INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Robert Kirmse

aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2007

Studium der Wachstumskinetik von Intermediärfilamenten mit Hilfe von Vimentin

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Langowski
Prof. Dr. Harald Herrmann-Lerdon

Don´t take life too seriously -

you won´t get out of it alive! ***(Elbert Hubbard)***

Danksagung

Prof. Dr. Jörg Langowski danke ich für die Betreuung dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt ihm für die guten Bedingungen im Labor, seine Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Prof. Dr. Harald Herrmann-Lerdon für die Übernahme des Koreferats und die gute Betreuung, sowie die stets offene Tür und Möglichkeit zur Diskussion.

Norbert Mücke danke ich für die Einarbeitung in die Rasterkraftmikroskopie, für die Unterstützung an der AUZ sowie zahllose technische Ratschläge und seine Bereitschaft zu jeder denkbaren Diskussion.

Tatjana Wedig möchte ich für die Hilfe bei allen Problemen im Labor danken. Die stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre im Labor trugen sehr zum Gelingen der Proteinaufreinigung und der EM-Präparationen bei.

Speziell meinen Kollegen Florian Hauger, Frank Aumann, Christian Busold und Alexander Gansen möchte ich danken. Ohne sie wäre die Zeit in der Gruppe nur halb so schön gewesen.

Allen Mitarbeitern, die während der Zeit dieser Arbeit der Abteilung Biophysik der Makromoleküle angehörten, danke ich für den netten Umgang miteinander.

Ein ganz besonderer Dank gilt Thomas Seiler, der trotz Hochzeit- und Umzugsstress Zeit gefunden hat diese Arbeit Korrektur zu lesen. Nicht zu vergessen die tolle Freundschaft während der Studiums- und Promotionszeit in Heidelberg.

Meine Freundin Ina Weidenfeld muss ich an dieser Stelle ganz besonders hervorheben: ohne Sie hätte ich die Höhen und Tiefen einer solchen Arbeit sehr viel schlechter durchgestanden.

Ich danke herzlich meinen Eltern, Christian und Monika Kirmse, die mich immer unterstützt haben.

Die Arbeiten fanden von Dezember 2003 bis Juli 2007 in der Abteilung Biophysik der Makromoleküle (unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Langowski) am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg statt. Das Projekt wurde durch das "International PhD-Program" des DKFZ gefördert.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wachstumskinetik der *in vitro* Filamentebildung des Intermediärfilamentproteins Vimentin untersucht, und versucht diese quantitativ zu beschreiben. Als Grundlage dienten bestehende qualitative Beschreibungen der Filamentbildung. Das Protein Vimentin wurde rekombinant in E. *coli* hergestellt und über Säulenaustauschchromatographie gereinigt und in 8 M Harnstoff-Puffer gelagert. Die Renaturierung von Vimentin vor den Versuchen erfolgte durch ein Dialyseverfahren gegen P_i-Puffer (2 mM Na-Phosphat, pH 7.5). Schon während der Dialyse bilden sich zuerst Vimentin-Dimere gefolgt von Tetrameren. Nach der Dialyse liegt Vimentin als Tetramer im P_i-Puffer vor, was mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge kontrolliert wurde.
Um die Wachstumskinetik zu messen wurde die Salzkonzentration im P_i-Puffer auf 100 mM KCl erhöht. Dadurch beginnen die Vimentin-Tetramere lateral zu assoziieren und es entstehen "Unit-Length-Filamente" (ULFs) aus acht Tetrameren. Diese ULFs können dann longitudinal zu langen Filamenten zusammenwachsen. Im Verlauf des Längenwachstums findet gleichzeitig eine Kompaktierung des Filaments statt. Diese radiale Kompaktierung konnte in dieser Arbeit nochmals bestätigt werden.
Das Längenwachstum per Zeiteinheit wurde zuerst mit Hilfe des Elektronen- und Rasterkraftmikroskops (EM & SFM) untersucht. Im EM wurde das Wachstum nach definierten Zeitschritten durch Zugabe von Glutaraldehyd gestoppt. Im SFM dagegen wurde die Reaktion durch Verdünnen stark verlangsamt und das Wachstum durch Adsorption an eine Oberfläche endgültig beendet. Durch Bildanalyse wurde die Längenverteilung der Filamente auf den resultierenden Bilderserien bestimmt. Zudem wurde der Einfluss der eingesetzten Oberflächen (kohlebeschichtete Kupfernetze im EM sowie Glimmer und Glas im SFM) charakterisiert und die Ergebnisse miteinander mit Hilfe statistischer Methoden verglichen. Dadurch konnte bestätigt werden, dass eine kinetische Messung des Filamentwachstums auf diese Weise möglich ist und dass die Resultate aus den EM und SFM Messungen miteinander verglichen werden dürfen.
Da mit Hilfe der Mikroskope insbesondere das laterale Wachstum vom Tetramer hin zum ULF innerhalb der ersten Sekunden nicht aufgelöst werden konnte, wurde diese Phase des Filamentwachstums mit einem "Stopped-Flow"-Gerät untersucht. Hierbei wurde das Vermischen der Reaktionslösungen mit Hilfe eines Computers gesteuert, wodurch eine Beobachtung der Reaktion nach wenigen Millisekunden möglich war. Der Verlauf der Reaktion wurde mit Hilfe von Laserlichtstreuung gemessen.
Zusätzlich wurden verschiedene kinetische Modelle auf Grundlage der bestehenden qualitativen Betrachtungen zum Filamentwachstum entwickelt. Aus diesen Modellen wurde ein Modell ermittelt, das die Messdaten am besten beschreibt. Durch mathematische Anpassung dieses Modells konnte dann eine erste qualitative Beschreibung der Wachstumskinetik von Vimentin vorgeschlagen werden, die quantitativen Daten optimal wiedergibt. So konnte an dieser Stelle bestätigt werden, dass ULFs tatsächlich zum Filamentwachstum beitragen müssen und längere Filamente durch End-zu-End Fusion zusammenwachsen. Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit eine, im Gegensatz zur Polymerisation von Aktin und Tubulin, neue Form des Filamentwachstums beschrieben werden, bei dem das Wachstum zuerst durch eine laterale Assoziation mit anschließender longitudinalen Verlängerung gekennzeichnet ist.

Abstract

In this work the growth kinetics of the intermediate filament (IF) protein vimentin was studied *in vitro* to develop a first quantitative description of the assembly reactions involved. An already existing qualitative model of the IF assembly provided a basis for the approach taken in this thesis. The protein vimetin itself was expressed recombinantely in E. *coli* and purified using ion-exchange column-chromatography and stored in 8 M urea-buffer. The protein was renatured prior to the experiments by dialysis against P_i-buffer (2 mM Sodium-Phosphat, pH 7.5). During the dialysis vimentin forms dimers followed by the formation of tetramers. These vimentin tetramers are the soluble species in the P_i-buffer after finishing the dialysis, which was checked by analytical ultracentrifugation.
Filament growth was initiated by raising the salt concentration in the P_i-buffer to 100 mM KCl. This leads to a first lateral aggregation of eight vimentin tetramers. The complex of eigth tetramers is termed "unit-length-filament" or ULF. These ULFs are then able to drive the longitudinal elongation of the filaments. During the elongation process the filaments also compact radially to form the observed 10 nm diameter. This compaction could also be observed during the experiments in this work.
The longitudinal elongation was recorded using electron- and scanning force microscopy (EM and SFM) after distinct time steps of filament growth. The elongation of the filaments was stopped by the addition of glutaraldehyde (EM) or through rapid dilution and adsorption to a solid support (SFM). The resulting image series were analysed and the length distribution of the generated filaments was measured. In addition the influence of the different solid supports (carbon coated EM grids, mica and glass) on the measured length distribution was characterized and the results were compared to each other using statistical means. In this way it was verified that a kinetic analysis of the images is feasible and that it is valid to match the EM and SFM results directly.
However, using the mircroscopes could not resolve first lateral assembly reactions of tetramers forming ULFs. To investigate this fast kinetic process a "stopped-flow" device was used. Here the solutions are rapidly mixed using computer controlled mechanized syringes which enables an observation of the reaction after a few milliseconds. The course of the assembly reaction was followed by laser-lightscattering.
In addition to the actual measurements, kinetic models were developed on the basis of the existing qualitative description. Employing these models different modes of filament assembly could be tested against the actual data. In this way a model which is able to describe the measurements was found. By fitting this model to the experimental data first reaction rate constants were calculated and a qualitative description of the assembly process was introduced. This model also confirmed the previously introduced qualitative description of IF assembly in general but also with regards to ULFs beeing a major intermediate for filament growth as well as the elongation of longer filaments by end to end fusion. This thesis therefore presents a new type of filament elogantion which, in contrast to the polymerisation of actin and tubulin, proceeds in a multi-step process characterized by a lateral aggregation phase which is followed by longitudinal growth.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **13**

1.1 Intermediärfilamente (IF) . . . 13

1.1.1 Klassifizierung . . . 14

1.1.2 Struktur . . . 14

1.1.3 Wachstumskinetik . . . 15

1.1.4 IF im Menschen und in der Zelle . . . 16

1.1.4.1 Bedeutung des IF-Proteins Vimentin . . . 16

1.2 IF als Ursachen für Erkrankungen . . . 18

1.3 Zielsetzung der Arbeit . . . 21

2 Material und Methoden **23**

2.1 Materialien . . . 23

2.1.1 Verbrauchsmaterial, biochemische Produkte und Laborgeräte . . . 23

2.2 Mikrobiologische Verfahren . . . 27

2.2.1 Transformation der E. *coli* Zellen . . . 27

2.2.2 Aufzucht der E. *coli* Zellen im Flüssigmedium . . . 28

2.3 Proteinaufreinigung . . . 28

2.3.1 Durchführung . . . 28

2.3.2 Ionenaustauschchromatographie . . . 29

2.3.3 Dialyse . . . 32

2.3.4 Proteinbestimmung im Spektrometer . . . 33

2.3.5 Polymerisierung zu Filamenten . . . 33

2.4 Rasterkraftmikroskopie . . . 33

2.4.1 Technische Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie und Messprinzip . . . 33

2.4.2 Abbildung von Objekten . . . 35

2.4.3 Verwendete Oberflächen in der Rasterkraftmikroskopie . . . 36

2.4.4 Rasterkraftmikroskopie in Flüssigkeit . . . 36
2.4.5 Probenvorbereitung . . . 37
2.5 Elektronenmikroskopie . . . 37
2.5.1 Technische Grundlagen der Elektronenmikroskopie . . . 38
2.5.2 Herstellung der Kohleoberfläche auf den EM-Grids . . . 39
2.5.3 Probenvorbereitung . . . 39
2.6 Analytische Ultrazentrifugation . . . 40
2.6.1 Theoretische Grundlagen der AUZ . . . 40
2.6.2 Ermitteln des Sedimentationskoeffizient mit dcdt+ . . . 44
2.6.3 Ablauf der AUZ-Messungen . . . 45
2.7 Schnelle Kinetiken (Stopped-Flow) . . . 45
2.7.1 Technische Grundlagen des Stopped-Flow-Moduls (SFM-3) . . . 45
2.7.2 Testmessungen zur Eichung des Stopped-Flow Moduls . . . 46
2.8 Lichtstreuung . . . 48
2.8.1 Lichtstreuung in der Theorie... . . . 50
2.8.2 ...und Praxis . . . 52
2.8.3 Wachstumsmessung über schnelle Kinetiken . . . 52
2.9 Reaktionskinetik . . . 53
2.9.1 Der grundlegende Verlauf einer chemischen Reaktion . . . 54
2.9.2 Reaktionsordnung . . . 55
2.9.3 Sonderfall - die Wachstumsreaktion (Polymerisation) . . . 56
2.10 Auswertung . . . 57
2.10.1 Bestimmung der Filamentlängen . . . 57
2.10.2 Berechnung und Kurvenanpassung der Modelle . . . 57
2.10.3 Statistische Methoden . . . 57

3 Ergebnisse **59**

3.1 Beobachtung des Vimentinwachstum mit EM & SFM . . . 59
3.1.1 Überprüfung der Vimentinlösung nach der Dialyse mittels AUZ . . . 59
3.1.2 EM & SFM von Vimentin-IFs . . . 61
3.1.3 Liefern EM und SFM vergleichbare Daten? . . . 61
3.1.4 Ergebnisse aus der EM und SFM . . . 62
3.1.5 Radiale Kompaktierung der Filamente . . . 66
3.2 Modellierung der Vimentin-Wachstumskinetik . . . 67

3.2.1 Das einfache Modell . . . 67
3.2.2 Das erweiterte Modell . . . 70
3.3 Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten . . . 76
3.3.1 Anpassung des Modells an die EM und SFM Ergebnisse . . . 76
3.4 Schnelle Kinetik des Vimentinwachstums . . . 78
3.4.1 Testen des Stopped-Flow-Moduls . . . 79
3.4.2 Überprüfen des Lichstreuungssignals im SFM-3 . . . 81
3.4.3 Ergebnisse der Kinetikmessung im SFM-3 . . . 82
3.4.4 Einfluss der Flussgeschwindigkeit auf das Messergebnis . . . 85
3.4.5 Modellierung der Stopped-Flow Kinetik . . . 86
3.4.6 Anpassen des Modells an die Stopped-Flow Messdaten . . . 87

4 Diskussion **89**
4.1 Untersuchung der Wachstumskinetik . . . 89
4.2 EM- und SFM-Kinetikmessungen . . . 90
4.3 Stoppped-Flow-Kinetiken . . . 92
4.4 IF-Wachstum - ein Modell . . . 94
4.5 Relevanz für das Wachstum von IFs in der Zelle . . . 96
4.6 Abschließende Betrachtung und Ausblick . . . 96

5 Anhang **99**
5.1 Kinetisches Modell, Berkerley Madonna Eingabeskript . . . 100
5.1.1 Einfaches Modell . . . 100
5.1.2 Erweitertes Modell . . . 101
5.1.3 Erweitertes Modell für Stopped-Flow . . . 102
5.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen . . . 103
5.3 Eigene Publikationen . . . 105
5.3.1 "Peer-Reviewed" Journals . . . 105
5.3.2 Buchkapitel . . . 105
5.3.3 Posterpräsentation auf internationalen Konferenzen . . . 105
5.3.4 Vortrag . . . 106

Literaturverzeichnis **107**

Kapitel 1

Einleitung

Unglücklich sind alle, die nur für Resultate arbeiten[1]

1.1 Intermediärfilamente (IF)

Im Zytoplasma von Metazoenzellen findet man ein dynamisches Filamentnetzwerk. Dieses Zytoskelett wird aus drei unterschiedlichen Filamenttypen aufgebaut, den Actinfilamenten (AF), den Intermediärfilamenten (IF) und den Mikrotubuli (MT). Alle drei Komponenten interagieren miteinander und erhalten so die mechanische Stabilität. Zusätzlich beeinflussen die Filamente die äußere Form der Zelle und spielen bei der Fortbewegung sowie der Zellteilung eine Rolle [45]. Während der Zellteilung sind MTs an der Verteilung der Chromosomen auf die Schwesterzellen beteiligt. Befindet sich die Zelle nicht im Prozess der Teilung (S-Phase), können sich an den MT so genannte Motorproteine fortbewegen und andere Moleküle durch die Zelle transportieren. Weiterhin kann das Zytoskelett in seiner Gesamtheit das Zytoplasma in variable Regionen unterteilen und dadurch eine organisatorische Funktion auf zelluläre Prozesse ausüben. Ein offensichtliches Beispiel dafür ist die Form der Zellen, die durch das Zytoskelett beeinflusst wird. Leukozyten bewegen sich, wie viele andere Zellen, aktiv mit Hilfe des Zytoskeletts fort. Auf der anderen Seite werden extreme Formen wie z. B. die der Neuronen ermöglicht, deren Axone bis zu 1 m lang werden können.
IF haben einen Durchmesser von 8 bis 10 nm. Dieser liegt zwischen dem von Actin (~ 7-9 nm) und dem der Mikrotubuli (~ 20 nm). Diese Eigenschaft beeinflusste die Namensgebung (*intermediate*, engl. dazwischenliegend). Ihre Untereinheiten sind zudem einer der am wenigsten löslichen Teile der Zelle. Dieses Verhalten liegt in ihrer Struktur begründet. IF-Proteinen haben eine lange, stäbchenförmige Ausdehnung. Im Gegensatz zu globulären Proteinen beeinträchtigt diese Struktur die Löslichkeit, da polare und unpolare Seitenketten gleichermaßen zugänglich sind. Bei globulären Proteinen ragen die unpolaren Seitenketten meist in das Innere der Struktur. Um IFs in Lösung zu bringen, wird daher in der Regel Harnstoff in hoher Konzentration (4 bis 8 M) eingesetzt.

[1] L.E.Modesitt Jr. (ebenso alle Folgenden)

Im Gegensatz zu den beiden anderen Filamentsystemen, die aus Actin und Tubulin aufgebaut werden, ist die Struktur der IF-Proteine noch nicht vollständig geklärt. AF und MT hingegen sind bis ins atomare Detail erforscht und die Kristallstruktur ihrer Untereinheiten (Actin und Tubulin) ist über die "Protein Data Bank" abrufbar (http://www.rcsb.org). Actin und Tubulin sind lösliche globuläre Proteine, die zu den jeweiligen Filamenten polymerisieren. Deren Reaktionskinetiken wurden schon sehr gut untersucht und über die Jahre konnten die Modelle dazu stark verbessert werden [68, 69, 70, 99, 102, 103]. Im Vergleich dazu ist über IFs einiges weniger bekannt. Kristallstrukturen existieren nur von Teilstücken der Proteine, da sich diese aufgrund der stäbchenförmigen Struktur sehr schlecht kristallisieren lassen. Die Reaktionskinetik wurde noch nicht quantitativ beschrieben, da diese, aufgrund der Struktur der IF-Proteine, schwieriger zu erfassen ist. In dieser Arbeit sollte daher geklärt werden, ob ein kinetisches Modell für das Filamentwachstum entwickelt werden kann und ob es möglich ist die Geschwindigkeitskonstanten für die Wachstumskinetik zu bestimmen.

1.1.1 Klassifizierung

Neueren Erkenntnissen zur Folge [46] entstammen die IF-Proteine einer Multigenfamilie, welche sich in H. *sapiens* aus ~65 Genen zusammensetzt. Es gibt verschiedene Arten von IF-Proteinen, die in fünf Klassen unterteilt werden. Ein erstes Kriterium zur Klassifizierung der Proteine ist ihre Primärstruktur. Anhand ihrer Sequenzhomologie werden die im Kern vorkommenden Lamine und vier weitere zytoplasmatische Klassen unterschieden[36] (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Vereinfachte Kurzübersicht über die verschiedenen IF-Typen .

Filamenttyp	Filamenttyp
Type I & II	Keratine (sauer & basisch); werden in verschiedenen Arten von Epithelzellen hergestellt (z. B. Haut, Harnblase)
Type III	Vimentin, Desmin, Glial Fibrillary Acidic Factor (GFAF) und Peripherin; diese werden in Fibroblasten, Endothelzellen, Leukozyten, Muskeln und Astrozyten, sowie in peripheren Nervenzellen hergestellt.
Typ IV	Neurofilament-Proteine, welche nach Molekulargewicht unterschieden werden (H, heavy; M, medium; L, low); in diese Gruppe gehört z. B. Internexin. IFs des Typ IV werden hauptsächlich in Neuronen gebildet.
Typ V	Lamine; diese haben eine Importsequenz für den Zellnukleus. Sie kleiden die innere Zellkernmembran aus und tragen zur Neubildung der Kernhülle nach der Zellteilung bei.

1.1.2 Struktur

Es gelang bisher nur einzelne Fragmente der IF-Proteine zu kristallisieren. Durch das Zusammensetzen dieser Einzelteile haben wir heute eine gute Vorstellung über das Aussehen eines IF-Proteins. Es ist lang und stäbchenförmig mit zentralen alpha-helikalen Domänen. Eine, in allen Einzelheiten gelöste Struktur ist aber noch nicht verfügbar.
Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, ist die zentrale Struktur, der "Rod", in vier alpha-helikale Bereiche unterteilt. Diese werden als 1A, 1B, 2A und 2B bezeichnet. Drei kurze Linkersequenzen, L1, L2 und L12 verbinden die helikalen Bereiche miteinander. Die größte Sequenzhomologie findet man im Bereich der Helices 1A und 1B sowie an den Enden des "Rods". Diese Bereiche spielen eine wichtige Rolle in

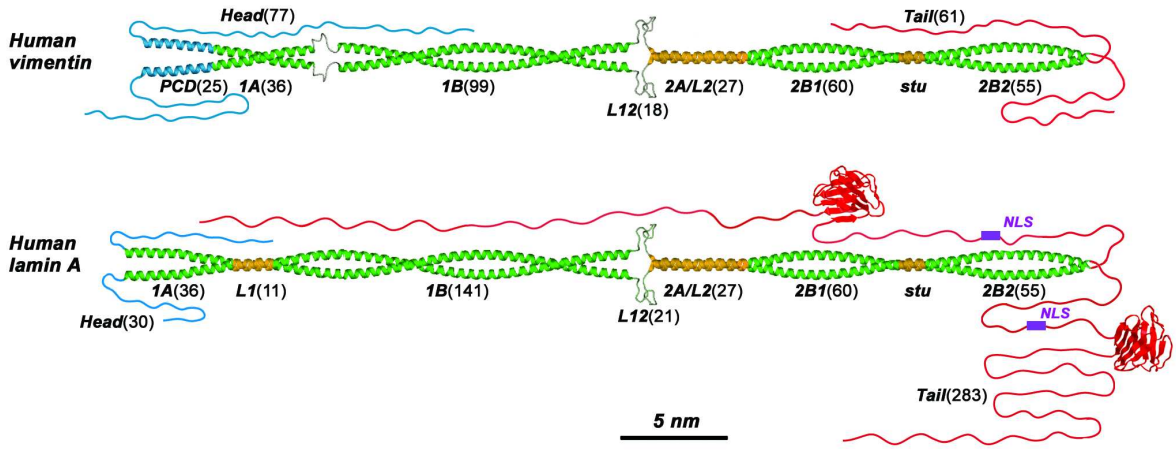

Abbildung 1.1: Gezeigt ist ein Vimentin- und ein Lamin A-Tetramer [45]. Die bekannten Strukturmerkmale sind gekennzeichnet. Die Beschreibung findet sich im Text. Auffällig ist, dass sich die einzelnen IF-Proteine, trotz hoch konservierter Strukturmerkmale, deutlich z.B. in der "Tail"-Domäne unterscheiden.

der Dimer-Dimer Interaktion während des Filamentwachstums [86, 105, 88]. Ein Merkmal der "Rod"-Domäne ist das Heptadenmotiv $(abcdefg)_n$. Unterbrochen wird dieses Motiv durch eine als "Stutter" bezeichnete Region in der Helix 2B. Dieser "Stutter" ist innerhalb der IF-Proteine hoch konserviert. Im Heptadenmotiv bestimmen hydrophobe Aminosäuren an den Positionen a und b die Dimerisierungsstärke, während Aminosäuren an den Positionen e und g für die Spezifität verantwortlich sind [5] mit der zwei IF-Monomere lateral assoziieren. Zwei IF-Polypeptide können auf dieser Grundlage das für IF typische "Coiled-Coil" aufbauen. Dies wird durch das Umeinanderwinden der zentralen "Rod"-Domänen zweier IF-Proteine erreicht. Abbildung 1.1 zeigt ein solches "Coiled-Coil". Die sog. "Head" und "Tail" Domänen schließen den zentralen "Rod" jeweils am N- und C-terminalen Ende ab und weisen keine definierte Struktur auf. Sie liegen als "random-coil" vor [36, 101].

