauf, dass die Filamente aus einer definierten Zahl von Bündeln dünner und relativ kurzer Filamente aufgebaut sein könnten. Ob es sich dann dabei um durchgängige, strukturell einheitliche Protofibrillen handelt, müssen zukünftige Untersuchungen klären.

Um den Einfluss der klinisch relevanten Desmin-Mutationen auf die Filamentbildung zu untersuchen, wurde die Komplexbildung der mutierten Proteine in Puffern geringer Ionenstärke untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur zwei von 24 Mutanten unter Tetramer-Bedingungen eine signifikante Abweichung vom Verhalten des unmutierten Proteins aufwiesen. Dennoch waren beide Proteine in der Lage, Filamente zu bilden. Ob auch bei ihnen die drei oben besprochenen Filamenttypen auftreten und ob deren mechanische Eigenschaften sich von denen des Wildtyp-Proteins unterscheiden, sollen zukünftige Untersuchungen klären.