1.1.3 Wachstumskinetik

Im Gegensatz zur Reaktionskinetik von Actin und Tubulin zu langen Filamenten und Mikrotubuli, läuft das Wachstum der IF in mehreren unterschiedlichen Stufen ab. Ein qualitatives Modell dazu wurde bereits 1996 von H. Herrmann und U. Aebi vorgestellt [43]. Der Wachstumsprozess der beiden anderen Filamentsysteme (AF und MT) wurde hingegen schon eingehend quantitativ untersucht. [68, 69, 70, 99, 102, 103]. Die Reaktionskinetik dieser Filamentsysteme ist prinzipiell einfacher zu erfassen, da die Komponenten (Actin und Tubulin) nach den Gesetzen einer bimolekularen Reaktion an das wachsende Filament anlagern. Eine weitere Besonderheit ist das gerichtete Wachstum. So haben AF und MT ein sogenanntes Plus- und Minusende. So kann das MT an dem Plusende durch Tubulin verlängert werden, wohingegen am Minusende Tubulineinheiten wieder freigesetzt werden.
Im Gegensatz zu AF und MT verläuft der Wachstumsprozess der IF nicht durch einfaches Anlagern der löslichen Vorstufen an das wachsende Filament. Es wurde ein mehrstufiger Prozess für das IF-Wachstum *in vitro* beschrieben [43]. Dabei wird in einem ersten Schritt aus den IF-Proteinen Dimere und Tetramere durch laterale Assoziation gebildet. Dieser Schritt läuft allerdings bereits bei der Dialyse aus dem Harnstoff- in den Phosphatpuffer ab. Sobald die Harnstoffkonzentration auf 6 M fällt, bilden sich aus den Proteinmonomeren Dimere. Vimentin-Tetramere bilden sich bei ca. 4 M Harnstoff und stellen die lösliche Form im Phosphatpuffer am Ende der Dialyse dar. Durch Erhöhen der Salzkonzentration kann das laterale Wachstum gestartet werden und verläuft vom Tetramer bis hin zum so

genannten "Unit-Length-Filament" (ULF). Dieses besteht aus acht Tetrameren. Die gebildeten ULFs können durch longitudinales Wachstum lange Filamente bilden. Während der Verlängerungsphase kommt es auch zu einer radialen Kompaktierung der Filamente, wodurch der typische Durchmesser der IFs erreicht wird.
Die verschiedenen IF-Proteine polymerisieren, trotz großer Unterschiede in der Primästruktur, zu morphologisch ähnlichen Filamenten. Dies kann durch eine nahezu identische Sekundärstuktur erklärt werden, die alle IF-Proteine ausbilden (siehe oben). Diese Struktur ist für alle IF-Proteine charakteristisch.

1.1.4 IF im Menschen und in der Zelle

IFs kommen in nahezu jedem Gewebe und Organ des menschlichen Körpers vor. Angefangen von den Haaren bis hinein in den Zellkern nehmen die IF ihre mannigfaltigen Aufgaben wahr (Abb 1.2). In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass sie nicht einfach nur für die mechanische Stabilität der Zellen verantwortlich sind. Die klassische Sichtweise [51] wird dabei mehr und mehr überholt. Neuere Ergebnisse zeigen, dass IFs regulatorischen Einfluss auf Zellorganellen haben und im Prozess, neu hergestellte Proteine an ein bestimmtes Ziel zu bringen (engl. "protein targeting"), eine Rolle spielen.

1.1.4.1 Bedeutung des IF-Proteins Vimentin

IFs aus dem Protein Vimentin werden in dieser Arbeit verwendet. Obwohl Vimentin ein evolutionär konserviertes Protein ist, es kommt sogar in Haifischen vor, sind seine Funktionen noch weitgehend ungeklärt. Es wurde versucht durch den Knock-Out von Vimentin in Mäusen genaue Kenntnisse darüber zu erlangen, ob und wie Vimentin im Organismus funktioniert. Bei diesen Versuchen wurde jedoch kein offensichtlicher Phänotyp gefunden, der auf einen eindeutigen Vimentindefekt zurückgeführt werden konnte [23]. Weiterhin wurde in diesen Experimenten auch keine Reaktion des Organismus auf das Fehlen von Vimentin beobachtet. So wäre es denkbar gewesen, dass andere IF-Typen verstärkt exprimiert werden, um den Ausfall von Vimentin abzufangen. Dies konnte aber nicht nachgewiesen werden. Ohne den Einfluss selektiver Faktoren hatte die Abwesenheit von Vimentin keinen Einfluss auf die Fortpflanzung bzw. Entwicklung der beobachteten Mäusepopulation. Dies hatte zur Folge, dass Vimentin nur eine geringe Bedeutung bei zellulären Vorgängen beigemessen wurde.
Bei genaueren Experimenten mit verschiedenen selektiven Bedingungen, bei welchen die Vimentin-Knock-Out Mäuse evolutionärem Stress ausgesetzt wurden, hatte das Fehlen von Vimentin dann doch deutlichere Auswirkungen. So wird unter Anderem die Wundheilung nach einer Hautverletzung beeinträchtigt. Ein ähnlicher Effekt kann auch in embryonalem Gewebe beobachtet werden [29]. Weiterhin konnte man aufgrund dieser Beobachtungen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber mechanischer Belastung in primären Fibroblasten feststellen. Generell zeigten Zellen ohne Vimentinfilamente eine verringerte mechanische Stabilität, Motilität und Migrationsfähigkeit. All diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass Vimentin eine entscheidende Rolle für die mechanische Stabilität in der Zelle spielt [30].
Bei T-Lymphozyten konnte zudem eine verminderte Resistenz gegen Deformationen festgestellt werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Vimentin eine wichtige Rolle bei der Transmigration von T-Lymphozyten durch Endothelgewebe spielt. Weiter Beispiele, die auf mögliche Funktionen von Vimentin hindeuten, beschreiben eine Veränderung des Tonus in vaskulären Gefäßen [92, 91] sowie eine abgeschwächte Gefäßerweiterung bei Vimentin-null Mäusen [54]. Entfernt man solchen Mäusen

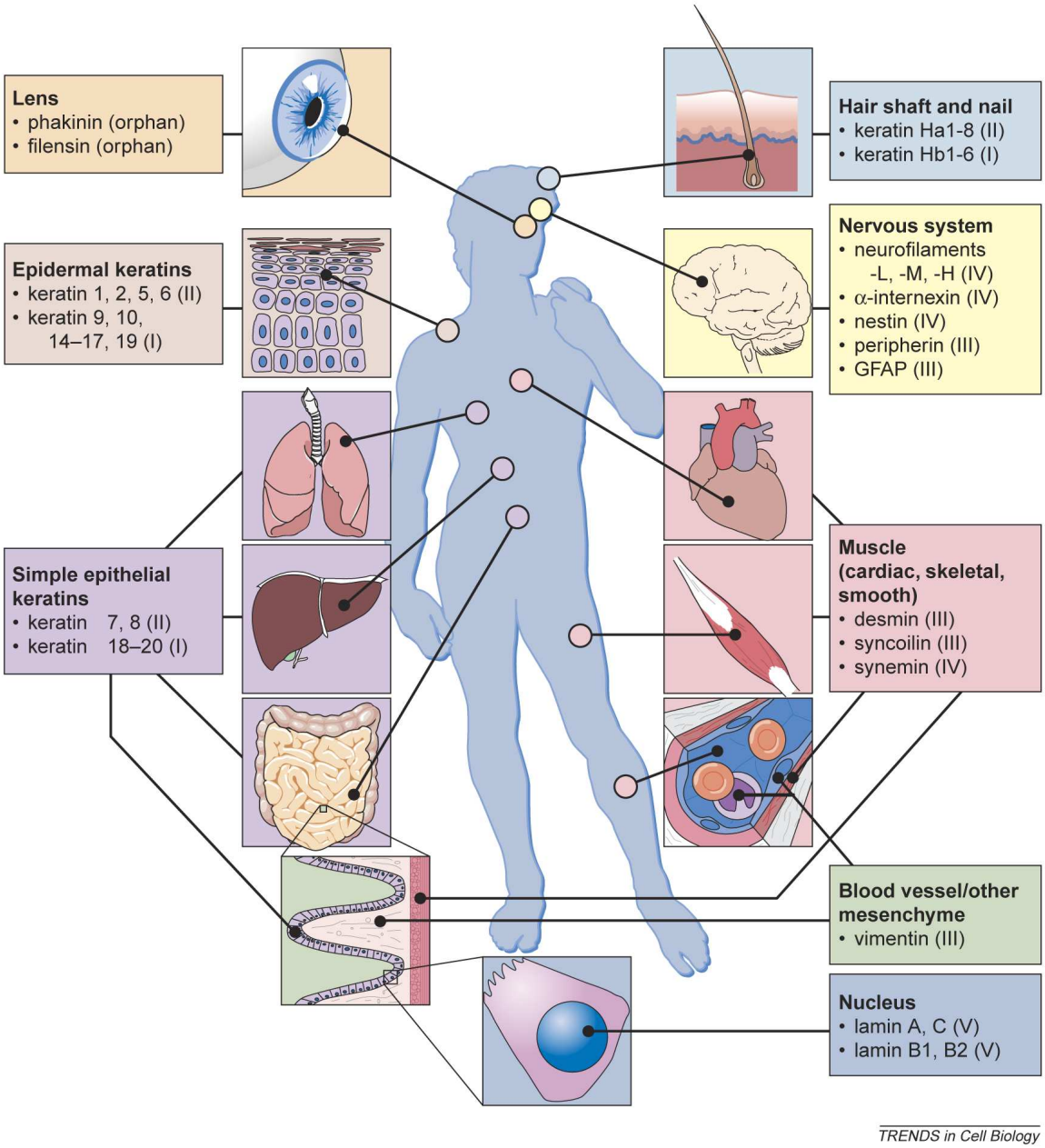

Abbildung 1.2: Die Abbildung wurde von Diana M. Tiovola et al. [95] übernommen und zeigt einen einfachen Überblick darüber, wo IFs im Körper eine Rolle spielen. Zusätzlich wird hier noch eine kurze Einteilung vorgenommen welcher Filamenttyp in dem jeweiligen Gewebe vorherrschend ist.

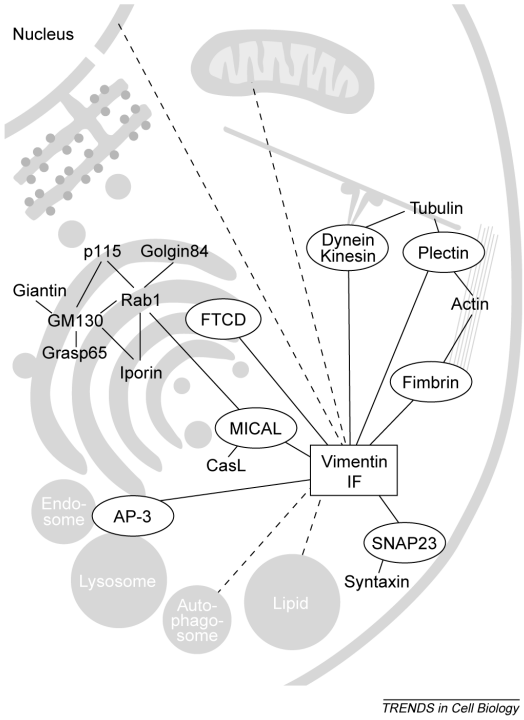

Abbildung 1.3: Gezeigt sind die Interaktionen von Vimentinfilamenten mit Proteinen oder Organellen in der Zelle. Gestrichelte Linien weisen auf Interaktion über noch unbekannte Linkerproteine hin. Abbildung nach Diana M. Tiovola et al. [95].

3/4 ihrer Nierenmasse, so führt dies zu einem kompletten Nierenversagen und dem Tot der Tiere. Im Gegensatz dazu sterben Wildtyp-Tiere bei gleicher Behandlung nicht.
In der Zelle interagieren Vimentin-IFs in erster Linie mit Komponenten des Zytoplasmas. Hier wird Vimentin primär eine Beteiligung an Stoffwechsel- und Transportvorgängen sowie dem Lipidmetabolismus zugeschrieben (s. Abb. 1.3). Im Lipidstoffwechsel scheint das Vimentinfilamentsystem Voraussetzung für die Bildung von Lipidtropfen zu sein und übt eine stabilisierende Wirkung auf diese aus [33, 52]. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass Vimentin am Glycosphingolipid-Kreislauf über Endosomen und den Golgi-Apparat beteiligt ist [37]. Weiterhin konnte *in vitro* die Beteiligung von Vimentin an der Stressantwort der Zelle gezeigt werden [64, 72]. Auch an verschiedenen Signaltransduktionsprozessen konnte eine Beteiligung von Vimentin nachgewiesen werden [97]. Hier scheint Vimentin durch lösliche und unlösliche Fraktionen im Zytoplasma regulativ auf die Signalwege Einfluss zu nehmen.

1.2 IF als Ursachen für Erkrankungen

Erkrankungen durch IFs gehen auf Mutationen an den jeweiligen IF-Proteinen zurück und werden größtenteils autosomal dominant vererbt [34, 35]. Als erste Krankheit wurde Epidermolysis bullosa simplex (EBS) einem Defekt an den IF zugeordnet. EBS ist eine Krankheit an Keratin-IFs, bei der die Epidermis extrem empfindlich auf mechanische Belastungen reagiert. Es entstehen schwere Hautblasen durch Zytolyse der basalen Epidermisschicht [25]. Mittlerweile sind 14 Mutationen an Keratingenen bekannt, die Krankheitsbilder ausprägen können. Diese reichen von autosomal dominanten Erkrankungen an den Haaren oder Nägeln über Kornea-Defekte am Auge bis hin zu Störungen an epithelialen Keratinen bei chronischen Lebererkrankungen [24, 77].

Laminopathien sind durch Lamin-IFs ausgelöste Krankheiten. Die erste bekannte Laminopathie, die Emery-Dreyfus-Muskeldystrophie (EDMD), wurde 1999 beschrieben [7]. Danach konnten weiter Krankheiten den Veränderungen im LMNA-Gen zugeordnet werden. Eine Übersicht findet man in [16]. Eine kurze Zusammenfassung ist in Tabelle 1.2 zu sehen. Vermutungen legen nahen, dass eine Laminstörung die Stabilität der Kernhülle schwächt. Diese Destabilisierung wirkt sich dann negativ auf die Organisation des Chromatins aus.

Tabelle 1.2: Übersicht über einige Lamin Krankheiten. Modifiziert nach [16].

Krankheit	Vererbung	Klinischer Phänotyp	Zitat
HutchinsonGilford Progerie	De novo Mutation	Vorzeitiges Altern, einschließlich Haarausfall und Verlust von subkutanem Fett. Vorzeitige Arteriosklerose; Tot in den Jugendjahren	[28, 31, 78]
Atypischen Werner Syndrom	Autosomal Dominant	Vorzeitiges Altern beginnt in der 2. Lebensdekade; Kataraktbildung, Sklerodermitis, Vorzeitige Arteriosklerose, Ergrauen der Haare.	[21, 1]
Emery-Dreyfuss MuskelDystrophie Typ 2	Autosomal Dominant	Langsam fortschreitende Verkürzung und Schwächung der Muskeln, Schwund von Skelettmuskeln und Kardiomyopatie mit Störung des Blutflusses	[6, 7, 53]
Emery-Dreyfuss MuskelDystrophie Typ 3	Autosomal rezessiv	Langsam fortschreitende Verkürzung und Schwächung der Muskeln, Schwund von Skelettmuskeln und Kardiomyopatie mit Störung des Blutflusses	[4]
Gliedermuskel Dystrophie	Autosomal dominant	Langsam fortschreitende Schulter- und Beckenmuskelschwäche sowie deren Rückgang; Nachfolgend dann Muskelverkürzungen und Herzstörungen	[60, 94]
dilatative Kardiomyopathie	Autosomal dominant	Ventrikulare Dilatation, verschlechterte systolische Kontraktivität, Herzrhythmusstörung, Durchblutungsstörung	[13, 32]
CharcotMarieTooth Typ 2B1	Autosomal rezessiv	Motorische Störungen der unteren Gliedmaßen, Schwierigkeiten beim Gehen, Sekundäre Deformationen am Fuß und eingeschränkten bzw. fehlenden Sehnenreflexe ab der 2. Dekade	[79, 90]
Familiäre Partielle Lipodystrophie, Dunnigan Typ	Autosomal dominant	Verlust von Fettgewebe im Körper sowie den Extremitäten; gleichzeitig wird Fett im Hals- und Gesichtsbereich abgelagert. Oft einhergehende insulinresistente Diabetes, Hypertriglyceridemia und gesteigerte Anfälligkeit für Arteriosklerose	[15, 80, 83]
Mandibuloacrale Dysplasia	Autosomal rezzesiv	Verzögerte Schließung der Schädelstruktur, Platzmangel für die Zähne, Kleinwuchs, Lipodystrophy, Gelenkverkürzungen, Unterentwicklung des Kiefers und des Schlüsselbeins, Acroosteolysis, Haaraufall und Insulinresistenz	[65, 2]
Restiktive Dermopathy	De novo Mutation in LMNA oder rezzesive null in ZMPSTE24	Intrauterine Wachstumsverzögerung, gespannte und feste Hauterosionen. Mikrostomia, Unterentwicklung der Lunge, früh tödlich	[59, 62, 63]
Allg. Lipoatrophy/ Lipodystophie	Autosomal dominant	Variabler Phänotyp, ähnlich mit anderen Laminopathien mit allg. Lipodystrophy oder Lipoatrophy, u.a. Diabetes, Hypertriglyceridemia und Anzeichen von Progerie	[18, 26]

Bei den Neurofilamenten finden sich ebenfalls eine Reihe von Erkrankungen. Abnormale Akkumulation bzw. Fehlorganisation der Filamente sind Kennzeichen vieler Erkrankungen an Motorneuronen. Ein Beispiel dafür ist die sporadische Amyotrophe Lateralsklerose (ALS).
Treten Mutationen am IF-Protein Desmin auf spricht man von einer Desmin-Myophathie. Diese zeichnet sich durch Muskel- bzw. Kardiomyopathien aus. Desmin-IFs kommen hauptsächlich im Skelett- und Herzmuskel vor, Krankheiten sind daher auf das Muskelsystem beschränkt [27].
Das in dieser Arbeit verwendete IF-Protein Vimentin ist zusammen mit GFAP der Assembly-Gruppe II zuzuordnen. Besonders auffallend an diesen beiden Proteinen war, dass man zu Beginn keine gravierenden Störungen bei “Knock-Out” Mäusen von Vimentin und GFAP beobachten werden konnte

[23]. Erst ein gleichzeitiger "Knock-Out" förderte Defekte bei der Regeneration von Astrozyten zu Tage [71]. Aufgrund dieser Tatsache fand man später heraus, dass ein Komplettausfall dieser IFs weniger schwerwiegend ist als das Auftreten bestimmter Mutationen. So konnten bei Patienten, die an der Alexander-Krankheit leiden, dominant-negative Mutationen am Gen für das GFAP-Protein nachgewiesen werden [11].
Neueste Ergebnisse haben jetzt auch die Funktion von Vimentin in der Augenlinse untersucht [57]. Dies wurde schon früher vermutet [17]. Da blinde Labormäuse aber keinen entscheidenden Nachteil in der Käfighaltung haben, wurde die Rolle von Vimentin in den Zellen der Augenlinse erst verhältnismäßig spät entdeckt.
Allen IF-Erkrankungen ist gemein, dass sie noch nicht bis ins letzte Detail verstanden worden sind. Warum sie Fehlbildungen während der Embryonalentwicklung verursachen oder ein vorzeitiges Altern auslösen können ist Gegenstand aktueller Forschung.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

IF-Proteine bilden ein dynamisches intrazelluläres Netzwerk aus. Über quantitative Aspekte dieser Dynamik und die Reaktionskinetik der Filamentbildung ist verhältnismäßig wenig bekannt. Eine quantitative Beschreibung des Filamentwachstums fehlt gänzlich. Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, diese Beschreibung zu liefern sowie Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen zu ermitteln. Dazu soll das Wachstum des IF-Proteins Vimentin *in vitro* untersucht und quantitativ ausgewertet werden. Auf Basis der bestehenden qualitativen Beschreibung des Filamentwachstums [41] soll eine Reaktionskinetik für dieses Wachstum entwickelt und mit den experimentellen Ergebnissen verglichen werden. Im ersten Ansatz soll das Wachstum von Vimentin über einen Zeitraum von mehreren Minuten im Elektronen- und Rasterkraftmikroskop (EM und SFM) zeitabhängig beobachtet und anschließend die Konturlängen der Filamente auf den gewonnenen Bilder quantitativ ausgewertet werden. Die beiden Mikroskopietechniken sollen dabei miteinander verglichen werden. Da die Filamente im Rasterkraftmikroskop direkt im verwendeten Puffer visualisiert werden, könnte an dieser Stelle ein unterschiedliches Ergebnis zwischen den beiden Techniken erzielt werden. Unterschiede könnten auch durch die, im EM und SFM, verschiedenen Oberflächen verursacht werden, an welche die Filamenten adsorbieren müssen. Es muss daher geklärt werden, wie sich verschiedene Adsorptionszeiten auf die gemessenen Längenverteilung der Filamente auswirken.
Da die Probenvorbereitung für die Mikroskope von Hand erfolgt, kann das Wachstum nur im Sekunden-Maßstab gestoppt werden. Daher kann nur das Längenwachstum über einen längeren Zeitraum mit dieser Methode charakterisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll aber auch die laterale Wachstumsphase der Vimentin-Tetramere hin zum ULF untersucht werden. Um diese schnelle Kinetik des IF-Wachstums zu erfassen, wird die "Stopped-Flow"-Methode eingesetzt. Hier kann die Wachstumreaktion mit einer zeitlichen Auflösung im Millisekundenbereich verfolgt werden. Die Detektion soll mittels Laserlichstreuung erfolgen.
Mit Hilfe dieser Daten soll dann ein kinetische Modell entwickelt und an die gemessenen Daten angepasst werden. Mit Hilfe dieses Modells soll versucht werden den prinzipiellen Reaktionsverlauf des Vimentinwachstums zu erklären. Durch die Anpassung des plausibelsten Modells können dann die Geschwindigkeitskonstanten des IF-Wachstums angegeben werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

Das objektive Universum ist absolut unwirklich

2.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität (p.a.) von den folgenden Firmen bezogen:

- Serva (Heidelberg)
- Roth (Karlsruhe)
- Quiagen (Hilden)
- Pharmacia (Freiburg i. Br.)
- Roche (Mannheim)
- Fluka (St. Gallen, Schweiz / Sigma-Aldrich)

2.1.1 Verbrauchsmaterial, biochemische Produkte und Laborgeräte

Bakterien

- Wirt: E. *coli* StammTG-1
- Genotyp: e14-(mcrA), D (mcrCB-hsdSMR-mrr)171, sbcC, recB, recJ, u- mucC:Tn5(kan1), uvrC:supE44, lac, gyrA96, relA1, endA1, [FproAB, lacl9ZDM15, Tn10(tet1)]
- Vektor: Plasmid pDS-5 System [14].

Bakterienaufzucht und Proteinaufreinigung

- **LB-Medium**
  86 mM $NaCl$:
  10 mM $MgSO_4$
  1 % Bactotrypton (w/v)
  0.5 % Hefeextrakt (w/v pH: 7,2)
- **TB-Medium**:
  4 mM KH_2PO_4
  91 mM K_2HPO_4
  1.2 % Trypton (w/v)
  2.4 % Hefeextrakt (w/v)
  0.4 % Glycerin (v/v)
- **LB-Ampicillin-Medium**:
  200 mg/ml Penicillin G in LB-Medium
- **LB-Ampicillin-Agar**:
  1.5 % Agar (w/v) in LB-Ampicillin-Medium
- **Lysepuffer**:
  50 mM Tris, pH 8,0
  25 % Saccharose
- **Detergenzpuffer**:
  200 mM $NaCl$
  1% DOC (Natriumdesoxycholat)
  1% NP40
  20 mM Tris, pH 7,5
  2 mM EDTA
- **GII Waschpuffer**:
  10 mM Tris, pH 8,0
  0.5 % TritonX100
- **9.5 M Harnstoff (gepuffert)**:
  9.5 M Harnstoff
  10 mM Tris, pH 7,5
  5 mM EDTA
  +100 µl PMSF pro 10ml
  +100 µl 1M DTT
  RNAse A
  DNAse I
- Pefabloc SC Serinprotease-Inhibitor (Suicide-Inhibitor, Klasse Sulfonsäurefluoride)
- NP40
- DTT (1 M Stammlösung ansetzen)
- Protein Broad-Range Marker 7701 (New England Biolabs) von 2.3 bis 212 kDa

- BioRad Mikrotestsystem (Bradfordreagenz)
- Diethylaminoethyl-Sepharose (DEAE-Sepharose)
- Carboxymethyl-Sepharose (CM-Sepharose)
- Fast-Flow-Säulen (BioRad)
- **10 fach Säulenpuffer (Stammlösung)**:
  50 mM Tris
  l0 mM EDTA
  1 mM EGTA
- **Säulenpuffer**:
  60 ml l0 fach Säulenpuffer
  480 ml Harnstoff 10 M
  60 ml $H_20_{destilliert}$
  +600 µl 1M DTT (Endkonzentration 1mM)
- **Dialyseschlauch**:
  Servapor Dialysistubing (Firma Serva)
  regenerierte Cellulose
  Porengröße: 250 nm (12000 - 14000 Da)
  Durchmesser: 6 mm
  Kat. Nr.: 44139.01
- **Dialysepuffer**:
  2 mM Natriumphosphatpuffer 7.5 pH
  1 mM DTT
- **Harnstoffpuffer**:
  160 ml Harnstoff 10M
  40 ml Dialysepuffer
  160 µl 1 M DTT
- **Quarzküvetten**:
  Firma Hellman, Präzisions-Küvetten aus Quarzglas Suprasil
  Typ-Nr.:105.251-QS
  Schichtdicke: 3 mm
- Spektrometer: Firma Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000
- SEDNTERP: (www.jphilo.mailway.com) errechnet für Vimentin:
  e_{280} Vimentin wild typ: $0.464 * g * l * mol^{-1} * cm^{-1}$ (entspricht 1g/l)

Assemblierung der Filamente

- **Phosphatpuffer (P_i-Puffer)**:
  2 mM NaH_2PO_4
  2 mM Na_2HPO_4
  auf pH 7.5 eingestellt

- **2-fach Assembly-Puffer**:
  200 mM KCl
  2 mM P_i-Puffer pH 7,5
- **Assembly-Puffer**:
  100 mM KCl
  2 mM P_i-Puffer pH 7,5

Rasterkraftmikroskopie

- Glimmer (Muscovite Mica)
- Standard Mikroskopie Deckgläser
- Schott Displayglas D263T
- Stickstoff (g)
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30%
- Schwefelsäure (H_2SO_4) min 95%
- Caro´sche Säure (Piranha Solution) in folgender Mischung: H_2SO_{4konz} :H_2O_2 30% 3:1
- Anotop 10 Syringe Filters 0.02 µm/10 mm Firma Whatman
- 4 mm Syringe Filters 0.2 µm Firma Nalgene
- 2 ml Spritzen mit Schraubgewinde
- 1 ml Spritzen
- **NP-S Spitzen:**
  Standard Silizium Nitride (Firma Nano and More GmbH)
  Federkonstante: 0.01 bis 0.6 N/m
  Resonanzfrequenz: 5-50 kHz
  Spitzenradius: 20-40 nm
  Höhe der Spitze: 3 µm
  ½ Winkel des Spitzenkegel: 35°
  Reflektive Beschichtung: Gold
  Länge der Federbügel: 120 oder 200 µm
  Breite der Federbügelschenkel: 15 40 µm
  Dicke der Federbügel: 0.4-0.6 µm
  Form der Federbügel: V-Form
- **NC-H Spitzen:**
  monolithisches Silizium (Firma di/Veeco Metrology Group Inc.)
  Federkonstante 21-78 N/m
  Resonanzfrequenz 260-410 kHz
  Spitzenradius < 10 nm
  Höhe der Spitze 10 - 15 µm
  Reflektive Beschichtung Aluminium
  Länge der Federbügel 125 ± 0,5 µm

Breite des Federbügels 30 µm
Dicke der Federbügel 0.4-0.6 µm
Form der Federbügel Stab-Form

- **HDC-Spitzen**
  auf Standard Silizium Nitrit aufgedampft (Firma Nano and More GmbH)
  Federkonstante: 0.01 0.6 N/m
  Resonanzfrequenz: 5-50 kHz
  Spitzenradius: ~5 nm
  Höhe der Spitze: 300 ± 100 nm
  Reflektive Beschichtung: Gold
  Länge der Federbügel: 200 µm
  Breite der Federbügelschenkel: 30 µm
  Dicke der Federbügel: 0.4-0.6 µm
  Form der Federbügel: V-Form

Elektronenmikroskopie

- EM Grids: 300 square Mesh copper 3.05 mm, Agar Scientific
- Baltec SCD 005 sputter coater mit CEA 035 carbon evaporation supply
- Glutaraldehyd (Sigma)
- Uranylacetat (Sigma)
- Zeiss EM 900

Stopped-Flow Modul

- Stopped-Flow Modul, SFM-3, Biologic, Claix Frankreich
- Drei Edelstahlspritzen (1x5 ml, 2x20 ml)
- Verbindungschläuche aus Teflon
- Thermostat, Julabo F12
- Küvette (FC-15)
- Software, Biokine Version

2.2 Mikrobiologische Verfahren

2.2.1 Transformation der E. *coli* Zellen

Die transformationskompetenten Bakterienzellen wurden in der Arbeitsgruppe Herrmann am DKFZ nach dem Protokoll von Hanahan (1983) hergestellt und freundlicher Weise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Das Vimentin wurde mittels Überexpression in E. *coli* Zellen hergestellt. Dazu wurde ein 100 µl Aliquot des TG1 Stammes 10 Minuten auf Eis aufgetaut und mit einem µl (10 ng) Plasmid-DNA versetzt. Die Plasmid-DNA wurde mir ebenso von der Arbeitsgruppe Herrmann zur Verfügung gestellt. Nach Zugabe der Plasmid-DNA erfolgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis. Darauf folgte eine drei minütige Temperaturerhöhung auf 37° C, die eine Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterienzellen bewirkte. Danach wurde eine Minute auf Eis inkubiert und der Ansatz in 400 µl LB-Medium überführt. Es erfolgte eine Inkubation für eine Stunde auf 37° C. 200 µl der Zellen wurden dann auf einer Penicillin G Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.2.2 Aufzucht der E. *coli* Zellen im Flüssigmedium

Nach erfolgreicher Transformation wurde von der Agarplatte eine Kolonie gewählt. Von dieser Kolonie wurden Zellen in eine Flüssigkultur überführt und so eine große Zahl an Zellen gezüchtet, aus denen im Anschluss das überexprimierte Vimentin aufgereinigt werden konnte.

Vorkultur

In Reagenzgläser wurde jeweils 2 ml TB-Medium mit Carbencillin vorgelegt. Von der Agarplatte wurden vereinzelte Kolonien aufgenommen und in das TB-Medium überführt. Diese Vorkulturen wurden bei 37° C und 260 rpm für 7 Stunden auf einer Schüttelplatte inkubiert.

Großkultur

Eine der Vorkulturen wurde ausgewählt und in 400 ml TB-Medium mit Carbencillin (50 mg/ml) überführt. Die Großkultur wurde bei 37° C über Nacht auf einer Schüttelplatte mit 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag konnten der Kultur 30 ml für eine DNA-Präparation entnommen werden. Die restlichen Zellen wurden bei 5000 rpm zentrifugiert. Aus den 30 ml wurde die DNA isoliert (QUIAGEN) und sequenziert (Andreas Hunziker, DKFZ). Auf diese Weise wurde überprüft, ob unerwünschte Punktmutationen aufgetreten sind, die die Primästruktur des Vimentins verändern würden.

2.3 Proteinaufreinigung

In E. *coli*-Zellen liegt ein Großteil der rekombinant synthetisierten Fremdproteine in zytoplasmatischen Granula vor, den "Inclusion Bodies" [8]. Unter Verwendung des Protokolls von Nagai und Thogersen [61] können diese leicht aufgereinigt werden.

2.3.1 Durchführung

Alle Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die Puffer wurden vorgekühlt. Das Bakterienpellet aus der Großkultur (ca. 5 g Zellen) wurde in 8 ml Lysepuffer resuspendiert und in einem Dounce L homogenisiert. Zum Homogenisat wurden 2 ml Lysepuffer mit l0 mg/ml Lysozym zugegeben. Das Lysozym wurde immer frisch zugegeben. Es war darauf zu achten, dass der Lysozym enthaltende Puffer gut mit dem Homogenisat vermischt wurde, was durch das Dounce L erreicht werden kann. Das Gemisch wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden 100 µl l M

$MgC1_2$, 10 µl RNAse A, 10 µl DNAse I, 100 µl Pefabloc SC und 200 µl 10% NP 40 zugegeben und nach Mischen im Dounce L zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach zehn Minuten wurde erneut im Dounce L gemischt und ein weiteres Mal mit l0 µl DNAse I für 10 Minuten auf Eis verdaut. Dann wurden 20 ml Detergenzpuffer, 200 µl l M DTT sowie 300µl PefablocSC zugegeben. Mit Hilfe des Dounce L wurde ein letztes Mail gemischt und 20 Minuten in einem SS-34 Zentrifugenbecher bei 4°C und ca. 8000 rpm zentrifugiert. Danach wurden vier Waschschritte durchgeführt. Nach jedem Waschschritt wurde für 10 Minuten bei 4°C in dem SS-34 Zentrifugenbecher bei 8000 rpm zentrifugiert. Jedem Waschpuffer mussten frisch DTT (Endkonzentration von 1 mM DTT im Puffer) und 50 µl Pefabloc SC zugegeben werden!

1. *Waschschritt*: Das Pellet wurde aus dem Zentrifugenbecher in den Dounce L überführt und mit 20 ml GII Waschpuffer gut gemischt, bis das gesamte Pellet gelöst war. Das gelöste Pellet wurde zehn Minuten auf Eis inkubiert.

2. *Waschschritt*: Das Pellet wurde aus dem Zentrifugenbecher in den Dounce L überführt und mit 20 ml GII Waschpuffer, in dem l ,5 M KC1 gelöst war, gut gemischt, bis das komplette Pellet gelöst war. Das gelöste Pellet wurde zehn Minuten auf Eis inkubiert.

3. *Waschschritt*: Das Pellet wurde aus dem Zentrifugenbecher in den Dounce L überführt und mit 20 ml GII Waschpuffer gut gemischt, bis das komplette Pellet gelöst war. Das gelöste Pellet wurde zehn Minuten auf Eis inkubiert.

4. *Waschschritt*: Das Pellet wurde aus dem Zentrifugenbecher in den Dounce L überführt und mit 20 ml TE Puffer gut gemischt, bis das komplette Pellet gelöst war. Das gelöste Pellet wurde zehn Minuten auf Eis inkubiert.

Nach dem letzten Waschschritt wurde das Pellet in 9.5 M gepufferten Harnstoff aufgenommen und ca. eine Stunde bei 35.000 rpm bei 4°C in einem Ti-Rotor zentrifugiert. Nach dem Zentrifugenlauf wurde das Pellet verworfen; das Protein befand sich im Überstand. Der Überstand wurde mit l0 mM Methylammoniumchlorid versetzt und bei -20°C bis zur Aufreinigung über die Ionentauschersäulen aufbewahrt.

2.3.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Reinigung über die Ionenaustauscher erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde über eine DEAE-Sepharose-Säule (Anionentauscher) aufgereinigt. Im zweiten Schritt erfolgte eine Reinigung über eine CM-Sepharose-Säule (Kationentauscher).

Vorbereitungen

Puffer:

Der Säulenpuffer wurde mit *HCl* auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt und 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Sepharose:

Die DEAE-Sepharose wurde in eine Saugflasche abgefüllt (ca. 25 ml pro Säule). Die Saugflasche wurde an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Auf diese Weise wurde die Sepharose für 15 Minuten entgast. Zwischendurch wurde die Saugflasche leicht geschwenkt, damit sich die Sepharose nicht zu stark absetzte. Nach dem Entgasen konnte die Sepharose auf die Säule gegossen werden. um sich in der Säule abzusetzen. Dabei ist darauf zu achten, dass diese nicht trocken läuft.

Protein:

Das Protein wurde aufgetaut und mit Säulenpuffer auf 35.5 ml verdünnt. Von der Verdünnung wurde eine Probe für das spätere Proteingel abgenommen.

Gradient:

Das Protein wurde über einen Salzgradienten von der Säule eluiert. Es wurde ein Gradient von 0 bis 0.3 M KCl benutzt. Dazu wurden im Säulenpuffer 0.3 M KCl gelöst. Durch einen Gradientenmischer wurde der Salzgradient dann auf die Säule gegeben.

1. Schritt: Anionentauscher

Durchführung

Beladung der Säule :

Die Säule wurde mit 50 ml Säulenpuffer gefüllt, wobei ein Aufwirbeln der Sepharose vermieden werden sollte. Sobald die 50 ml Säulenpuffer abgelaufen waren, so dass noch eine ca. 2 cm hohe Schicht des Säulenpuffers über dem Sepharosebett stand, konnte mit dem Proteinauftrag begonnen werden. Vor dem Auftrag wurde eine Probe A (Auftrag) für eine spätere Überprüfung im Proteingel entnommen. Sobald die gesamten 35.5 ml der Proteinverdünnung aufgetragen waren, wurde das leere Gefäß mit 50ml Säulenpuffer gefüllt. Diese 50 ml wurden ebenso auf die Säule aufgetragen. Von der Probe, die durch die Säule läuft, wurden die ersten 20 ml in einem mit LV (Leervolumen) gekennzeichneten Gefäß aufgefangen. Die nächsten 30 ml wurden in einem mit DF (Durchfluss) gekennzeichneten Gefäß gesammelt. Der Rest wurde in einem mit WL (Waschlösung) gekennzeichneten Gefäß aufgefangen. Dies geschah zur späteren Überprüfung des Säulenmaterials und der Bindung des Proteins an die Sepharose. Nach dem Durchlauf der kompletten 50 ml Säulenpuffer wurde die BioRad-Säule oben und unten verschlossen.

Elution mittels Salzgradient:

An die Säule wurde ein Gradientenmischer und ein Fraktionssammler angeschlossen. Der Fraktionssammler wurde so eingestellt, dass pro Fraktion 60 Tropfen mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 Tropfen pro Sekunde gesammelt wurden. Um den Fortschritt der Elution zu beurteilen, wurde in Eppendorfgefäße (l.5 ml) 200 µl Bradfordreagenz (1:5 aus der Stammlösung verdünnt) vorgelegt. Von einer Fraktion wurden 5 µl in ein mit Bradfordreagenz vorbereitetes Eppendorfgefäß gegeben. Anhand der Blaufärbung kann dann leicht das Fortschreiten der Elution bestimmt werden. Es genügt, wenn man

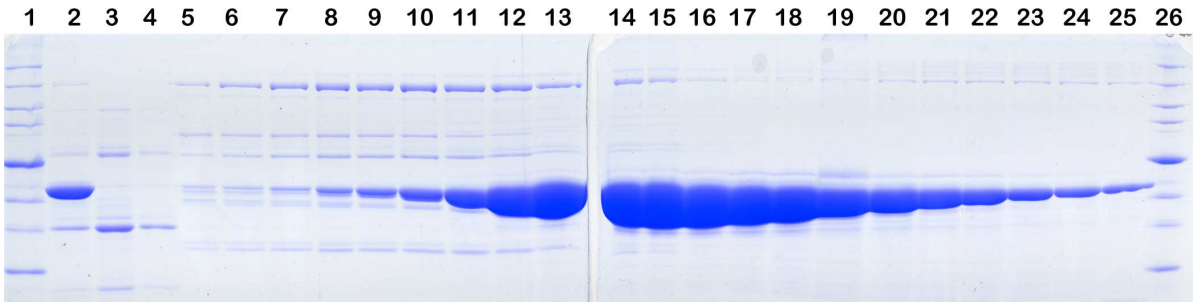

Abbildung 2.1: Die Abbildung zeigt exemplarisch das SDS-Gel nach der Aufreinigung über die CM-Sepharose Säule. Spur 1 und 26 sind jeweils Proteinmarker. In Spur 2, 3 und 4 ist jeweils A, DF und WL aufgetragen (s. Abschnitt 2.3.2). Spur 5 bis 25 enthält ausgewählte Fraktionen zwischen 26 und 53. Anhand des Gels kann sehr schön der Erfolg der Aufreinung verfolgt werden (Spur 5 bis 23). Mittels der Aufgetragenen Fraktionen wurde dann entschieden welche Fraktionen zum endgültigen Proteinpool zusammengefasst wurden.

am Anfang der Elution nur jede fünfte Fraktionen einem Test unterzieht. Sobald die Elution des Proteins beginnt, kann man entscheiden, ob jede oder jede zweite Fraktion mittels Bradford überprüft werden soll. Es ist sinnvoll, jeweils den Anfang und das Ende der Elution, wenn das Protein von der Sepharose gelöst wurde, genau zu betrachten.
Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Pro Säule geschieht dies in zwei Gelen mit jeweils 13 Spuren. Der Probenauftrag geschah nach folgendem Schema:

Tabelle 2.1: Prinzipieller Gelbeladeplan

Spur	**1**	**2**	**3**	**4**	**5-25**	**26**
Probe	Marker	A	DF	WL	Fraktionen	Marker

2. Schritt: Kationentauscher

Danach erfolgt der zweite Schritt: Die Reinigung über eine Kationentauschersäule mit CM-Sepharose. Die Reinigung über die CM-Sepharose wurde analog zu der oben beschriebenen Reinigung mit der DEAE-Sepharose-Säule durchgeführt. Alle Parameter blieben gleich, nur die DEAE-Sepharose wurde durch CM-Sepharose ersetzt. Am Ende der Elution wurden die Fraktionen wieder mittels SDS-PAGE nach dem Schema in Tabelle 2.1 überprüft. Mit Hilfe des Gels wurden die Fraktionen für den endgültigen Proteinpool ausgewählt und zusammengeführt. Das gepoolte Vimentin wurde mit 10 mM Methylammoniumchlorid versetzt und bei -80°C gelagert.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe eines Standard Bradford-Protein-Assay ermittelt (M. Bradford 1976). Bei dieser Methode wird aus dem Protein und dem sauren Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 ein Komplex gebildet, der leicht photometrisch nachzuweisen ist. Bei der Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 475 nm nach 595 nm. Das BioRad-Mikrotestsystem wurde nach den Herstellerangaben benutzt. Um von der gemessenen Absorption einer Proteinlösung unbekannter Konzentration auf die Menge an Protein schließen zu können, wird als erster Schritt eine

Eichgerade anhand definierter Mengen einer standardisierten Rinderserumalbumin-Lösung hergestellt und gemessen. Von der Lösung mit der unbekannten Proteinkonzentration wurde dann bei 595 nm Wellenlänge im Photometer die Absorption bestimmt. Mit Hilfe der Absorptionswerte konnte dann aus der Eichgerade die Konzentration des Proteins bestimmt werden.

2.3.3 Dialyse

Das gereinigte Vimentin wurde in 8 M Harnstoff bei -80°C gelagert. Unter diesen Bedingungen liegt es als Monomer vor und ist über lange Zeiträume ohne nennenswerten Aktivitätsverlust haltbar. Eine Renaturierung aus dem 8 M Harnstoffpuffer ist über eine schrittweise Reduzierung der Harnstoffkonzentration in physiologischem Natriumphosphatpuffer möglich.
Die verschlossenen Dialyseschläuche (Firma Serva, Heidelberg) erlauben einen Austausch von Substanzen bis zu einer Größe von 14 kDa.

Vorbereitung der Dialyseschläuche

Vor der Dialyse mussten die Dialyseschläuche vorbehandelt werden. Dazu wurde der am Stück gelieferte Schlauch zerteilt. Die Stücke wurden in einer Lösung aus Natriumhydrogencarbonat (200 mM) und EDTA (5 mM) fünf Minuten lang gekocht. Danach wurde die Natriumhydrogencarbonat /EDTA-Lösung abgeschüttet und die Schläuche kurz mit destilliertem Wasser gespült. Nach dem Spülen wurden die Schläuche erneut fünf Minuten lang in einer frischen Natriumhydrogencarbonat /EDTA-Lösung gekocht und anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Die nicht benötigten Schlauchstücke wurden in 10 % Ethanol im Kühlschrank für spätere Dialysen gelagert.

Durchführung

Die Dialyse wurde immer in Plastikbechern durchgeführt, da aus Glasgefäßen Salze herausgelöst werden könne, die den pH-Wert beeinflußen. Der Dialyseschlauch wurde auf die benötigte Länge geschnitten und gut mit destilliertem Wasser gespült. Eine Seite des Schlauches wurde mit einer Klammer zugeklemmt und die benötigte Menge des aufgereinigten Proteins in den Schlauch pipettiert. Der Schlauch wurde dann vollständig mit Klammern verschlossen und im ersten Schritt in Harnstoffpuffer eingelegt.

1. *Schritt*: Dialyseschlauch 15-30 Minuten in 200 ml Harnstoffpuffer legen und leicht rühren lassen. (Harnstoffkonzentration 8 M)
2. *Schritt*: 100 ml abgießen und durch 100 ml Dialysepuffer ersetzen. 20 Minuten leicht rühren lassen. (Harnstoffkonzentration 4 M)
3. *Schritt*: 100 ml abgießen und durch 100 ml Dialysepuffer ersetzen. 20 Minuten leicht rühren lassen. (Harnstoffkonzentration 2 M)
4. *Schritt*: 100 ml abgießen und durch 100 ml Dialysepuffer ersetzen. 20 Minuten leicht rühren lassen. (Harnstoffkonzentration 1 M)

Der Dialyseschlauch wurde aus dem Becher genommen und in einen neuen Becher in 200 ml Dialysepuffer /1 mM DTT eingelegt. Vorher wurden die Klammern noch etwas abgetrocknet, um so wenig

wie möglich vom restlich Harnstoff mit in den neuen Becher zu bringen. Im neuen Becher wurde die Dialyse unter leichtem Rühren bei 4° C über Nacht fortgesetzt. Am nächsten Tag wurde der Dialyseschlauch bei Raumtemperatur eine Stunde in Dialysepuffer ohne DTT eingelegt, um das DTT zu entfernen. Dieser Schritt ist aber nur dann nötig, wenn man wie in diesem Fall kein DTT in der endgültigen Proteinlösung wünscht. Das dialysierte Protein wurde bei 4° C gelagert. In diesem Zustand ist es ungefähr eine Woche haltbar. Über diesen Zeitraum konnte man eine Abnahme der Aktivität beobachten. Für die Kinetikmessungen wurde allerdings nur frisch dialysiertes Vimentin verwendet. Nach der Dialyse war eine weitere Konzentrationsbestimmung nötig.

2.3.4 Proteinbestimmung im Spektrometer

Der Proteingehalt des dialysierten Vimentin wurde über ein Spektrum bestimmt. Man muss dazu den Extinktionskoeffizienten des Proteins kennen. Im Spektrometer wird dann ein Spektrum der Lösung mit verschiedenen Wellenlängen aufgenommen. In diesem Fall wurde von 220 bis 360 nm in 5 nm Schritten gemessen. Der Vorteil der Methode ist, dass man kein Protein verliert. Die eingesetzte Menge konnte ohne merkliche Qualitätseinbußen für Versuche im Rasterkraft- und Elektronenmikroskop wieder verwendt werden.
Nach dem Beer-Lambertschen Gesetz errechnet sich die Konzentration folgendermaßen:

$$c = A_{280}/d * e_{280} \tag{2.1}$$

- c: Konzentration
- d: Schichtdicke der Küvette
- A_{280}: Absorption der Lösung bei 280 nm
- e_{280}: Extinktionskoeffizient bei 280 nm

2.3.5 Polymerisierung zu Filamenten

In vitro kann die Filamentbildung durch eine Erhöhung der Ionenstärke auf 100 mM KCl ausgelöst werden. Dazu wurde das über Nacht dialysierte Vimentin auf eine Konzentration von 0.4 mg/ml verdünnt. Die Filamente konnten bei 37° C und einer Konzentration von 0.2 mg/ml in 100 mM KCl und 2 mM P_i, pH 7.5, je nach Experiment, bis zu einer Stunde lang wachsen. Dazu wurde die benötigte Menge an dialysiertem Protein (0.4 mg/ml) mit der gleichen Menge des 2fach Assembly-Puffers (200 mM KCl, 2 mM P_i, pH 7.5) verdünnt. Nach Ablauf der jeweiligen Zeit wurde aus dem Ansatz ein Teil entnommen und für das EM (s. Abschnitt 2.5.3) oder das SFM (s. Abschnitt 2.4.5) vorbereitet.

2.4 Rasterkraftmikroskopie

2.4.1 Technische Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie und Messprinzip

Mit dem Rasterkraftmikroskop wird durch mechanisches Abtasten das topographische Bild einer Oberfläche erstellt. Die untersuchten Moleküle sind auf dieser Oberfläche gebunden. Eine sehr spitze Nadel, die an einem Federbügel befestigt ist, wird Zeile für Zeile über den gewählten Bereich

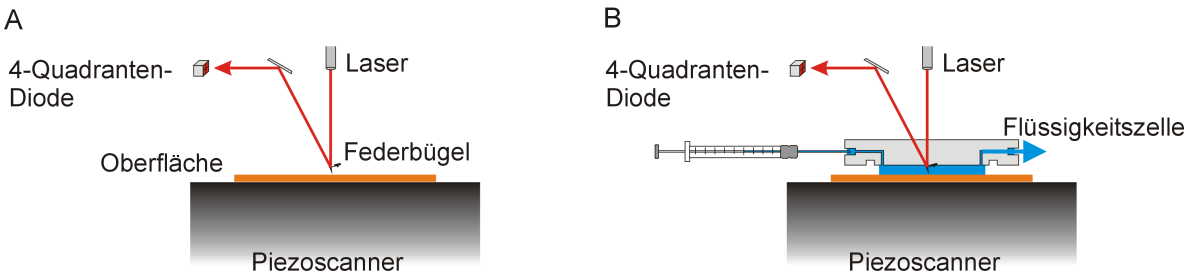

Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines AFM-Aufbaues. **A,** zeigt einen typischen Aufbau in Luft. Die Halterung des Federbügels ist der Einfachheit halber nicht gezeigt. Beim AFM des Typs MultiMode^{TM}wird die Probe mit Hilfe eines Piezo-Scanners unter der Nadel bewegt. **B,** zeigt einen typischen Aufbau für Messungen in Flüssigkeit. Der Federbügel ist hier innerhalb einer transparenten Zelle montiert. Über zwei Zuleitungen in dieser Zelle kann die Flüssigkeit auch während des Experiments ausgetauscht bzw. erneuert werden.

geführt: scannen. Die Positionsdaten werden durch die Bewegungen des Scanners in X-, Y- und Z-Richtung aufgenommen und das Bild mit Hilfe dieser Daten rekonstruiert. Die Höheninformationen werden durch die Verbiegung des Federbügels und die darauf folgenden Ausgleichsbewegungen des Scanners rekonstruiert. Auf den Federbügel wird ein Laserstrahl fokussiert. Dieser Laserstrahl wird von dem Federbügel auf eine 4-Quadrantenphoto-diode reflektiert. Dadurch ist eine Bestimmung der Verbiegung des Federbügels möglich. Die genaue Positionierung des Scanners im Mikro- und Nanometerbereich wird über Piezoelemente realisiert. Diese Elemente haben die Eigenschaft, sich beim Anlegen einer Spannung zu verformen. Mit Hilfe definierter Spannungen kann so eine sehr genaue Positionierung des Scanners erreicht werden. Das Prinzip der Rasterkraftmikroskopie (auch Scanning Force Microscopy SFM oder Atomic Force Microscopy AFM) kann auf verschiedenste Weise variiert werden. In der Biologie werden hauptsächlich zwei Methoden angewendet: Der so genannte "Contact Mode" und der "Tapping Mode". Beim "Contact Mode" wird die Nadel direkt mit der Oberfläche in Berührung gebracht und auf dieser entlang geführt. Fährt die Nadel über ein Objekt auf der Oberfläche, verbiegt sich der Federbügel. Diese Verbiegung wird detektiert. Der Piezoscanner wird über einen elektronischen Regelkreis in Z-Richtung bewegt, damit die Verbiegung der Nadel wieder aufgehoben wird. Diese Bewegung in Z-Richtung wird als Höheninformation gespeichert. Der Nachteil bei dieser Methode ist, dass biologische Proben oft stark in Mitleidenschaft gezogen werden, da diese gut verformbar sind. Im ungünstigen Fall kann es auch vorkommen, dass die Nadel die Probe verschiebt und so eine sinnvolle Bildgebung nicht mehr möglich ist.
Im "Tapping Mode" wird der Federbügel durch einen Piezokristall in Schwingung versetzt. Trifft die Nadel dann auf die Oberfläche, wird die Schwingung des Federbügels gedämpft. Die Höheninformation wird in diesem Fall nicht über eine Verbiegung des Federbügels gemessen, sondern über eine Änderung in der Amplitude des schwingenden Federbügels. Der Scanner hält einen eingestellten Wert für die Schwingung der Nadel über einen elektronischen Regelkreis konstant. Die Ausgleichsbewegung des Scanners wird dann als Höheninformation aufgenommen.
Die Kräfte, die beim Annähern an die Oberfläche zu einer Dämpfung der Nadelschwingung führen, sind elektrostatische Wechselwirkungen, Van-der-Waals- und Kapillarkräfte zwischen Spitze und Flüssigkeitsfilm, der die getrocknete Probe umgibt. Beim Mikroskopieren in Flüssigkeit fallen die Kapillarkräfte weg, wodurch die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe weiter reduziert werden. Gegenüber dem "Contact Mode" wird durch den "Tapping-Mode" eine stark verringerte Interaktion mit der Oberfläche erreicht. Auf diese Weise wird es möglich, auch weiche biologische Proben ohne starke Verformungen im Rasterkraftmikroskop zu untersuchen. Beide oben erwähnten Methoden

kann man sowohl in Luft als auch in Flüssigkeit durchführen.
Neben diesen beiden Methoden gibt es noch zahllose weitere Varianten, die eine Bildgebung über z.B. den Tunnelstrom (Scanning Tunneling Microscope, STM), magnetische Ablenkung der Spitze oder laterale Verbiegung des Federbügels realisieren. Diese Varianten kommen aber eher in der Materialwissenschaft vor.
Neben den bildgebenden Verfahren kann mit dem AFM auch eine Kraftmessung durchgeführt werden. Hierbei wird die Kraft gemessen die benötigt wird, um Zellen von einer Oberfläche zu lösen oder Proteine aus der Zellmembran herauszuziehen.

2.4.2 Abbildung von Objekten

Die mit dem Rasterkraftmikroskop erreichbare Auflösung hängt im Regelfall von der Geometrie der benutzten Spitze ab. Der Endradius der Spitze bestimmt die erreichbare Auflösung. Auf Bildern, die mit dem Rasterkraftmikroskop aufgenommen wurden, beobachtet man außerdem eine Verbreiterung der betrachteten Probe. Dieser Effekt beruht auf der kegelförmigen Geometrie der Spitze (Abb. 2.3). Für die laterale Auflösung gilt, dass sich die betrachtete Probe um annähernd einen Spitzendurchmesser verbreitert. Je nach dem, wie flexibel die Probe ist, kann sich dieser Wert aber auch verschieben. Soll die Breite einer Probe gemessen werden, gibt man diese bei halber Höhe der Struktur an, um Verbreiterungseffekte zu umgehen. Diese Methode bezeichnet man als "Full Width at Half Maximum" (volle Breite bei halber Höhe). Durch den Einsatz verschiedener Spitzen können Auflösungen von 5-10 nm und besser erreicht werden.

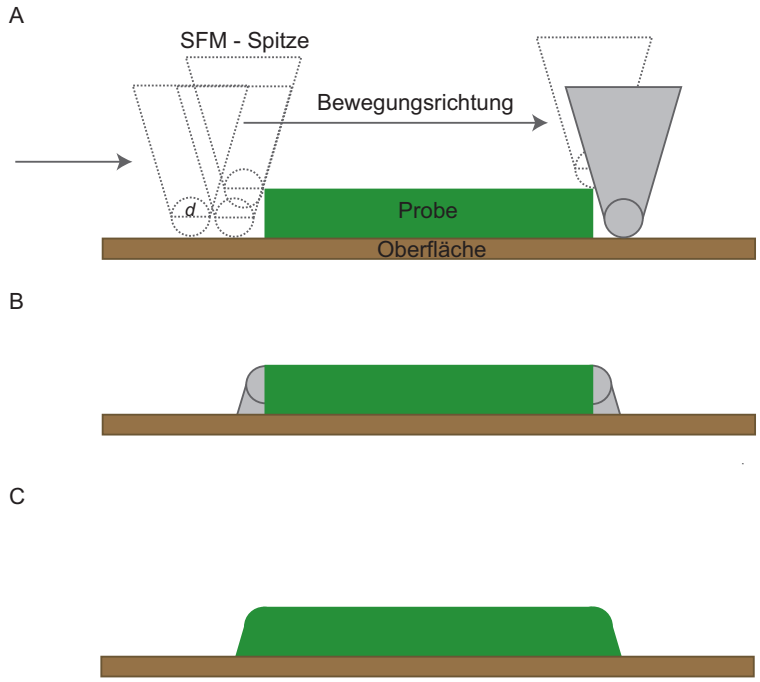

Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Einflusses einer SFM-Spitze auf die Abmessungen der betrachteten Probe. **A**. Die Spitze wird in der angezeigten Richtung über die Probe bewegt. Aufgrund der Spitzengeometrie, kann die wahre Form der Probe nicht vollständig abgefahren werden. **B**. Die Probe wird aufgrund des dargestellten Mechanismus um jeweils einen halben Spitzenradius verbreitert. **C**. zeigt schematisch das Endergebnis so wie es der Nutzer des Mikroskops zu sehen bekommt.

2.4.3 Verwendete Oberflächen in der Rasterkraftmikroskopie

Glimmer

Der in dieser Arbeit benutzte Glimmer war vom Typ Moskowiter (engl. muscovite mica) und von gelblicher Farbe. Glimmer gehört zu den Silikaten und dort in die Unterklasse Phyllosilikate. Moskowiter Glimmer hat die chemische Formel $K_2Al_4Si_6Al_2O_2O(OH,F)_4$, Kalium-Aluminium-Silikat Hydroxifluorid. Glimmer ist ein hartes, aus krystallinen Schichten bestehendes Material. Das Besondere an Glimmer ist die leichte Spaltbarkeit entlang der einzelnen Schichten. Man erhält dadurch eine extrem glatte Oberfläche (im atomaren Maßstab). Diese weist ein regelmäßiges Atomgitter auf und eignet sich dadurch hervorragend für Rasterkraftexperimente. Im Moskowiter Glimmer bestehen die einzelnen Kristallschichten aus Aluminiumsilikat, die durch Kaliumschichten zusammengehalten werden. Diese Bindung ist nicht sehr stark. Das Spalten des Glimmers geschieht entlang dieser Kaliumschichten. Das Kaliumion sitzt in einem großen Zwischenraum von 12 Sauerstoffatomen, sechs von der darüber und sechs von der darunter liegenden Schicht. Die ionische Bindung zwischen K- und O-Atomen ist schwach und kann leicht aufgebrochen werden.
Die Phyllosilikate haben eine charakteristische hexagonale Symmetrie und Erscheinung. Auf Bildern ähnelt die Struktur einem Ring mit einem Loch in der Mitte. Glimmer kann daher auch sehr gut zum Kalibrieren des Piezoscanners genutzt werden.

Glas

Glas wurde eingesetzt, um den Einfluss verschiedener Oberflächen auf die Filamente zu untersuchen. Zwei verschiedene Glastypen kamen hierbei zum Einsatz:

1. Standard Mikroskopie Deckgläser mit einer Dicke von 0.175 mm.
2. Schott Displayglas D263T aus Borsilikat mit folgenden Merkmalen:
   Geringer Alkalianteil
   Widerstandsfähig gegen chemische Angriffe
   Hohe Lichttransmission
   Leicht schneidbar
   Gute Planität
   Feuerpolierte Oberflächen

Die Gläser wurden mit Säure vorbehandelt. Dadurch wurde eine sehr saubere und vor allem hydrophile Oberfläche hergestellt. Eine hydrophile Oberfläche war für die Messungen in wässrigen Puffern von Vorteil, da die gesamte Oberfläche leicht benetzt werden konnte.

2.4.4 Rasterkraftmikroskopie in Flüssigkeit

Glimmer - Oberfläche freilegen

Der Glimmer wurde auf eine magnetische Scheibe geklebt und auf die gleiche Größe wie diese zugeschnitten. Das magnetische Scheibchen diente dazu, die Probe auf dem Piezoscanner des Rasterkraftgerätes festzuhalten, der einen magnetischen Kern enthält. Kurz vor Gebrauch wurde der Glimmer

gespalten, indem ein Stück Tesafilm auf diesen geklebt und schnell abgezogen wurde. Dadurch wurde eine frische glatte Oberfläche zur Benutzung freigelegt. Diese ist sehr glatt und muß sofort benutzt werden. Die Lösungen mit den Filamenten wurden direkt auf den frischen Glimmer gegeben und die Flüssigkeitszelle darauf aufgebaut.

Glas - Säurebehandlung

Zur Behandlung der Glasoberflächen wurde eine Mischung aus 3 Teilen $H_2SO_{4\,konz}$ (>94 %) und 1 Teil H_2O_2 (30%) frisch angesetzt. Diese Mischung ist auch unter dem Namen caro´sche Säure oder "Piranha Solution" bekannt und wird häufig zur Reinigung von Gläsern eingesetzt. Beim Ansetzen erhitzt sich die caro´sche Säure bis zu ihrem Siedepunkt. In der frischen und heißen Säure wurden dann die vorgeschnittenen Glasplättchen für mindestens 1 Stunde inkubiert. Nach Ablauf einer Stunde wurden die Glasplättchen aus dem Säurebad genommen und gut mit destilliertem Wasser gespült. Danach wurden sie für 15 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Diese Behandlung ist nötig, da sonst beim Trocknen der Gläser Rückstände aus dem Wasser auf dem Glas zurück bleiben. Nach der Behandlung im Ultraschallbad wurden die Glasplättchen mit Stickstoff trockengeblasen und auf eine magnetische Scheibe aufgeklebt, mit der sie dann auf den Piezoscanner des Rasterkraftmikroskops montiert werden konnten.
Vorsicht: Caro´sche Säure ist eine sehr reaktive Mischung. Bei Verwendung dieser ist darauf zu achten, dass immer nur die benötigte Menge angesetzt wird. Beim Ansetzen sollte zuerst H_2O_2 und dann H_2SO_4 in das Gefäß gefüllt werden. Bei Vermischung mit organischen Lösungsmitteln (z.B. Aceton) entstehen explosive Gemische! Man sollte also sicherstellen, dass ein Kontakt mit organischen Lösungsmitteln ausgeschlossen werden kann. Zudem sollten hitzebeständige Gefäße benutzt werden.

2.4.5 Probenvorbereitung

Alle verwendeten Puffer wurden mit Anotop 10 Filtern filtriert. Das frisch dialysierte Vimentin wurde vor dem Assembly einmal durch einen Nalgene Filter mit einer Porengröße von 0.2 mm filtriert.
Nach dem im Abschnitt 2.3.5 beschriebenen Protokoll wurde Vimentin *in vitro* zu Filamenten polymerisiert. Nach der für den jeweiligen Versuch festgelegten Zeit, wurde das Assembly gestoppt, in dem ein Teil mit Assembly-Puffer (100 mM KCl, 2 mM P_i, pH 7.5) verdünnt wurde. Es wurden Verdünnungsstufen von 1:80 benutzt. Aus der verdünnten Probe wurden sofort 30 µl auf die verwendete Oberfläche (Glas oder Glimmer) übertragen und für eine Zeit (bis zu 5 Minuten, siehe auch Abschnitt 3.1.3) inkubieren gelassen. Danach wurde die Oberfläche zweimal mit 100 µl Assembly-Puffer gespült, so dass noch 30 µl Puffer auf der Oberfläche verbleiben. Danach wurde die Flüssigkeitszelle des SFM mit 60 µl Assembly-Puffer gefüllt und aufgebaut. Die Bilder für die spätere Auswertung der Konturlänge wurden immer mit 8 x 8 µm Scangröße bei 512 mal 512 Pixeln aufgenommen. Daraus ergibt sich eine Größe von ~15 nm pro Pixel .

2.5 Elektronenmikroskopie

Proteinstrukturen können mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) im molekularen Detail sichtbar gemacht werden. Die Auflösungsgrenze des TEM liegt bei etwa 0.38 nm. Dies bedeutet eine gegenüber dem Lichtmikroskop um etwa den Faktor 103 höhere Auflösung. Das verwendete TEM von Zeiss mit der Typenbezeichnung EM 900 hat eine beheizte Wolframelektrode mit einem

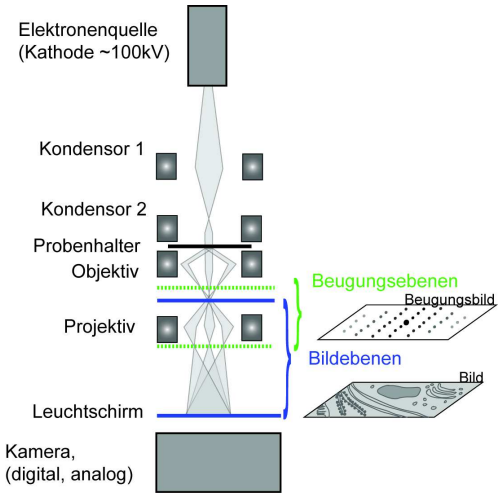

Abbildung 2.4: Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines Elektronenmikroskops sowie den Strahlengang. Die Beschreibung findet sich im Text (modifiziert nach einer Abbildung in Wikipedia http://de.wikipedia.org/wiki/Elektronenmikroskop).

elektrischen Potential zwischen 50 und 80 kV als Strahlenquelle. Diese ist am oberen Ende einer ca. 2 m hohen Mikroskopsäule angebracht, in der Hochvakuum herrscht. Am unteren Ende befindet sich die Anode, mit deren Hilfe ein Potentialgefälle erzeugt wird, dass die Elektronen im elektrischen Feld beschleunigt.

2.5.1 Technische Grundlagen der Elektronenmikroskopie

Die Elektronen im TEM besitzen die Eigenschaften einer Welle mit l = 0.005 nm. Fokusiert wird der Elektronenstrahl durch ein System von Polschuhmagneten, die auch als Kondensor- oder elektromagnetische Linsen bezeichnet werden. Die Proteinproben werden auf einem Kupfernetz (Grid) fixiert. Das Kupfernetz kann dann in die Präparathalterung eingebaut werden. Diese Halterung wird durch eine Luftschleuse in das Hochvakuum der Mikroskopsäule eingeschleust und dem Elektronenstrahl ausgesetzt.
Die an der Wolframelektrode erzeugten Elektronen durchstrahlen das Objekt, das entsprechend dünn sein muss. Je nach Ordnungszahl der Atome, aus denen das Objekt besteht, der Höhe der Beschleunigungsspannung und der gewünschten Auflösung kann die sinnvolle Objektdicke von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern reichen. Typische Beschleunigungsspannungen für die Untersuchung biologischer Materialien sind 80 bis 120 kV. Die benutzbaren Beschleunigungsspannungen sind ein wesentliches Leistungsmerkmal eines TEM. Je höher die Ordnungszahl und je niedriger die Beschleunigungsspannung sind, desto dünner muss das Objekt sein. Dünne Objekte sind ebenso für hochauflösende Abbildungen erforderlich.
Die Elektronen treffen zuerst auf das Kondensor-Linsensystem und werden von diesem so abgelenkt, dass sie den gewählten Objektausschnitt gleichmäßig beleuchten. Alle Strahlen fallen an diesem Punkt in etwa parallel auf das Objekt. Durch die Beschaffenheit der Probe werden die auftreffenden Elektronen gestreut. Dabei ändert sich ihre Bewegungsrichtung, wodurch sie teilweise ihre Bewegungsenergie verlieren (inelastische Streuung). Elektronen, die das Objekt unter dem selben Winkel verlassen, werden in der hinteren Brennebene der Objektivlinse in einem Punkt fokussiert.
Man kann nun in dieser Ebene mit einer Blende (Objektivblende beziehungsweise Kontrastblende) nur die Elektronen passieren lassen, die nicht gestreut wurden. Da Atome mit höherer Ordnungszahl, sowie dickere Objektbereiche stärker streuen, wird der entstehende Kontrast Massendickenkontrast

genannt.
Am unteren Ende der Mikroskopsäule werden die Elektronen auf einem fluoreszierenden Schirm durch die Projektivlinse gebündelt und zur Bildgebung genutzt. Das Bild entsteht durch die unterschiedliche Absorption und Beugung der Elektronen in der Probe. Ein Sichtfenster und Binokular ermöglichen die Beurteilung der Probe. Mit Hilfe eines Fotoapparates kann jede Probe dokumentiert werden.

2.5.2 Herstellung der Kohleoberfläche auf den EM-Grids

Zur Herstellung der Kohlefilme wurde ein "Bal Tec SCD 005 sputter" mit einem "CEA 035 carbon evaporation supply" eingesetzt. Die Kohlefolien wurden zuerst auf ein Stück frisch gespaltenen Glimmer aufgedampft. Dazu wurde ein Kohlefaden in den Flansch des "CEA 035" eingespannt. Die Ablage mit dem Glimmer in der Unterdruckkammer wurde auf eine Höhe von 4 cm eingestellt und dann der Kopf des CEA 035 mit dem Kohlefaden auf die Unterdruckkammer gesetzt. Die Unterdruckkammer wird bis zu einem Druck von ca. $5 * 10^{-2}$ mbar evakuiert. Bei erreichen dieses Druckes wird die Unterdruckkammer sieben mal mit Stickstoffgas gespült. Danach kann der Druck weiter, auf $1 * 10^{-2}$ mbar reduziert werden.
Wird dieser Druck erreicht kann der Kohlefaden durch Anlegen einer Spannung blitzartig verdampft werden. Die freigewordene Kohle lagert sich in einer dünnen Schicht auf der frisch gespaltetenen Glimmeroberfläche ab.
Dieser Kohlefilm wird vom Glimmer in einem Wasserbad abschwimmen gelassen. Vorher legt man die Kupfernetze auf ein Whatman-Filterpapier in das Wasserbad. Durch Ablassen des Wassers kann dann die schwimmende Kohlefolie auf die Kupfernetze abgesenkt werden. Vor der Benutzung mussten die Kupfernetze einen Tag getrocknet werden.

2.5.3 Probenvorbereitung

Der Filamentbildungsprozess wurde durch eine Erhöhung der Ionenstärke auf 100 mM KCl ausgelöst. Um eine Bilderserie der Filamentbildung innerhalb der ersten Sekunden aufnehmen zu können, wurde zwischen 5 Sekunden und 20 Minuten auf 37° C inkubiert. Nach Anlauf der Zeit wurde das Filamentwachstums durch Zugabe von 0.2 % Glutaraldehyd in die Lösung gestoppt (Endkonzentration des Glutaraldehyd 0.1% v/v). Aus der Filamentlösung wurden dann 30 µl auf die Kohlefolie pipettiert.
Zur Vorbereitung der Kohlefolie-Grids wurde wie folgt vorgegangen: Kurz vor der Verwendung der Kohlefilme auf den Kupfernetzen wurden diese für zwei Minuten einer Glimmentladung (Glow discharge) im "Bal Tec SCD 005" (s.o) unterzogen. Dabei wurde analog zum Abschnitt 2.5.2 vorgegangen. Die Glimmentladung wurde 2 Minuten durchgeführt. Durch diese Behandlung wird die hydrophobe Kohleoberfläche besser benetzbar und die Proteine können besser haften. Danach wurden 30 µl des Probenansatzes auf das Kupfernetz pipettiert und für 2 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der zwei Minuten wurde 10 Sekunden mit gefiltertem destillierten Wasser gewaschen und danach für 15 Sekunden mit 2 % Uranylacetat gefärbt. Nach der Färbung wurde das Kupfernetz luftgetrocknet. Letzte Wasserreste wurden dann durch das Vakuum im Elektronenmikroskop beseitigt. Zwischen jedem Schritt wurde die überschüssige Flüssigkeit kurz mit einem Whatman Filterpapier abgesaugt.
Durch das Glutaraldehyd können die Intermediärfilamente bzw. dessen Vorstufen innerhalb des Moleküls über die zwei reaktionsfähigen Aldehydgruppen kovalent verknüpft werden. Danach ist es möglich, die Filamente mit Wasser zu waschen und zu trocknen, ohne dass sich die Struktur auflöst.

Da Proteine aus Atomen mit einer niedrigen Ordnungszahl bestehen und darum die Elektronen im TEM nicht stark genug streuen, um eine gute Bildgebung zu erreichen, benötigt man ein Kontrastmittel. Einen guten Kontrast erreicht man durch die Komplexierung der Präparate mit Salzen des Schwermetalls Uran. Uran mit seiner hohen Ordnungszahl beugt die Mehrzahl der auftreffenden Elektronen. Der Bildkontrast im TEM steigt mit zunehmender Ordnungszahl. Die Proteine erscheinen im TEM hell und ungefärbt, während die Ränder oder die Umgebung dunkel angefärbt sind (Negative Stain). Unterschiedliche Strukturen weisen unterschiedliche Kontrastabstufungen auf.

2.6 Analytische Ultrazentrifugation

In dieser Arbeit wurde die Proteinlösung mittels einer analytischen Ultrazentrifuge (AUZ) (Beckman Optima XL-A, Rotor An-60 Ti) untersucht. Mittels dieser Technik sollte der Sedimentationskoeffizient der Moleküle in der Lösung bestimmt werden. Sind Moleküle verschiedener Größe in der Lösung vorhanden, so zeigt sich das im Vorhandensein verschiedener Sedimentationskoeffizienten, die aus der Messung errechnet werden. Die Ergebnisse sollten dazu dienen die Uniformität der Probe hinsichtlich einer Molekülgröße zu überprüfen. Im Folgenden soll die Theorie der AUZ näher erläutert werden.

2.6.1 Theoretische Grundlagen der AUZ

Setzt man Moleküle unterschiedlicher Masse und Form einem Schwerkraftfeld aus, so bewegen sich diese in Richtung des Schwerefeldes unterschiedlich schnell. In einer Zentrifuge können durch hohe Umdrehungszahlen von bis zu 90.000 Umdrehungen pro Minute eine 700.000 fach höhere Schwerkraft als auf der Erdoberfläche erzeugt werden (700.000 g). Die durch die Zentrifuge erzeugte Zentrifugalkraft, die auf das Molekül wirkt, hängt von dessen Masse und der Winkelgeschwindigkeit des Rotors, sowie dem Abstand des Moleküls von der Rotorachse ab. Die Sedimentationsgeschwindigkeit des Moleküls in der Zentrifuge hängt zusätzlich von dessen Dichte im Verhältnis zur Dichte des Lösungsmittels ab.
Im Gegensatz zu einer herkömmlichen Laborzentrifuge enthält eine AUZ zusätzlich eine Optik. Diese erlaubt die Visualisierung des Sedimentationsprozesses. Dazu wird das Licht einer Xenon-Lampe mit Hilfe eines Monochromators auf eine bestimmte Wellenlänge eingestellt und durch die rotierenden Messzellen geschickt. Ein Photomultiplier auf der anderen Seite der Messzellen misst die Lichtintensität. Auf diese Weise kann die Änderung in der optischen Dichte an verschiedenen Stellen der Messzelle verfolgt werden. Die gemessene Absorption wird dann als Funktion des Abstandes zur Drechachse des Rotors aufgetragen. Prinzipiell kann man somit in der AUZ zwei verschiedene Messungen durchführen. Durch die Verwendung von sehr hohen Drehzahlen wird versucht der Diffusion der Moleküle entgegenzuwirken. In diesem so genannten Sedimentationsexperiment wird dann die Zeit gemessen mit der die Moleküle zum äußeren Rand der Messzelle wandern. Aus den Messdaten kann der Sedimentationkoeffizient berechnet werden, der für jedes Molekül charakteristisch ist. Dieses Experiment wurde zuerst vom schwedischen Chemiker Theodor Svedberg durchgeführt. Der Sedimentationskoeffizient trägt daher die Einheit Svedberg [S]. Verwendet man anstelle von hohen, niedrige Drehzahlen so kann man ein so genanntes Gleichgewichtsexperiment durchführen. Dabei wird solange zentrifugiert bis sich ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion der Moleküle einstellt. Aus dem gemessenen Konzentrationsprofil kann der Diffusions- und Sedimentationskoeffizient berechnet werden. Diese Informationen dienen der Bestimmung des Molekulargewichts. In dieser Arbeit wurde nur die Methode des Sedimentationsexperimentes eingesetzt. Im Folgenden

wird daher nur diese beschrieben.
Um für die Sedimentation eine Gleichung herzuleiten, verzichtet man zu Beginn erst einmal darauf, den Einfluss der Diffusion zu berücksichtigen. Es herrscht dann ein Kräftegleichgewicht zwischen der Zentrifugalkraft (F_z), dem Auftrieb und der Reibung (F_r).

$$F_z = (m - m_0)\omega^2 x = m(1 - \overline{v}\rho)\omega^2 x \tag{2.2}$$

$$F_r = f\frac{\partial x}{\partial t} \tag{2.3}$$

m, Masse des Moleküls

m_0, Masse des verdrängten Lösungsmittels

$\bar{v}$, Partialspezifisches Volumen des gelösten Moleküls

f, Reibungskraft (nach Stokes)

ρ, Dichte des Lösungsmittel

ω, Winkelgeschwindigkeit des Rotors

x, Abstand von der Rotordrechachse

Es gilt

$$\frac{dx}{dt} = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f}\omega^2 x = s\omega^2 x \tag{2.4}$$

Aufgund des Gleichgewichtes der Kräfte.
Während der Zentrifugation wandern alle Moleküle von der Rotorachse weg nach Außen. Durch diese Sedimentation bildet sich eine Zone reinen Lösungsmittels aus. Zwischen dem reinen Lösungmittel und dem Teil in dem noch gelöste Moleküle vorhanden sind bildet sich eine Grenzschicht aus. Für ein Molekül an dieser Grenzfläche bzw. für die Grenzflächenposition $\bar{x}$ gilt somit:

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = s\omega^2 x \Rightarrow \frac{dln(\bar{\bar{x}})}{dt} = s\omega^2 \tag{2.5}$$

s ist der so genannte Sedimentationskoeffizient mit der Dimension [Sekunde]. s wird in Svedberg angegeben; 1S = $^{-13}$ Sekunden.

In der AUZ kommen sektorförmige Messzellen zum Einsatz (s. Abbildung 2.5). Dadurch wird eine Sedimentation an die seitlichen Zellwände während der Zentrifugation vermieden. Die Moleküle können ungehindert im Schwerefeld der AUZ wandern. Während die Zentrifuge in Betrieb ist, wandern die Moleküle vom Meniskus zum Boden der Messzelle. Aus der Verschiebung der gemessenen Absorptionsdaten erhält man den s-Wert. Um die Konzentrationsänderung an jeder Position der Messzelle beschreiben zu können, benötigt man eine Differentialgleichung, die neben der Diffusion der Moleküle auch die Sektorgeometrie berücksichtigt.

Die Flußdichte durch eine Fläche F mit dem Fluss Φ in der Zeiteinheit Δt ist gegeben durch:

$$J = \frac{\Phi}{F\Delta t} \tag{2.6}$$

Um den Massenfluß in der Sektorzelle von innen nach Außen durch eine Fläche $F = \alpha x a$ (α in rad) zu beschreiben, muss man die Sedimentation sowie die Diffusion berücksichtigen. Die zeitliche Veränderung der Masse im betrachteten Volumenelement ΔV kann wie folgt beschrieben werden:

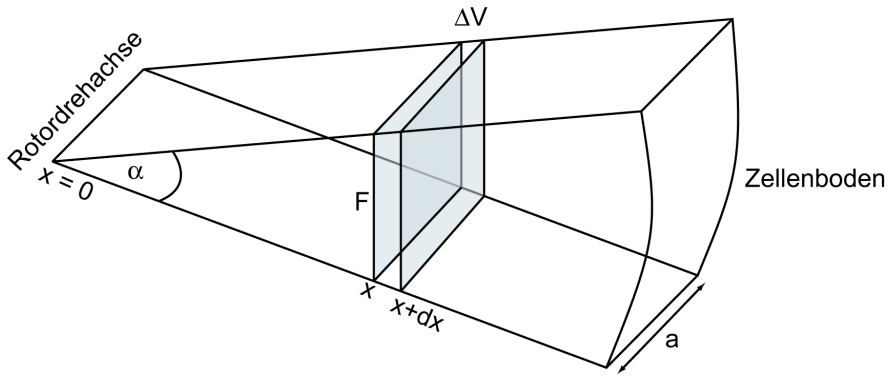

Abbildung 2.5: Schematische Darstellung einer sektorförmingen Messzelle in der AUZ.

$$\frac{\partial m_s}{\partial t} = \nu c\alpha(x+dx)a = s\omega^2(x+dx)c\alpha(x+dx)a \tag{2.7}$$

ν ist hier die Geschwindigkeit des Massenflusses, gegeben durch die Gl. 2.4. Die Veränderung der Masse im Volumenelement ΔV durch Diffusion in das Volumenelement wird mit folgender Gleichung beschrieben:

$$\frac{\partial m_D}{\partial t} = -D\frac{\partial c}{\partial x}\alpha x a \tag{2.8}$$

Betrachtet man die Massenflußdichte durch Sedimentation in einer bestimmten Entfernung (x) zur Drehachse, dann ist diese:

$$J_s = s\omega^2 xc \tag{2.9}$$

Wohingegen die Massenflußdichte aufgrund der Diffusion durch

$$J_D = -D\frac{\partial c}{\partial x} \tag{2.10}$$

beschrieben wird.

Die Konzentrationsänderung im Volumenelement ΔV mit der Zeit ergibt (unter Berücksichtigung von Gl. 2.9 und 2.10) folgende Gleichung:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c}{\partial t} &= \frac{1}{\Delta V}(F_x J_{x x+dx} J_{x+dx}) \\ &= \frac{1}{\alpha a x dx}(\alpha a x J_x - \alpha a(x+dx)J_{x+dx}) \\ &= \frac{\partial(Jx)}{x\partial x} \end{aligned} \tag{2.11}$$

Nun kann man Gl. 2.10 und 2.9 für J einsetzten und erhält die *Lamm-Gleichung*.

$$\frac{\partial}{\partial} = \frac{1}{x}\frac{\partial}{\partial x}\left[x\left(D\frac{\partial c}{\partial x} - s\omega^2 xc\right)\right] \tag{2.12}$$

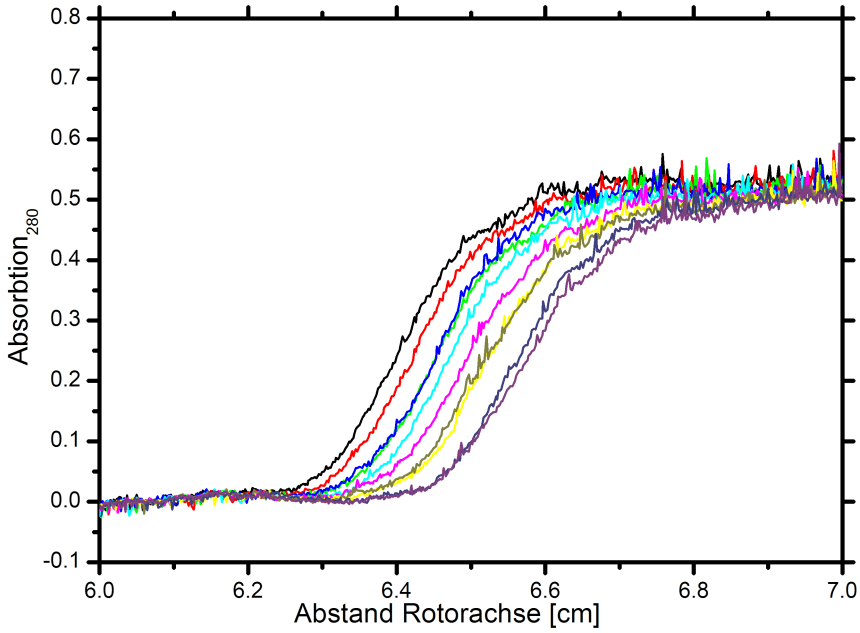

Abbildung 2.6: Die Abbildung zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Sedimentationsexperiments. Die verschiedenen Kurven zeigen aufeinander folgende Absorbtionsmessungen in der Küvette an. Man kann hierbei sehr schön sehen, wie die Banden immer weiter von der Rotordrehachse wegsedimentieren. Im Idealfall würden die Banden parallel zur Y-Achse verlaufen. Diese Form wird aber durch den Einfluss der Diffusion verhindert. Durch die Diffusion werden die Banden verbreitert und erhalten den hier gezeigten charakteristischen schiefen Verlauf.

Man kann die Lamm-Gleichung noch in folgende Form umschreiben.

$$\frac{\partial}{\partial} = D\left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - \frac{1}{x}\frac{\partial c}{\partial x}\right) s\omega^2 \left(x\frac{\partial c}{\partial x} + 2c\right) \tag{2.13}$$

Mit Hilfe der Lamm-Gleichung kann die zeitliche Konzentrationsänderung der sedimentierenden Molekülen unter Berücksichtigung das Abstandes zur Rotorachse und der Winkelgeschwindigkeit (x und ω) beschreiben werden.
Das Ergebnis eines Sedimentationsexperiments mit dem IF-Protein Vimentin ist in Abbildung 2.6 zur Veranschaulichung dargestellt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von aufeinander folgenden Messungen während des Zentrifugenlaufs. Jede Kurve repräsentiert eine Absorptionsmessung in der Messzelle gegen sauberen Puffer in einer Referenzzelle. Die Kurven zeigen alle einen charakteristischen Peak bei einem Abstand von ~5.9 cm zur Rotorachse (nicht gezeigt). Dies ist der Meniskus des Lösungsmittels. Durch das Ausbilden der Grenzfläche wird die Zelle in einen Bereich mit reinem Lösungsmittel (innen) und dem gelösten Protein (nach außen hin) unterteilt. An der Grenzfläche ändert sich die Absorption sprunghaft. Man erkennt eine fast senkrechte Bande. Da sich die Grenzfläche im Verlauf der Zentrifugation immer weiter von der Rotorachse entfernt, wandern auch die Banden der Messungen. Aus der Geschwindigkeit, mit der die Banden wandern, ergibt sich der Sedimentationskoeffizient (nach Gl. 2.4). Mit Hilfe der Lamm-Gleichung (Gl. 2.13) kann die Form eines Sedimentationsprofils vollständig beschrieben werden.

2.6.2 Ermitteln des Sedimentationskoeffizient mit dcdt+

Die Auswertung eines AUZ Experimentes kann mit Hilfe des Programms dcdt+ (John Philo, http://-www.jphilo.mailway.com/ sowie [73, 74]) durchgeführt werden. Bei dem klassischen Ansatz wird ein Sedimentationsgeschwindigkeitslauf durchgeführt und zu verschiedenen Zeiten die Konzentration der sedimentierenden Partikel als Funktion des Abstandes zur Drehachse gemessen. Man kann in den gemessenen Kurven eine Verbreiterung in der wandernden Bande beobachten (s. auch Abb. 2.6). Diese Verbreiterung entsteht durch die Diffusion der Teilchen entlang des Konzentrationsgradienten, der durch die Sedimentation hervorgerufen wird. Anstelle des Wendepunkts der Banden ermittelt das Programm dcdt+ die Verteilung der Sedimentationskoeffizienten *g(s*)* über die gesamte Zelle [85]. Dabei werden aufeinander folgende Absorbtionspektren $c_r$voneinander subtrahiert. Ist der zeitliche Abstand zwischen den Kurven sehr klein, so erhält man eine gute Näherung der Ableitung, eben dc/dt, für jede radiale Position r. Mit dieser Methode gilt für jedes r unter Berücksichtigung des Laufzeitintegrals s^* folgende Beziehung:

$$s* = \frac{1}{\omega^2 t} ln(\frac{r}{r_m}) \tag{2.14}$$

r_m bezeichnet die Position des Meniskus zur Drehachse. r_m kann immer deutlich an dem scharfen Absorptionspeak ermittelt werden. Mit Hilfe dieser Beziehung werden die Kurven (dc/dt vs. radialer Abstand) nach s^* überführt. In dieser Darstellungsform fallen die dc/dt-Kurven aufeinander. Zusätzlich muss noch der radiale Verdünnungseffekt in den sektorförmingen Zellen (s. Abb. 2.5) berücksichtigt werden.

$$c_p = c_0(\frac{r_m}{r_{bnd}})^2 \tag{2.15}$$

r_{bnd} gibt den Wendepunkt der Sedimentationsbande in einem monodispersen System an. Dadurch können die nun normierten Kurven übereinander gelegt und gemittelt werden. Durch dieses Vorgehen wird ein deutlich verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis erreicht. *g(s*)* nimmt nun die folgende Form an:

$$g(s*) = (\frac{\partial c}{\partial t})_{corr}(\frac{1}{c_0})(\frac{\omega^2 t^2}{ln(\frac{r_m}{r})})(\frac{r^2}{r_m})^2 \tag{2.16}$$

In einer idealen Lösung, die jeweils nur eine Spezies enthält, wird zur Anpassung an die *g(s*)*-Funktion nur eine Gaußkurve benötigt. Aus der errechneten Standardabweichung kann zusätzlich der Diffusionskoeffizient über die folgende Gleichung bestimmt werden [84]:

$$D = \frac{\sigma^2 r_m^2 \omega^2 (\omega^2 t)}{2} \tag{2.17}$$

Mit dem Sedimentationskoeffizient s und dem Tranlationsdiffusionskoeffizienten D kann man das Molekulargewicht M bestimmen [20]:

$$M = \frac{sRT}{D(1 - \bar{v}\rho)} \tag{2.18}$$

Dabei ist R die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur, $\bar{v}$ das partial spezifische Volumen und ρ ist die Dichte des Lösungsmittels.

Tabelle 2.2: Gezeigt ist der Beladeplan inklusive Verdünnung für das Sedimentationsexperiment.

c(mg/ml) Vwt #	AUZ-Zelle	c(mg/ml) für AUZ*	µl Vwt	µl Puffer	Füllvolumen [µl]
0.812	P1	0,25	123	277	400
0.812	P2	0,18	89	311	400
0.812	P3	0,12	59	341	400

Pro Messkammer wurde ein Volumen von 400 µl eingesetzt.
#, gibt die gemessene Proteinkonzentration direkt nach der Dialyse an.
*, zeigt die gewünschte Proteinkonzentration für die jeweilige Messzelle an.

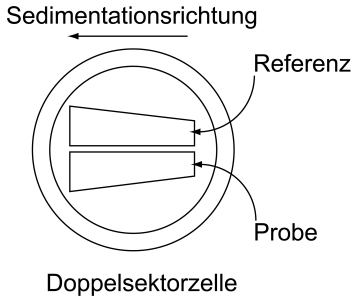

Abbildung 2.7: Schema einer Doppelsektorzelle der AUZ in der Draufsicht.

2.6.3 Ablauf der AUZ-Messungen

Vor jeder Messung in der AUZ mussten die Messzellen zusammengebaut und gesäubert werden. Danach wurde jede einzelnen Messkammer sieben mal mit dem verwendeten Puffer (in diesem Fall 2 mM P_i pH 7.5) gespült. Nachdem die Zellen mit dem Puffer gespült worden sind, wurden je Messzelle 400 µl Referenzpuffer bzw. Probenlösung eingefüllt. Eine AUZ-Messzelle besteht immer aus zwei sektorförmigen Messkammern (siehe Schema Abb. 2.7). Auf diese Weise kann die Probenlösung immer direkt gegen den Referenzpuffer gemessen werde.
In Tabelle 2.2 ist der Beladeplan, sowie die eingesetzten Verdünnungsstufen für das Sedimentationsexperiment gezeigt. Der Sedimentationsgeschwindigkeitslauf wurde bei 37° C in einer Optima XLA (Beckmann Coulter, Krefeld Deutschland, bzw. weltweit) sowie 40000 U/min durchgeführt.

2.7 Schnelle Kinetiken (Stopped-Flow)

Um schnelle chemische Reaktionen verfolgen zu können, wurde die so genannte "Stopped-Flow"-Technik eingesetzt. Die zu untersuchende Reaktion wird in einem Gerät durch sehr schnelles Vermischen der einzelnen Reaktanden gestartet und zu einer Beobachtungsküvette transportiert. In der Küvette kann dann der Reaktionsverlauf spektroskopisch nachgewiesen werden. Die "Stopped-Flow"-Technik erlaubt es chemische Reaktionen auf einer Zeitskala im Bereich von Millisekunden zu beobachten. Die einzelnen Schritte werden über einen Computer programmiert.

2.7.1 Technische Grundlagen des Stopped-Flow-Moduls (SFM-3)

Das in dieser Arbeit verwendete "Stopped-Flow-Modul" (SFM-3, Biologic, Claix Frankreich) verfügt über drei Edelstahlspritzen zur Aufnahme der Reaktionsflüssigkeiten. Die drei Spritzen sind über Teflonschläuche und zwei Mischkammern mit der Beobachtungsküvette verbunden. Die Spritzen werden über drei voneinander unabhängige Schrittmotoren angesteuert. Mit dem Computerprogramm

BioKine (Version 4.10, Biologic, Claix Frankreich) können die Schrittmotoren kontrolliert und verschiedene Schusssequenzen programmiert werden. Die Spritzen werden jeweils von einem eigenen Schrittmotor angetrieben, der Aufgrund der elektronischen Ansteuerung bis zu 6400 Einzelschritte pro Umdrehung ausführen kann. Dadurch ist eine präzise Kontrolle der verwendeten Volumina möglich. Zur Überwachung des Reaktionsablaufs wurde die Lichtstreuung der Probe in der Küvette bei einem Winkel von 90° über einen Photomultiplier gemessen. Das Signal des gestreuten Lichtes ist dabei proportional zum Anstieg des Molekulargewichtes der beobachteten Probe. Der zeitliche Verlauf des Signals wurde ebenfalls mit der Software BioKine gemessen und gespeichert.

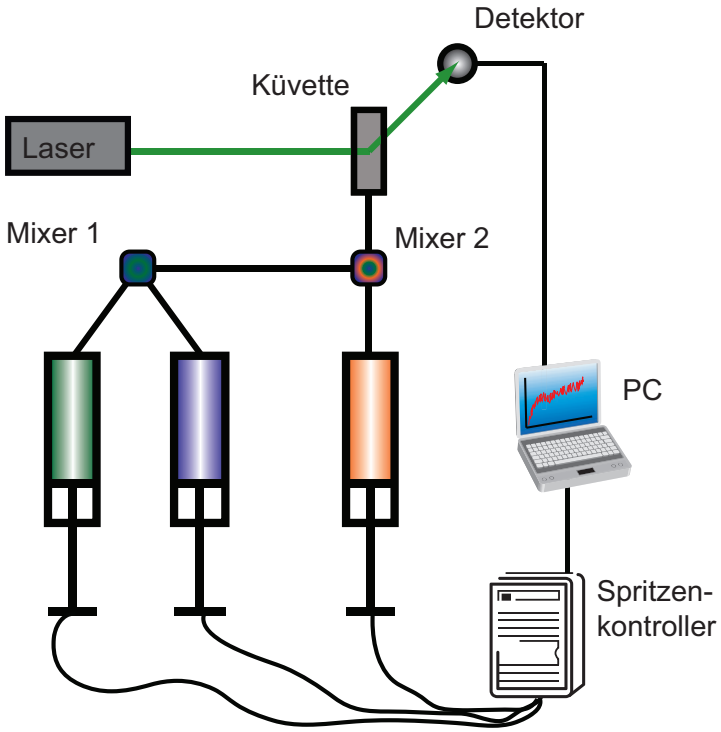

Abbildung 2.8: Gezeigt ist die schematische Repräsentation des SFM-3. Die drei Edelstahlspritzen können getrennt von einander gefüllt werden (nicht gezeigt). Die Volumina die zwischen der Beobachtungsküvette und den Spritzen zu füllen sind, betragen zwischen 150 und 300 µl. Durch die hohen Flussraten (mehrere ml/s) in einem Stopped-Flow Experiment können sehr schnelle Mischzeiten erreicht werden. Zur Beobachtung der Reaktion können verschiedene Techniken z. B. Lichtstreuung, Absorption- oder CD-Messungen zum Einsatz kommen.

2.7.2 Testmessungen zur Eichung des Stopped-Flow Moduls

Der Test des Stopped-Flow Moduls wurde nach der Empfehlung des Herstellers (Biologic, Claix Frankreich) durchgeführt. Als Testreaktion wurde die Reduzierung von 2,6 Dichlorophenolindophenol (DCIP) durch Ascorbinsäure (AS) benutzt [96]. DCIP absorbiert stark bei 524 nm. Durch die Reduktion mit AS wird DCIP fast komplett entfärbt (Abb. 2.9 zeigt den Reaktionsablauf). Die Reduktionsreaktion folgt einer Reaktionskinetik zweiter Ordnung und ist sehr stark pH abhängig. Die Geschwindigkeitskonstante beträgt ~$10^{4.6} M^{-1} s^{-1}$ bei einem pH von 2.0 und ~$10^{2.5} M^{-1} s^{-1}$ bei einem pH von 8.0. Sofern eine im Verhältnis zu AS deutlich kleinere Konzentration an DCIP eingesetzt wird, folgt die Reduktion einer Kinetik pseudo-erster Ordnung . Die Geschwindigkeitskonstante ist in diesem Fall direkt proportional zur Konzentration der AS.
Aufgrund der pH-Abhängigkeit ist diese Reaktion ideal um das "Stopped-Flow" Modul zu testen. Dies kann auf zwei Arten geschehen. Zu einen kann man die schnelle Reaktion bei eine pH von 2 mit

verschiedenen AS-Konzentrationen durchführen. An die gemessenen Daten wird dann eine Exponentialfunktion für die Reaktion angepasst. Die Schnittpunkte dieser angepassten Funktionen geben dann die Totzeit des Gerätes an.
Weiterhin kann die pH-Abhängigkeit der Reaktion ausgenutzt werden um die Totzeit zu bestimmen. Dazu wird die Messungen der DCIP-Reduktion einmal bei bei pH 9.0 und 2.0 durchgeführt. Mit dem Ergebnis der Messung bei pH 2.0 wird die Geschwindigkeitskonstante und die Absorptionsänderung während des Reaktionsverlaufes bestimmt. Da hier die Reaktion sehr schnell abläuft, wird man nicht die komplette Absorptionsänderung erfassen können. Dies wird mit der Messung bei pH 9.0 durchgeführt. Hier ist die Reaktion so langsam, das die Totzeit des Gerätes keine Rolle mehr spielt. Man kann den kompletten Verlauf der Reaktion verfolgen und die Absorptionsänderung bestimmen. Mit Hilfe der Gleichung 2.19 kann dann die Totzeit des Gerätes mit Hilfe der Ergebnisse der Reaktionen bei pH 2 und 9 bestimmt werden. Diese Vorgehen wurde im Detail in [96] beschrieben.

$$Totzeit = \frac{1}{k_1} * ln * (A_0/A_1) \tag{2.19}$$

Hierbei ist k_1 die Geschwindigkeitskonstante aus der Reaktion bei pH 2.0. A_0 und A_1 ist die Änderung der Absorption bei pH 9 und pH 2.

Überprüfung der Wasch- und Stoppqualität des SFM-3

Um den Einfluss von unterschiedlichen Waschvolumina sowie, die Anwesenheit von Artefakten während des Stoppvorganges zu überprüfen wurden, folgende Messungen durchgeführt. Als Testreaktion wurde die Reduktion von DCIP mit AS in der langsamen Variante bei pH 9.0 gewählt. In diesem Versuch kamen nur die Spritzen eins (10 mM AS, pH 9,0) und drei (100 µM DCIP) des SFM-3 zum Einsatz. Die Datenaufnahme wurde jeweils 100 ms vor Beginn des eigentlichen Schusses gestartet. Gemessen wurde die Absorptionsänderung von DCIP bei 524 nm. Das Mischungsverhältnis betrug 1:1, also gleiche Volumina aus beiden Spritzen pro Schuss. Für diesen Versuch wurde eine Küvette mit 5 mm Schichtdicke und 15 µl Volumen benutzt. Die Schussparameter der Messungen sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Schuss-Sequenzen für den Test des Stoppventils und des Waschens

Schußnr.	Schussdauer [ms]	Volumen pro Spritze [µl]	Flussrate [ml/s]
1	25	75	6.0
2	50	150	6.0
3	100	300	6.0

Testmessung zum Einsatz von Verdünnungsreihen im SFM-3

Durch die hohe Präzision der Schrittmotoren an den einzelnen Spritzen können auf einfache Weise Experimente mit verschiedenen Verdünnungen hintereinander durchgeführt werden. Diese Verdünnungsreihen erfordern daher kein Austauschen der Spritzeninhalte. Auch diese Eigenschaft des SFM-3 kann mit der Reduktion von DCIP mit AS überprüft werden. Dazu wurden die Spritzen folgendermaßen gefüllt:

Spritze 1: Ascorbinsäure (AS) 20 mM, pH 9

Spritze 2: Puffer (H_20 pH 9)

Spritze 3: DCIP 100 µM

Die Tabelle 2.4 gibt die Parameter der eingesetzten Verdünnungsreihe an. Das Volumen wurde konstant gehalten. Das bedeutet über Spritze 3 wurde immer die gleiche Menge an DCIP eingespritzt. Spritze 1 und 2 wurden für die Verdünnungsreihe genutzt. Hier war das Endvolumen aus Spritze 1 und 2 genauso groß wie das aus Spritze 3. Erneut wurde die Absorption von DCIP bei 524 nm.

Tabelle 2.4: Schuss-Sequenzen für den Test der Verdünnnungsreihe.

Verdünnungsstufe	Menge AS [µl]	Menge Puffer [µl]	Menge DCIP [µl]	Flussrate [ml/s]
1/2	100	100	200	6
1/4	50	150	200	4
1/6	33.3	166.6	200	4
1/12	16.6	183.3	200	4
1/24	8.3	191.7	200	4

2.8 Lichtstreuung

Eine wichtige Methode zur Charaketrisierung von Molekülen in Lösung ist die Lichtstreuung. Die theoretischen Grundlagen dieser Technik wurden erstmals von Lord Rayleigh Ende des 19. Jhd. an Gasen dargestellt. Smoluchowski und Einstein erweiterten diese Theorie, 1908 bzw. 1910, auf Flüssigkeiten. Beide Wissenschaftler erklärten, dass die beobachteten Änderungen im gestreuten Licht durch Änderungen in der Flüssigkeit hervorgerufen werden. Diese Änderungen werden durch thermische Bewegungen in der beobachteten Flüssigkeit verursacht.
Die Fluktuationen des gestreuten Lichtes durch die Lösung werden mit zwei unterschiedlichen Methoden gemessen. Die als statische Lichtstreuung bezeichnete Methode misst die Intensität des gestreuten Lichtes als eine Funktion des Streuwinkels und der Konzentration der zu beobachtenden Moleküle in der Lösung. Mit dieser Methode ist die Bestimmung des mittleren Molekulargewichts und des Gyrationsradius möglich. Weiterhin können Formfaktoren der gemessenen Moleküle bestimmt werden.
Mit der zweiten Methode, die als dynamische Lichtstreuung (DLS) bezeichnet wird, misst man die Intensität und die Polarisation des gestreuten Lichtes. Mit diesen Informationen können Aussagen über die Größe, Form und Interaktionen mit anderen Molekülen in Lösung getroffen werden. Weiterhin kann man mit dieser Methode den Diffusionskoeffizienten der gemessenen Moleküle bestimmen. Die Photonenkorrelationsspektroskopie ist eine verbreitete Methode um DLS-Daten zu analysieren.
Statische- und Dynamische Lichtstreuung liefern sich ergänzende Informationen. Aus diesem Grund werden Sie oft gemeinsam bzw. gleichzeitig eingesetzt um Polymere in Lösung zu charakterisieren. Im allgemeinen bieten die verschiedenen Varianten der Lichtstreuung eine Möglichkeit Informationen über Moleküle bzw. Proteine zu erhalten, ohne diese direkt beeinflussen zu müssen. Die Methode der Lichtstreuung wurde in dieser Arbeit nur in Verbindung mit den Messungen im "Stopped-Flow"-Gerät eingesetzt. Im Folgenden wird daher nur kurz auf die Theorie der Lichtstreuung eingegangen und dann erklärt, wie sich dies auf die Praxis auswirkt.

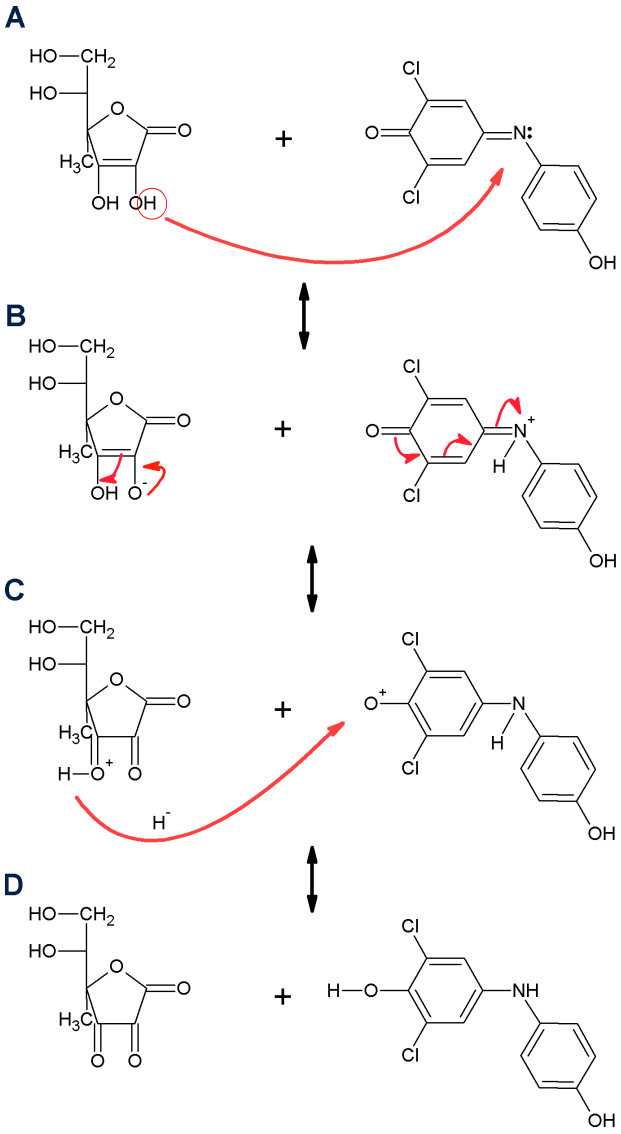

Abbildung 2.9: Darstellung der Reduzierung von 2,6 Dichlorophenolindophenol (DCIP) durch Ascorbinsäure (AS). **A.** Reduzierte AS links, oxidiertes DCIP ist rechts dargestellt. Durch das Vorhandensein von nicht konjugierten Doppelbindungen im Ring hat das oxidierte DCIP eine blaue Farbe. **B. & C.** Reduktion von DCIP. **D.** Die AS ist oxidiert. Im DCIP sind in beiden Ringen die Ladungen delokalisiert. Die konjugierten Doppelbindungen absorbieren im UV-Bereich. Die Lösung wird farblos (auch Leuko-DCIP; *leukos, gr. farblos*)

2.8.1 Lichtstreuung in der Theorie...

Betrachtet man ein einzelnes Molekül, das von einem Lichtstrahl angestrahlt wird, so induziert das Licht in dem Molekül ein Dipolmoment (s. Abb. 2.10). Dieses Dipolmoment wird dann mit der Frequenz der einfallenden Lichtwelle oszillieren und dabei wieder Strahlung aussenden. Die Wellenlänge der ausgesendeten Strahlung entspricht dabei der der einfallenden Welle. Für die folgende Betrachtung wird angenommen, dass die Dimension des angestrahlten Moleküls klein ist im Verhältnis zur Wellenlänge des einfallenden Lichtes ist. Die einfallende Lichtwelle kann mit der folgenden Gleichung beschrieben werden:

$$\vec{E}_{in}(x,t) = E_0\vec{e}_z \sin(\omega_0 t - \frac{2\pi x}{\lambda}) \tag{2.20}$$

$$\omega_0 = 2\pi c/\lambda \tag{2.21}$$

Dabei wird angenommen, dass das Licht in x-Richtung monochromatisch, sowie in z-Richtung polarisiert ist. Dies wird z.B. durch den Einsatz einer Laserquelle gewährleistet. λ ist hier die Wellenlänge des einfallenden Lichtes und c ist die Lichtgeschwindigkeit. Dass überhaupt Licht gestreut wird rührt von dem oszillierenden Dipolmoment her. Die lineare Polarisierbarkeit eines Teilchen kann dabei wie folgt beschrieben werden:

$$\overrightarrow{\mu}(x,t) = \alpha\vec{E}_{in}(x,t) \tag{2.22}$$

Hierbei ist die Amplitude der gestreuten Welle proportional zur zweiten Ableitung des Dipolmomentes nach der Zeit:

$$\overrightarrow{E_s}(x,t) = \frac{1}{c^2}\frac{\partial^2}{\partial t^2}\overrightarrow{\mu}(x,t) \tag{2.23}$$

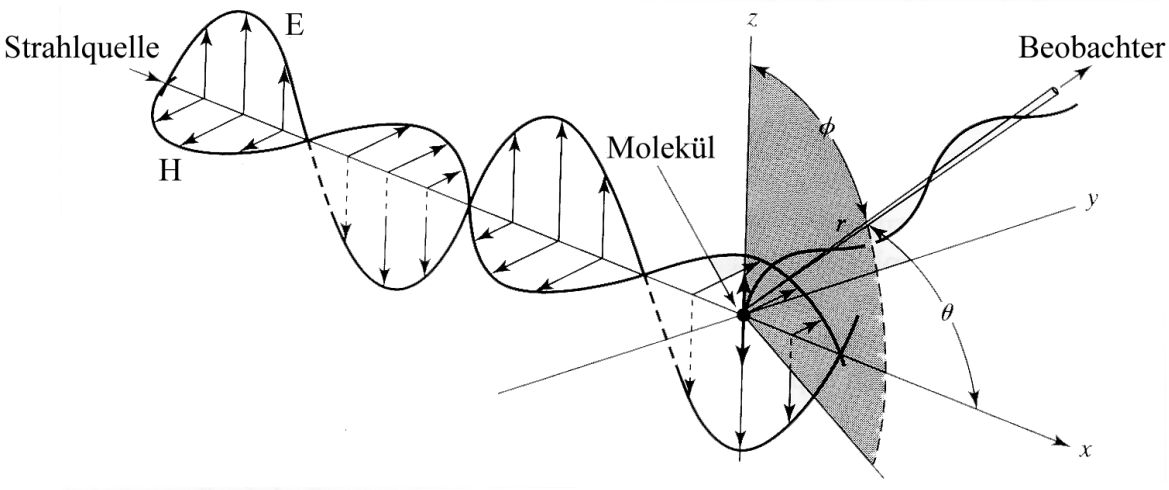

Abbildung 2.10: (Abbildung nach [98])

Wird der Abstand vom betrachteten Molekül größer, so fällt die Amplitude des Streufeldes mit $\frac{1}{r}$ ab. Sie ist zudem proportional zum Sinus des Winkels ϕ zwischen der Dipolachse und der Ausbreitungsrichtung des gestreuten Lichtes. Daraus folgt, dass die Amplitude in der Richtung des Dipolmomentes

(hier z-Richtung) 0 wird. Senkrecht zur Dipolachse wird sie maximal. Die gestreute Welle wir mit der folgenden Gleichung beschrieben:

$$\vec{E}_s = \frac{4\pi^2 \alpha E_0 \vec{e}_z sin\phi}{r\lambda^2} \sin(\omega_0 t - \frac{2\pi x}{\lambda}) \tag{2.24}$$

Die Intensität des Streulichts lässt sich wie folgt berechnen. Sie ergibt sich aus dem Quadrat der Amplitude des E-Feld-Vektors der Lichtwelle:

$$I_s = \frac{16\pi^4}{\lambda^4} \alpha_2 I_0 \frac{sin2(\phi)}{r^2} \tag{2.25}$$

Diese Gleichung ist auch als Rayleigh-Streuformel bekannt. Betrachtet man den Zusammenhang zwischen der Polarisierbarkeit α eines einzelnen Teilchens und dem Brechungsindex einer größeren Anzahl unabhängiger Streuzentren innerhalb eines idealen Gases, so gilt zusätzlich die Clasius-Mossotti-Beziehung:

$$\alpha = \frac{n^2 - 1}{4\pi N} \tag{2.26}$$

N beschreibt hier die Anzahl der Teilchen pro Volumeneinheit. Der Brechungsindex des Gases wir durch n ausgedrückt. Betrachtet man danach die Situation für Moleküle in einer Flüssigkeit, so ergibt sich:

$$\alpha = \frac{n^2 - n_0^2}{4\pi N} \tag{2.27}$$

Hierbei ist n_0 der Brechungsindex des reinen Lösungsmittels und n beschreibt den Brechungsindex der Lösung. Für stark verdünnte Lösungen kann man daher annehmen das $n \approx n_0$ ist. Kleine Unterschiede im Brechungsindex werden durch das Brechungsindexincrement beschrieben:

$$\Delta n = c \frac{\partial n}{\partial c} \tag{2.28}$$

Um jetzt die Polarisierbarkeit eines Teilchens in der Lösung zu erhalten beachtet man den Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht sowie der Anzahl der Teilchen:

$$N = \frac{c * N_A}{M} \tag{2.29}$$

und erhält somit:

$$\alpha = \frac{c}{2\pi N} n_0 \frac{\partial n}{\partial c} = \frac{M}{2\pi N_A} n_0 \frac{\partial n}{\partial c} \tag{2.30}$$

Zusammen mit der Gleichung 2.25 kann man jetzt die Intensität des Streulichts für ein Teilchen in verdünnter Lösung angeben.

$$I_s = I_0 \frac{4\pi^2}{\lambda^4} \frac{M^2}{N_A^2} n_0^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \frac{\sin^2 \phi}{r^2} \tag{2.31}$$

Multipliziert man die obige Gleichung mit der Anzahl der Teilchen im Streuvolumen (Gl. 2.29), so kann man die Streulichtintesität pro Volumeneinheit der Lösung angeben. Für eine Volumeneinheit gilt somit:

$$I_s = \frac{I_0 4\pi^2}{\lambda^4} c \frac{M}{N_A} n_0^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \frac{sin^2\phi}{r_2} \tag{2.32}$$

Nach Gleichung 2.32 ist die Intensität des gestreuten Lichts pro Volumeneinheit proportional zum Molekulargewicht der Teilchen in der Lösung. Bei bekannter Teilchenkonzentration kann man somit unter anderem das Molekulargewicht bestimmen. Übersteigt die Abmessung der Moleküle allerdings $\sim\frac{\lambda}{10}$ des einfallenden Lichtes, so müssen Interferenzeffekte berücksichtigt werden. Diese werden durch räumlich voneinander getrennten Elektronen desselben Moleküls ausgelöst. Diese Effekte kann man durch Definition von Formfaktoren berücksichtigen. Diese Formfaktoren beschreiben das Verhältnis der Streuintensität des ausgedehnten Moleküls zu derjenigen, eines im Verhältnis zur Lichtwellenlänge kleinen Moleküls derselben Masse.

2.8.2 ...und Praxis

In der Praxis wurde nur der Fall des gestreuten Lichtes bei 90° betrachtet, da im "Stopped-Flow" nur dieser Winkel verfügbar war. Damit aus diesen Messungen sinnvolle Daten extrahiert werden konnten muss die folgende Annahme gelten.

$$I_{Tetramer} = I_0 \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{r^2 \lambda^4 N_A^2} \left(\sin^2\phi\right) cM \tag{2.33}$$

$$I_{Tetramer} \propto cM \quad wenn\, gilt\, [c] = \frac{g}{l} \tag{2.34}$$

$$\frac{I_{n*Tetramer}}{I_{Tetramer}} = \frac{M_{n*Tetramer}}{M_{Tetramer}} = n \tag{2.35}$$

Die Gleichungen 2.33 bis 2.35 sagen aus, dass die gestreute Lichtintensität proportional zum Molekulargewicht des gemessenen Moleküls ist. Für die Messungen im "Stopped-Flow"-Gerät, mit denen das Wachstum der Filamente gemessenen werden soll, bedeutet das folgendes:

1. Während der Messung wird die gemessene Lichtintensität ansteigen.
2. Aus dieser Messkurve kann dann die Geschwindigkeitskonstante für das laterale Wachstum vom Tetramer zum ULF durch Anpassen eines Modells errechnet werden.

Um die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung der ULFs anzupassen wird eine Gleichung in der Form:

$$I_{ges} = I_{Tetramer} + 2 * I_{Oktamer} + 4 * I_{Hexadecamer} + 8 * I_{ULF} \tag{2.36}$$

in Kombination mit den im Ergebnisteil vorgestellten Modellen verwendet werden.

2.8.3 Wachstumsmessung über schnelle Kinetiken

Für die Experimente im SFM-3 wurden P_i- und 2-fach Assemblypuffer (siehe 2.1.1) vorbereitet und mit 0.22 µm Nalgene Filtern steril filtriert. Vor dem Versuch wurde das SFM-3 mittels Thermostat

(Julabo) auf 37° C temperiert. Während dieser Zeit, aber mindestens zwei Stunden vorher, wurden die Puffer sowie das auf 0.4 oder 0.8 mg/ml verdünnte Vimentin entgast. Dazu wurden die Puffer- und Proteinlösungen in einen Exikator mit angeschlossener Vakuumpumpe gebracht. Durch dieses Vorgehen wurde das gelöste Gas in den Lösungen minimiert. Dies war nötig um Kavitationseffekte während der "Stopped-Flow"-Versuche zu unterbinden. Kavitation ist der Effekt, dass sich bei hohen Fließgeschwindingkeiten der Druck in der Flüssigkeit verringert (siehe Gesetz von Bernoulli). Da beim "Stopped-Flow"-Experiment teilweise sehr hohe Flußgeschwindigkeiten in den dünnen Zuleitungen erreicht werden kann die Geschwindigkeit so hoch werden, dass der statische Druck unter den Verdampfungsdruck der Flüssigkeit fällt. Als Folge bilden sich Dampf- oder Gasblasen. Diese Blasen stören die Messung mittels Laserlichtstreuung erheblich.
Nach dem Entgasen wurden die Lösungen vorsichtig in 60 ml Spritzen überführt und an die Luer-Lock Verbindungen der Edelstahlspritzen des SFM-3 angeschlossen. Die Vimentinlösung wurde in Spritze eins, der P_i-Puffer in Spritze zwei und der 2-fach Assemblypuffer in Spritze drei eingefüllt. Um die Luftblasen in der Spritze zu eliminieren wurde nach dem Einfüllen ein Teil der Flüssigkeit wieder in die Füllsprizte gedrückt und danach wieder eingezogen. Danach wurden aus den einzelnen Spritzen ein Teil der Flüssigkeit durch die Zuleitungen bis zur Beobachtungsküvette gedrückt. Auf diese Weise wurde die Luft aus den Zuleitungen und den Mixern entfernt. Nachdem alle Zuleitungen gefüllt worden waren, war das SFM-3 einsatzbereit. Vor Beginn der Messungen wurde allerdings noch einmal 30 Minuten gewartet, damit die Puffer die Temperatur des SFM-3 annehmen konnten.
Im SFM-3 wurden die Messungen nach folgenden Schema durchgeführt:
im ersten Schritt wurde die Küvette mit P_i-Puffer gespült. Dann folgte das Vermischen der Reaktionslösungen. Vimentin wurde mit dem P_i-Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt und dann mit der gleichen Menge 2-fach Assemblypuffer versetzt, so dass die KCl-Konzentration in der Küvette schlussendlich 100 mM KCl betrug. Nach dem Ablauf dieser Sequenz wurden die Spritzenmotoren gestoppt und gleichzeitig das Flußventil geschlossen sowie die Messung gestartet. Dieser Ablauf erfolgte automatisch nach einem vorgegeben Programm. Die Schusssequenz ist in Tabelle 2.5 dargestellt. Die eingesetzten Volumina für die Messreihe werden in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.5: Schuss-Sequenz für die Messung von Vimentin

Zeit [ms]	10	400	1000 - 5000§	200	Inhalt der Spritzen
Spritze 1				V1*	Vimentin 0.4 bzw. 0.8 mg/ml
Spritze 2		400 µl		V2	P_i-Puffer 2 mM Phosphat pH 7.5
Spritze 3				V3	"2x Assembly-Puffer" (P_i-Puffer + 200 mM KCl)
Synchro 1#	on				

*: bezeichnet die Volumina der eingesetzten Reaktionlösungen (s. Tab. 2.6)
#: bezeichnet den Auslöser für die Datenaufnahme
§: Pause zwischen dem Waschen und dem Einspritzen der Reaktionlösungen

2.9 Reaktionskinetik

In dieser Arbeit wird die Reaktion des Proteins Vimentin zu langen IF untersucht. An dieser Stelle wird daher eine kurze Übersicht über die Grundlagen chemischer Reaktionskinetiken gegeben die später zum Einsatz kommen werden.

Tabelle 2.6: Vimentin-Verdünnungsreihe für das "Stopped-Flow".

Endkonz. Vimetin [mg/ml]	**V1:** Vwt# 0.4 mg/ml [µl]	**V2:** P_i-Puffer§ [µl]	**V3:** 2xAP* [µl]
0.20	100	-	100
0.16	80	20	100
0.12	60	40	100
0.10	50	50	100
Endkonz. Vimetin [mg/ml]	**V1:** Vwt# 0.8 mg/ml [µl]	**V2:** P_i-Puffer§ [µl]	**V3:** 2xAP* [µl]
0.4	100	-	100
0.3	75	25	100
0.2	50	50	100
0.1	25	75	100

#: Vimentin wild typ (Vwt) mit 0.4 bzw. 0.8 mg/ml
§: P_i-Puffer, 2 mM Phosphatpuffer pH 7.5
*: "2x Assembly-Puffer" (P_i-Puffer + 200 mM KCl)

2.9.1 Der grundlegende Verlauf einer chemischen Reaktion

Betrachtet man eine grundlegende Reaktion, bei der ein Ausgangsstoff bzw. Reaktand (A) zu einem Produkt (P) umgewandelt wird, so kann diese im Detail aus einer ganzen Reihe von elementaren Reaktionen bestehen. Diese Reaktionen sind durch das Auftreten von Zwischenstufen gekennzeichnet (ZS).

$$A \rightarrow P \tag{2.37}$$

$$A \rightarrow ZS_1 \rightarrow ZS_2 \rightarrow P \tag{2.38}$$

Durch die Beschreibung der elementaren Reaktionen, welche die gesamte Reaktion zu P ausmachen, erhält man die mechanistische Beschreibung einer Reaktion. Eine wesentliches Merkmal von chemischen Reaktionen ist die Geschwindigkeit mit der diese abläuft. Bei konstanter Temperatur ist die Geschwindigkeit einer solchen Elementarreaktion nur von der Konzentration der Ausgangsstoffe abhängig. In der Reaktionsgleichung:

$$aA + bB + ... + zZ \rightarrow P \tag{2.39}$$

ist die Geschwindigkeit, mit der das Produkt (P) gebildet wird, proportional zu der Kollisionsrate mir der die Reaktanden (A,B,...,Z) aufeinander treffen. Daher gilt:

$$Reaktionsgeschwindigkeit = k[A]^a[B]^b...[Z]^z \tag{2.40}$$

k wird dabei die Reaktionsgeschwindigkeit genannt. Eine weitere Eigenschaft ist die Reaktionsordnung, die durch die Summe der Exponenten der Reaktanden (a+b+...+z) definiert wird. Im Fall einer Elementarreaktion ist die Reaktionsordung durch die Anzahl der Moleküle bestimmt, die zusammentreffen müssen, damit die Reaktion stattfindet. Die oben beschriebene Reaktion A→P ist daher ein Beispiel für eine Reaktion 1. Ordnung. Reaktionen nach dem Schema 2A→P oder A+B→P wären Beispiele für eine bimolekulare Reaktion 2. Ordnung. Reaktionen 1. und 2. Ordnung kommen häufig vor. Die meisten chemischen Abläufe lassen sich mit ihnen beschreiben. Reaktionen 3. Ordnung sind

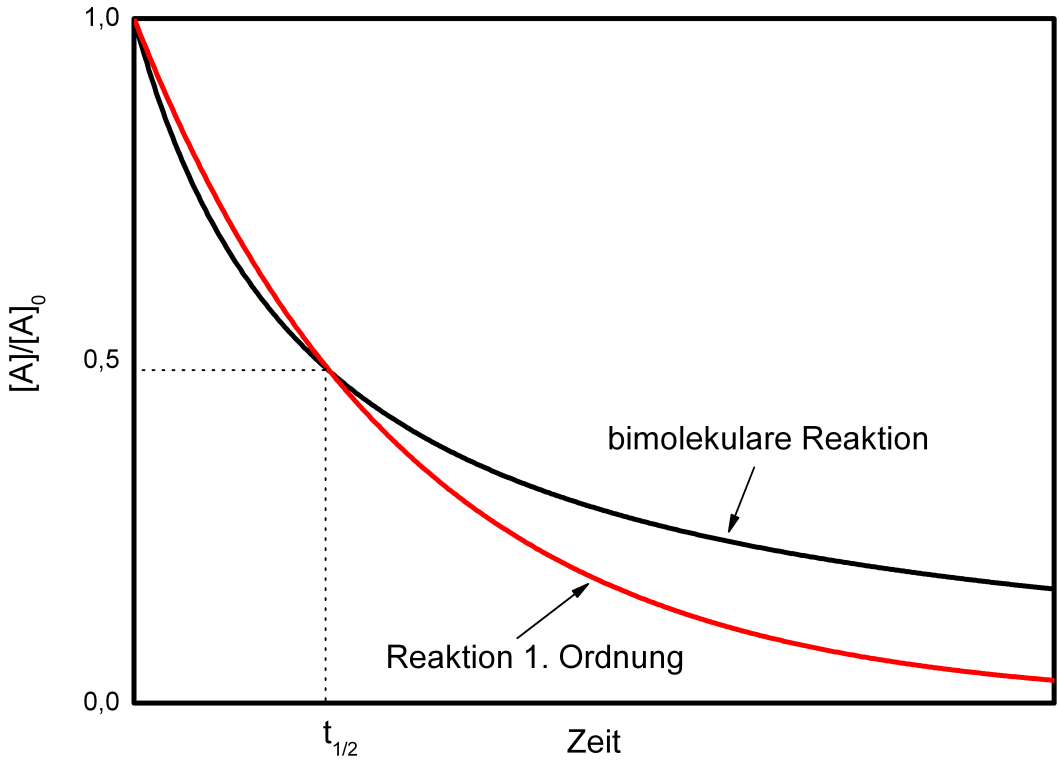

Abbildung 2.11: Die Abbildung zeigt beispielhaft den Verlauf einer Reaktion 1. und 2. Ordnung.

extrem selten, höhere Reaktionsordnungen sind nicht bekannt, was sehr leicht nachzuvollziehen ist. Das gleichzeitige Zusammentreffen von drei Molekülen ist ein Vorgang, der selten vorkommt, das gleichzeitige Zusammentreffen von vier oder mehr Molekülen kommt praktisch nie vor.

2.9.2 Reaktionsordnung

Die Ordnung einer Reaktion kann experimentell ermittelt werden. Dazu verfolgt man die Änderung der Konzentration eines Stoffes der an der Reaktion teilnimmt. Bei der in Abschnitt 2.9.1 beschriebenen Reaktion würde man entweder die Änderung der Konzentration von [A] oder [P] experimentell verfolgen.

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \tag{2.41}$$

Die Geschwindigkeit der Reaktion (ν) kann durch die vorhergehende Gleichung allgemein beschrieben werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit einer Reaktion erster Ordnung ist gegeben durch:

$$\nu = -\frac{d[A]}{dt} = k[A] \tag{2.42}$$

Für eine Reaktion zweiter Ordnung gilt dann:

$$\nu = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]^2 \tag{2.43}$$

Die obige Gleichung würde den Fall beschreiben bei dem zwei gleiche Reaktanden zusammentreffen müssen, damit die Reaktion abläuft ($2A \rightarrow P$). Für eine Reaktion zweiter Ordnung, bei der zwei

unterschiedliche Reaktanden aufeinander treffen müssen ($A + B \rightarrow P$), wird die Gleichung folgendermaßen abgeändert:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = k[A][B] \tag{2.44}$$

Ein einfacher Dimensionsvergleich zeigt, dass die Geschwindigkeitskonstante k für eine Reaktion 1. Ordnung (Gleichung 2.42) die Einheit s^{-1}hat. Für eine Reaktion 2. Ordnung ist es die Einheit $M^{-1}s^{-1}$.

2.9.3 Sonderfall - die Wachstumsreaktion (Polymerisation)

Im Folgenden soll kurz der Fall einer Wachstumsreaktion des Typs:

$$A + A \rightarrow X \tag{2.45}$$

dargestellt werden. Bei der Reaktion zweier gleicher Reaktanden kann dabei eine chemische Transformation stattfinden, muss aber nicht. Diese Reaktion wird in dieser Arbeit verwendet werden, um das Wachstum der IFs aus den Vorstufen zu beschreiben. Die Geschwindigkeitsgleichung für die Konzentrationsänderung von [A] über die Zeit ist dann:

$$\frac{d[A]}{dt} = -2k[A]_t^2 = -2k\left\{[A]_0 - [X]_t\right\}^2 \tag{2.46}$$

Die Geschwindigkeitskonstante wird bei dieser Reaktion per Konvention mit "2k" angegeben, da pro Reaktion immer zwei Moleküle von A pro Kollision reagieren. Trägt man 1/[A](t) gegen die Zeit auf, so kann man k aus der Steigung der Geraden ermitteln. Sind mehr als zwei Monomere an der Reaktion beteiligt müssen statistische Effekte und der mögliche Reaktionsablauf beachtet werden. Die Bildung von Polymere durch Reaktionen dritter oder höherer Ordnung ist allerdings sehr unwahrscheinlich. Sequentielle Reaktion mit dem prinzipiellen Ablauf:

$$Monomer \rightarrow Dimer \rightarrow Tetramer, \ (oder\ Trimer) \tag{2.47}$$

sind am häufigsten bei Polymerisierungsreaktionen anzutreffen. Sofern die Dimerisierung reversibel ist gilt:

$$\frac{d[A]}{dt} = -2k_{12}[A]_t^2 + 2k_{21}[X]_t \tag{2.48}$$

Die Reaktionsgleichung kann so geschrieben werden, dass sich alle Konzentrationsangaben auf die entsprechenden Monomere bzw. Dimere beziehen. Dementsprechend ergeben sich verschiedene Versionen der obigen Gleichung, jeweils für die verschiedenen Reaktionsschritte. Der hier beschriebene Ansatz zur Beschreibung einer sequentiell ablaufenden Polymerisierungsreaktion soll später genutzt werden um den Verlauf des IF-Wachstums zu erklären.

2.10 Auswertung

2.10.1 Bestimmung der Filamentlängen

Um die Filamentlängen zu erfassen wurden die Bilder vom AFM und EM mit der Software ImageJ [58] geöffnet und die Filamentlängen abgemessen. Die Bilder aus dem EM mussten für die Bearbeitung mit ImageJ zuerst eingescannt werden (Epson Perfection 3170 Photo, mit 800 dpi). Die digitalisierten Bilder wurden in ImageJ geöffnet und skaliert. Danach wurde die Konturlängen einzelner Filamente per Hand abgemessen. Daraus ergab sich dann eine Längenverteilung der Filamente für jeden gemessenen Zeitpunkt. Für die spätere Anpassung der kinetischen Modelle wurde für jeden gemessenen Zeitpunkt die mittlere Filamentlänge bestimmt.

2.10.2 Berechnung und Kurvenanpassung der Modelle

Die Berechnung der kinetischen Modelle für das Filamentwachstum wurden mit Hilfe der Software Berkeley Madonna Version 8.0 durchgeführt (http://www.berkeleymadonna.com, entwickelt von Robert Macey und George Oster an der University of California at Berkeley). Diese Software ist speziell angepasst um Differentialgleichungen numerisch mit hoher Geschwindigkeit zu lösen. Mit Berkeley Madonna war es zusätzlich möglich die theoretischen Ergebnisse mathematisch an die Messdaten anzupassen und so die Geschwindigkeitskonstanten zu berechnen. Die Anpassung in Berkeley Madonna nutzt eine nichtlineare Regression. Dabei werden die Summen der quadrierten Residuen zwischen dem Ergebnis des Modells und den experimentellen Daten minimiert. Die Modelle wurden in die Skriptsprache des Programms übertragen und sind im Anhang (s. 5.1.1, 5.1.2 und 5.1.3) zu finden.

2.10.3 Statistische Methoden

In dieser Arbeit wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Dieser Test macht keinerlei Annahmen über die zu Grunde liegende Verteilung der Messergebnisse und wird daher auch als nicht-parametrisch bezeichnet. Deshalb ist er für die statistische Überprüfung der Messungen in dieser Arbeit gut geeignet. Der t-Test nimmt z. B. eine gaussförmige Verteilung der Messergebnisse an und kann daher hier nicht verwendet werden. Für den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde ebenfalls gezeigt, dass er auch bei Stichproben mit kleinerem Umfang brauchbare Aussagen erzielt. In dieser Arbeit wurde der in MatLab implementierte Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test benutzt. Getestet wurde, ob der Median verschiedener Messungen gleich ist oder nicht. Dazu werden zwei Werte ermittelt, p und h. Weicht die Differenz der Mediane der zu vergleichenden Stichproben nicht signifikant von Null ab, so nimmt h den Wert Null an. Besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der Stichproben wird h den Wert eins annehmen. Der zweite Wert, p, ist die Wahrscheinlichkeit mit der die Null-Hypothese zutrifft oder nicht. p wird aus den Rangwerten für die Differenz aus den korrespondierenden Elementen der getesteten Proben ermittelt. Erhält man ein p nahe Null so darf die Gleichheit der betrachteten Proben angezweifelt werden.

Kapitel 3

Ergebnisse

Bedeutsame Bilder liefern Einsichten jenseits der Sprache

3.1 Beobachtung des Vimentinwachstum mit EM & SFM

3.1.1 Überprüfung der Vimentinlösung nach der Dialyse mittels AUZ

AUZ wurde eingesetzt um zu prüfen, ob das Vimentin nach der Dialyse in dem P_i-Puffer als Tetramer vorliegt, oder ob zusätzlich noch größere Aggregate in der Lösung vorhanden sind. Im Sedimentationsgeschwindigkeitslauf wurde frisch dialysiertes Vimentin in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Abbildung 3.1 zeigt die Ergebnisse des Sedimentationsgeschwindigkeitslaufs. Die Auswertung erfolgte nach der dc/dt (time-derivative) Methode und dem Programm dcdt+ von John Philo (siehe Kapitel 2.6). Mit Hilfe der AUZ konnten in der verwendeten Proteinlösung nach der Aufreinigung und der Dialyse hauptsächlich zwei verschiedene Vimentin-Spezies nachgewiesen werden (s. Abb. 3.1 **A** & **B**). Die zweite Spezies verschwand bei niedriger Konzentration (s. Abb. 3.1 **C**). Die Auswertung mit dcdt+ ergab einen Sedimentationskoeffizient von ~5.8 S für die vorherrschende 1. Spezies (s. Abb. 3.1 **A-C**) sowie ein Molekulargewicht von ~220 kDa. Diese Werte sind typisch für Vimentin-Tetramere und wurden schon früher von Mücke et al. beschrieben [56]. Bei der zweiten gefundenen Spezies handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Vimentin-Tetramere, deren "Head" oder "Tail" sich nach der Dialyse falsch zurück gefaltet haben. Schon kleine Änderungen in der Tertiärstruktur, die z. B. die longitudinale Ausdehnung beeinflussen, haben einen deutlichen Effekt auf die Sedimentationsgeschwindigkeit. Die Konzentration dieser zweiten Spezies betrugt maximal 10 % der gemessenen Tetramerkonzentration (s. Tabelle 3.1). Für die nachfolgenden Messungen zur Wachstumskinetik kann ein Anteil von maximal 10% falsch gefaltetem Protein durchaus in Kauf genommen werden. Im Rasterkraft- und Elektronenmikroskop können die Tetramere mit den hier verwendeten Techniken nicht bzw. nur sehr schwer aufgelöst werden.

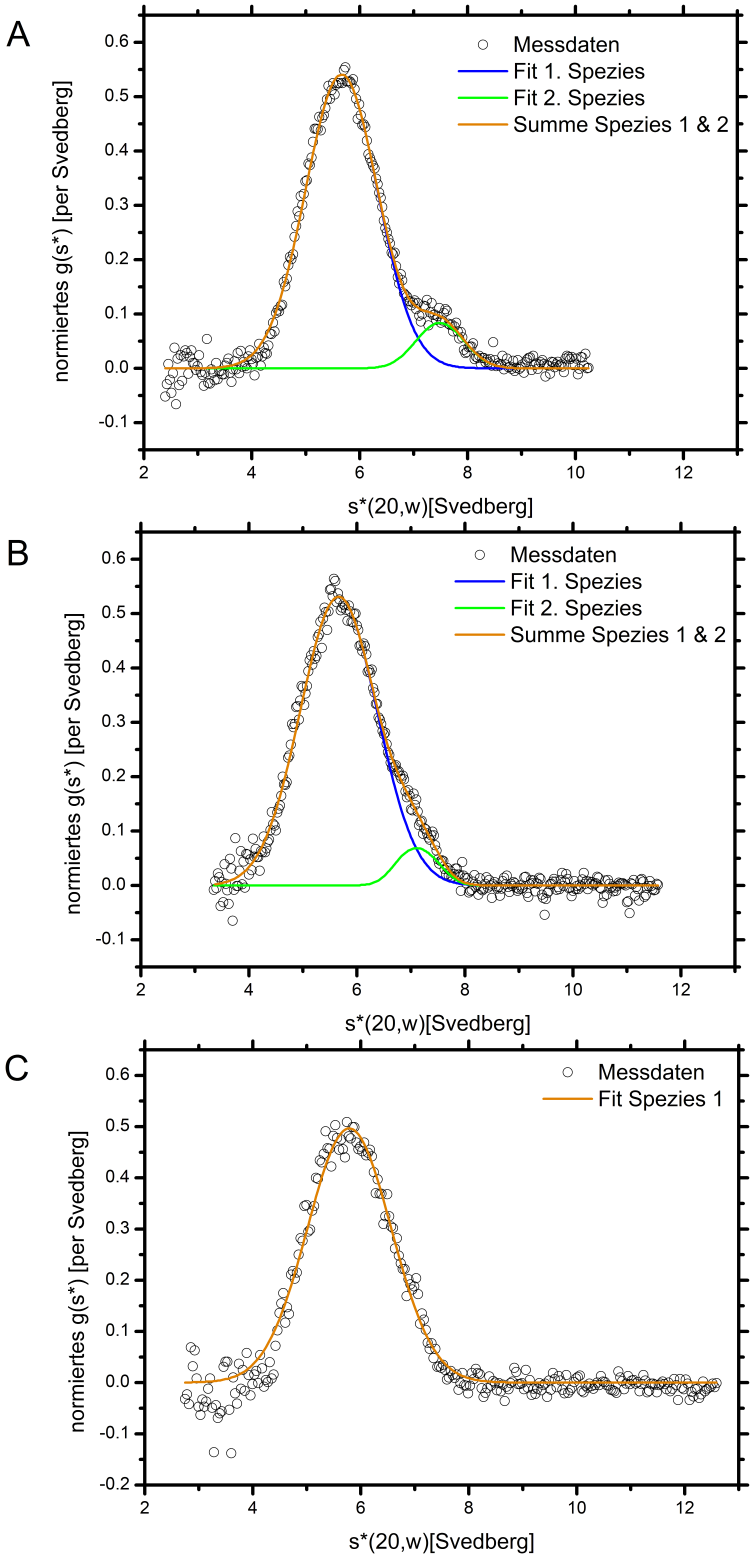

Abbildung 3.1: Die Abbildung zeigt das Ergebnis des Sedimentationsgeschwindigkeitslaufes mit Vimentin in 2 mM Phosphatpuffer bei drei verschiedenen Konzentrationen. **A** zeigt das Ergebnis des Sedimentationsgeschwindigkeitslaufes mit 0.25 mg/ml Vimentin. **B** stellt das Ergebnis des Laufes für 0.18 mg/ml dar, **C** zeigt den Lauf bei 0.12 mg/ml. Bei höheren Konzentrationen kann man deutlich eine zweite Spezies feststellen, deren Anteil an der gesamt Proteinkonzentration maximal 10 % beträgt. Die 1. Spezies ist deutlich als Tetramer mit ~5.8 S zu identifizieren [56].

Tabelle 3.1: Ergebnisse der AUZ-Messung nach der Auswertung mit der dcdt+-Methode

	A, 0.25 mg/ml		**B**, 0.18 mg/ml		**C**, 0.12 mg/ml
Parameter	Spezies 1	Spezies 2	Spezies 1	Spezies 2	Spezies 1
$C\,[OD]$	1.11	0.11	0.944	0.065	0.512
$s\,[S]$	5.684	7.488	5.685	7.107	5.816
$M\,[kDa]$	220.64	858.16	225.36	1904.76	207.11

A-C beziehen sich auf die Abbildung 3.1 **A-C**.
C, gemessene optische Dichte der jeweiligen Spezies
s, errechneter Sedimentationskoeffizient
M, apparentes Molekulargewicht in kDa, ermittelt aus dem mittleren s-Wert und der Bandenverbreiterung unter Annahme einer homogenen Spezies

3.1.2 EM & SFM von Vimentin-IFs

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Vimentin nach der Dialyse im P_i-Puffer hauptsächlich als Tetramer vorliegt, konnte mit dem nächsten Schritt, der Aufklärung der Wachstumskinetik, begonnen werden. Für die Messung des Längenwachstums sollten Bilderserien mit dem EM und dem SFM aufgenommen werden. Die Bilder zeigen dann die Längenverteilung der Filamente nach Ablauf einer definierten Wachstumszeit an. Die Längenverteilung wurde durch Ausmessen der Konturlängen einzelner Filamente auf den Bildern ermittelt. Pro Zeitschritt wurden so zwischen 200 und 600 einzelne Filamente abgemessen. Aus den Längenverteilungen wurde das mittlere Längenwachstum der Filamente über die Zeit bestimmt. Da für die beiden Methoden die Probenvorbereitung sowie die verwendeten Oberflächen unterschiedlich waren, musste zuerst geklärt werden, ob es einen signifikanten Unterschied bei der Messung der mittleren Filamentlängen gibt oder ob die Ergebnisse beider Methoden miteinander verglichen werden können. Für das EM mussten die Filament mit Glutaraldehyd fixiert und mit Uranylacetat kontrastiert werden. Die Messungen mit dem SFM erfolgten direkt im verwendeten P_i-Puffer. Eine Fixierung oder Färbung war daher nicht nötig. Weiterhin wurden verschieden Oberflächen verwendet. Für das EM wurden Kohlefilme auf Kupfernetzen benutzt. Im SFM wurden Glimmer und Glas verwendet.

3.1.3 Liefern EM und SFM vergleichbare Daten?

Um die Messergebnisse von den Bildern direkt vergleichen zu können wurde die Inkubationszeit der Filamente konstant bei 15 Minuten gehalten und danach für EM und SFM vorbereitet. Da die Vimentinfilamente an die verwendeten Oberflächen adsorbieren mussten, wurde in diesem Versuch gleichzeitig geprüft, ob die Adsorptionszeit einen Einfluss auf das Messergebnis hat. Durch Variation der Adsorptionszeit der Filamente an die Oberfläche (30 s., 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten) und anschließendes Abspülen der überschüssigen Filamente konnte geprüft werden, ob es einen Unterschied zwischen den verwendeten Oberflächen (Kohlefilm, Glimmer, Glas) gibt und ob eventuell die Adsorptionzeit einen Einfluss auf das Ergebnis der gemessenen Längenverteilung hat.
Für das EM wurde das Filamentwachstum durch Zugabe von Glutaraldehyd gestoppt. Danach wurde ein Aliquot auf den vorbereiteten Kohlefilm (s. Material und Methoden 2.5.3) aufgetragen. Nach der definierten Adsorptionszeit (s. o.) wurde die überschüssige Lösung mit einem Whatmanpapier von der Unterseite des Grid her abgezogen. Die Filamente auf dem Kohlefilm wurden dann sofort mittels Uranylacetat negativ kontrastiert.
Für das SFM wurde das Filamentwachstum durch schnelles Verdünnen (1:80) stark verzögert. 30 µl der Verdünnung wurden anschließend auf die Glimmeroberfläche aufgetragen. Die Filamente zeigten

kein weiteres Wachstum mehr sobald sie an die Oberfläche adsorbieren. Wie oben beschrieben wurden auch hier Adsorptionszeiten zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten gewählt. Danach wurde mit 200 µl Puffer (2 mM Phosphat, 100 mM KCl, pH 7.5) gespült, die Flüssigkeitszelle des SFM aufgesetzt und mit dem Scannen begonnen.
Die gemessene mittlere Filamentlänge (MFL) für Vimentinfilamente nach 15 Minuten Wachstum bei 37° C scheint auf Kohlefilmen im EM bzw. auf Glimmer im SFM reproduzierbar zu sein (siehe Abb. 3.2 **A** & **B**). Auf diesen Oberflächen sind die Messergebnisse für die einzelnen Adsorptionszeiten nahe um den gesamtem Mittelwert einer Messreihe verteilt (durchgezogene graue Linie). Im Gegensatz dazu liefern die Messungen auf der Glasoberfläche Ergebnisse, die stärker vom Gesamtmittelwert abweichen.
Zusätzlich wurden die Ergebnisse der einzelnen Messungen mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentests überprüft. Dabei wurde getestet, ob die Verteilung, welche den Messwerten zu Grunde liegt gleich ist, oder nicht.
Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest bestätigte, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messergebnissen auf Kohlefilm im EM (siehe Abb. 3.2 **A**) und den Messergebnissen auf Glimmer im SFM gibt (siehe Abb. 3.2 **B**). Das Ergebnis des Tests war $p = 1$ und $h = 0$ bei einem Signifikanzniveau $alpha = 0.05$ (mit dem MatLab-Paket, siehe 2.10.3). Im Gegensatz dazu wichen die Ergebnisse auf der Glasoberfläche im SFM (siehe Abb. 3.2 **C**) signifikant von denen auf Kohlefilmen und Glimmer ab ($alpha = 0.05$, $p = 0.03$, $h = 1$). Die Größe der Stichproben betrug $n = 1018$ auf Glimmer, $n = 3587$ auf Kohlefolien und $n = 1323$ auf Glas.
Die Ergebnisse des Oberflächen- und Methodenvergleichs führten dazu die Glasoberfläche von den folgenden Kinetikmessungen auszuschliessen. Eine Vergleichbarkeit zwischen quantitativen Messungen auf Glas und Glimmer bzw. der Kohleoberfläche ist nicht gegeben. Als weiteres Ergebnis wurde die Adsorptionszeit von zwei Minuten für alle späteren Wachstumsmessungen übernommen. Diese Zeitspanne lieferte auf Kohlefolien und auf Glimmer die am besten auswertbare Filamentdichte.

3.1.4 Ergebnisse aus der EM und SFM

Für die eigentlichen Messungen zur Wachstumskinetik wurden die Vimentinfilamente auf 37° C zwischen 10 Sekunden und 20 Minuten wachsen gelassen. Nach Ablauf der jeweiligen Zeit wurde das Wachstum der Filamente gestoppt (siehe 2.5.3 und 2.4.5) und für EM bzw. SFM vorbereitet. Mit jedem Mikroskop wurden auf diese Weise Bilderserien mit aufeinander folgenden Zeiten aufgenommen. Die Bilderserien zeigen dadurch auszugsweise das zeitabhängige Wachstum der Filamente (siehe Abb. 3.4 und 3.4). Somit konnte nach Auswertung der Filamente auf den Bildern eine mittlere Wachstumsgeschwindigkeit ermittelt werden. Zur Auswertung wurden die Konturlängen der einzelnen Filamente auf den Bildern mit Hilfe der Software ImageJ gemessen. Aus diesen Messergebnissen wurde dann die MFL für den jeweiligen Zeitschritt errechnet. Auf den Bildern kann man sehr gut das fortschreitende Wachstum von kleinen Filamentstücken (u. a. ULFs) zu langen Filamenten verfolgen. Ebenfalls kann man gut erkennen, dass sogar nach 20 Minuten noch eine breite Verteilung verschieden langer Filamente existiert. Vergleicht man die kurzen Wachstumszeiten mit den längeren so kann aber festgestellt werden, dass die Anzahl der kleineren Stücke sichtbar abnimmt, da diese zum Wachstum der Filamente beitragen. Am deutlichsten ist dieser Effekt auf den Bildern, die mit dem SFM aufgenommen wurden (s. Abb. 3.4). Hier wurde im Gegensatz zum EM eine vergleichsweise große Fläche (bis zu 64 μm^2) aufgenommen. Vergleicht man die unterschiedlichen Konzentrationen (**A** und **B** in den Bilderserien) so sieht man auch, dass bei der höheren Konzentration die kleinen Stücke schneller verschwinden.

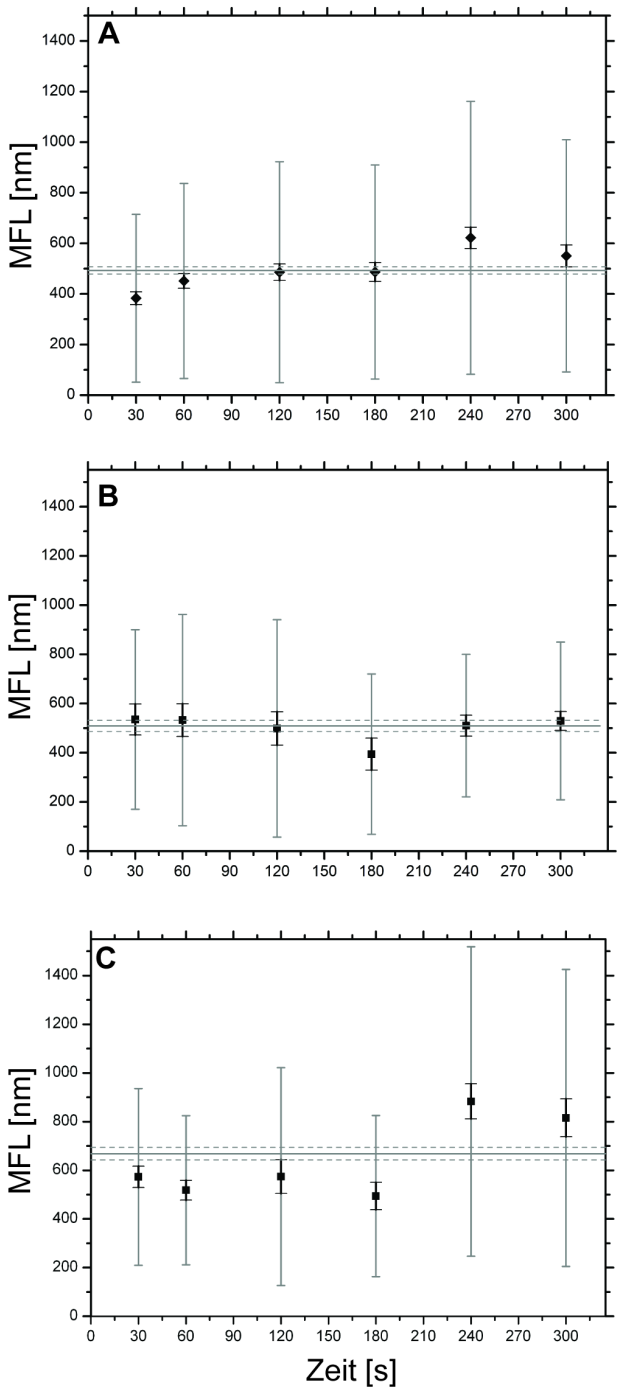

Abbildung 3.2: Gezeigt ist die Abhängigkeit der MFL von der Adsorptionszeit auf verschiedenen Oberflächen. Die Vimentin IF konnten 15 Minuten lang auf 37° C wachsen. Die horizontalen Linien zeigen die aus allen gemessenen Filamenten errechnete MFL für eine Oberfläche an (durchgezogenen graue Linie; **A**. n=3587, **B**. n=1018, **C**. n=1232). Die gestrichelten Linien geben das Vertrauensintervall bei 95% für die jeweilige Messung an. Die Ergebnisse der Einzelmessungen werden durch die Symbole dargestellt. Die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung und das Vertrauensintervall der Einzelmessungen an (graue bzw. schwarze Balken). Die hohe Standardabweichung resultiert aus den starken Längenunterschieden der einzelnen Filamente. **A.** Adsorption der Filamente auf den Kohlefilmbeschichteten Kupfernetzen im EM. Die MFL über alle Messungen beträgt hier 509 nm. **B.** Adsorption der Filamente auf Glimmer im SFM. Die MFL über alle Messungen beträgt hier 492 nm. **C.** Adsorption der Filamente auf Glas im SFM. Die MFL über alle Messungen beträgt hier 668 nm. Die MFL der Einzelmessung variiert zudem stärker als bei **A** & **B**.

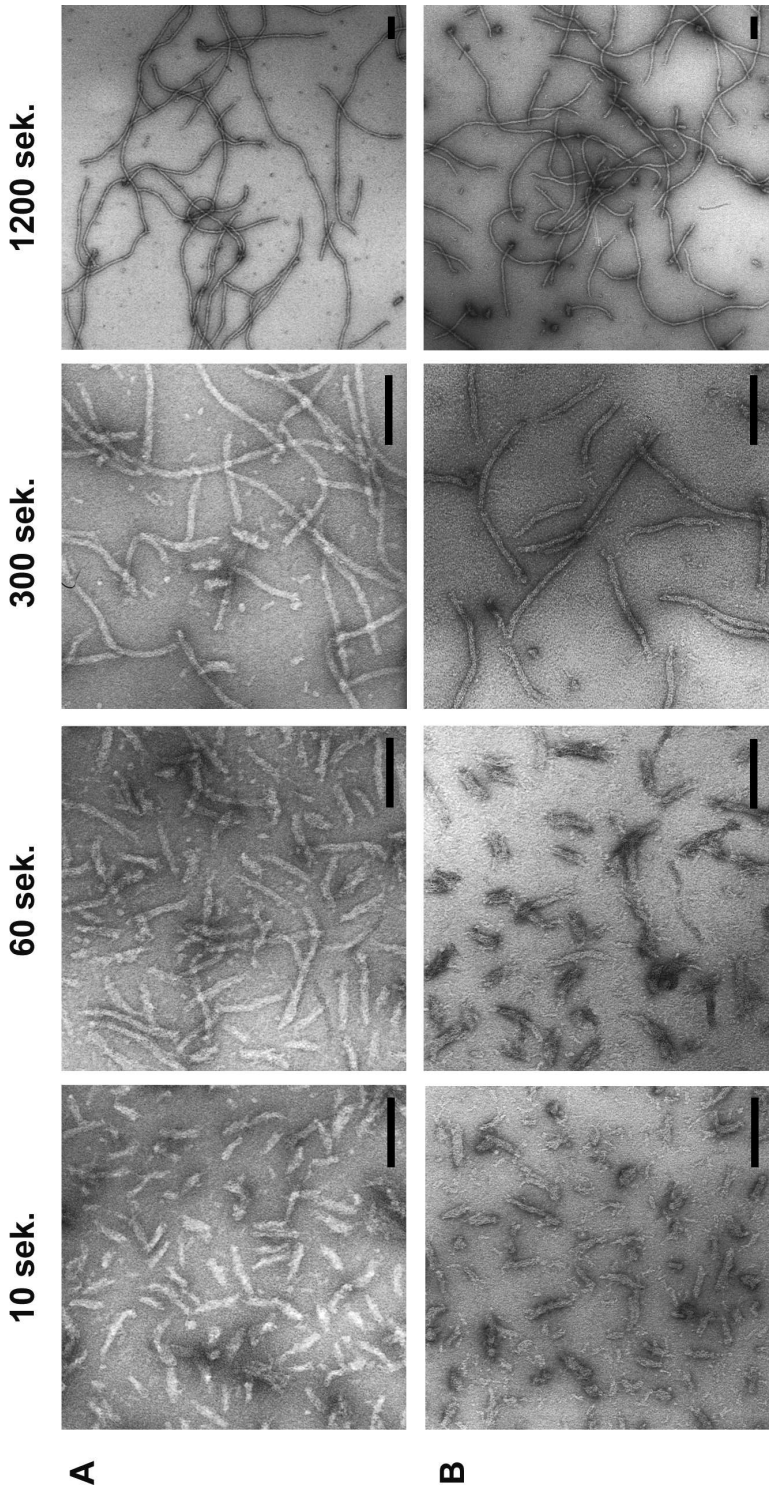

Abbildung 3.3: Die Abbildung zeig einen Auszug aus den Bilderserien der Wachstumsschritte von Vimentin IFs im EM. Alle Aufnahmen wurden auf Kohlefilm-beschichteten Kupfergrids durchgeführt. Es wurden keine unterstützenden Folien (z.B. Formvar) verwendet. Reihe **A** zeigt die Ergebnisse für eine Konzentration von 0.9 µM Vimentin (0.2 mg/ml). Reihe **B** zeigt die Ergebnisse für 0.45 µM (0.1 mg/ml). Auf beiden Bilderserien kann man die Verlängerung der Filamente bei fortschreitender Zeit erkennen. Ebenso sind auch nach 20 Minuten noch verhältnismäßig kurze Filamente sichtbar. Ihr Vorhandensein erklärt die breite Verteilung bei der Auswertung. Die Balken haben eine Länge von 100 nm.

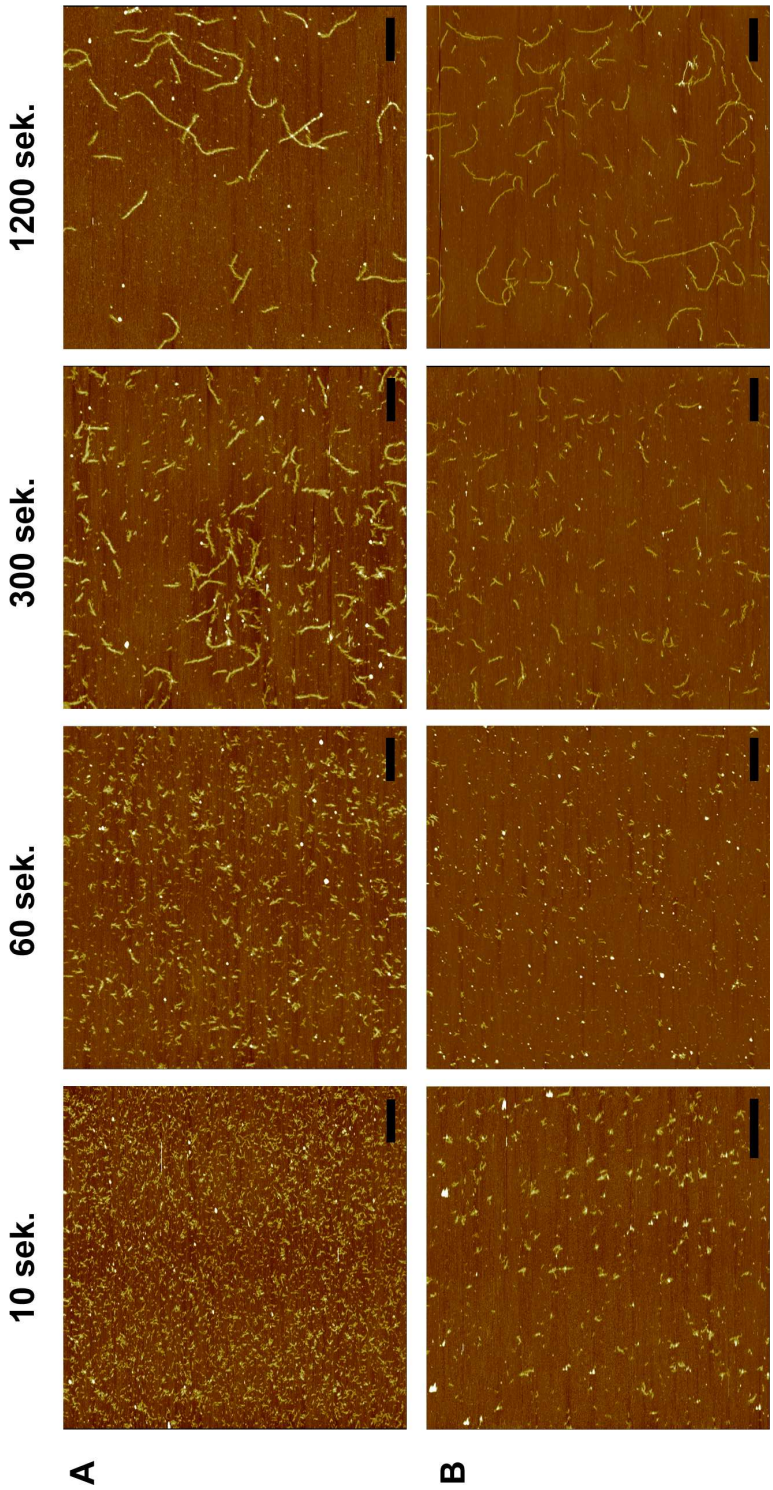

Abbildung 3.4: Die Abbildung zeigt einen Auszug aus den Bilderserien der Wachstumsschritte von Vimentin IFs im SFM. Alle Aufnahmen wurden auf frisch gespaltenem Glimmer in 2 mM P_i-Puffer mit 100 mM KCl durchgeführt. Für die Versuche mit dem SFM waren keine weiteren Fixative oder Kontrastmittel nötig. Reihe **A** zeigt die Ergebnisse für eine Konzentration von 0.9 µM Vimentin (0.2 mg/ml). Reihe **B** zeigt die Ergebnisse für 0.45 µM (0.1 mg/ml). Genau wie mit dem EM kann man hier die Verlängerung der Filamente bei fortschreitender Zeit beobachten. Die Balken sind jeweils 1 µm lang.

Tabelle 3.2 zeigt die Ergebnisse dieser Auswertung für die einzelnen Vimentinkonzentrationen und zu den jeweiligen Zeitschritten sowie die Anzahl der ausgemessenen Filamente. Der angegebene Fehler ist hier das Vertrauensintervall bei 95%. Die Standardabweichung wird bei diesen Messungen sehr groß (vgl. Abb. 3.2), da auch bei langen Wachstumszeiten immer noch vergleichsweise kleine Filamente existieren. Die Angabe des Vertrauensintervall schien daher besser geeignet zur Beurteilung der Ergebnisse.

Tabelle 3.2: Ermittelte MFL nach aufeinander folgenden Wachstumszeiten

	MFL gemessen aus EM-Bildern [nm]				**MFL gemessen aus SFM-Bildern [nm]**			
Zeit [s]	**bei 0.9 µM**	N#	**bei 0.45 µM**	N	**bei 0.9 µM**	N	**bei 0.45 µM**	N
5	***55±2.9**	155	**54±1.1**	422	**-**		**-**	
10	**63±2.1**	400	**65±1.3**	646	**98±3.2**	386	**95±2.5**	370
30	**84±1.9**	503	**76±1.9**	515	**150±4.5**	356	**103±3.7**	353
60	**130±5.9**	356	**112±2.0**	466	**160±4.9**	391	**101±3.6**	352
300	**289±15.7**	528	**172±3.9**	685	**355±2.9**	318	**255±12.8**	459
600	**418±24.7**	436	**233±18.5**	446	**542±38.3**	438	**302±19.2**	393
900	**544±34.7**	603	**-**	-	**488±67.7**	166	**-**	-
1200	**821±41.4**	457	**474±37.1**	359	**961±92.5**	307	**491±34.1**	438

*, Errechnete MFL für diese Wachstumszeit, incl. Vertrauensintervall bei 95%.
#, Anzahl der ausgemessenen Filamente für diese Wachstumszeit.
Ein Stoppen nach 5 Sekunden war für das SFM nicht möglich.

3.1.5 Radiale Kompaktierung der Filamente

Im Modell des Filamentwachstums von Herrmann und Aebi [41] wird zusätzlich beschrieben, dass die IFs während des Längenwachstums ihren Durchmesser verringern. Dieser Prozess wird "Radiale Kompaktierung" genannt. Neu gebildete ULFs und kurze Filamente haben demnach einen größeren Durchmesser als "gereifte" fertige Filamente. Da dieser Effekt mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten überprüft werden konnte, wurden auf den Bilderserien des EM auch die Durchmesser der Filamente ausgemessen. Dazu wurde mit dem Programm ImageJ pro ULF bzw. Filament auf den EM-Bildern an jeweils drei Stellen der Durchmesser ermittelt. Diese Messung wurde nur für die Daten aus dem EM durchgeführt. Bei den Bildern, die mit dem SFM aufgenommen wurden, müsste man jeweils noch die Problematik der Probenverbreiterung (s. Kapitel 2.4.2) berücksichtigen. Dies hätte einen, im Rahmen dieser Arbeit, unverhältnismäßigen Aufwand bedeutet und wurde daher nicht durchgeführt. Die Ergebnisse der Messung zur "Radiale Kompaktierung" sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Sie wurden für die ersten Messpunkte innerhalb der ersten fünf Minuten der Wachstumsserie bei 0.1 mg/ml ermittelt. Von **A** nach **D** (s. Abb. 3.5) nimmt die Wachstumszeit der Filamente zu. Man erkennt deutlich, wie sich das Histogramm hin zu kleineren Filamentdurchmessern verschiebt. Der Literaturwert von ca. 10 nm Durchmesser für ein IF wird hier nach ca. 5 Minuten erreicht. Für die einzelnen Histogramme wurde die folgende Anzahl an Messpunkten verwendet: **A**, n=305, **B**, n=417, **C**, n=238 und **D**, n=209.

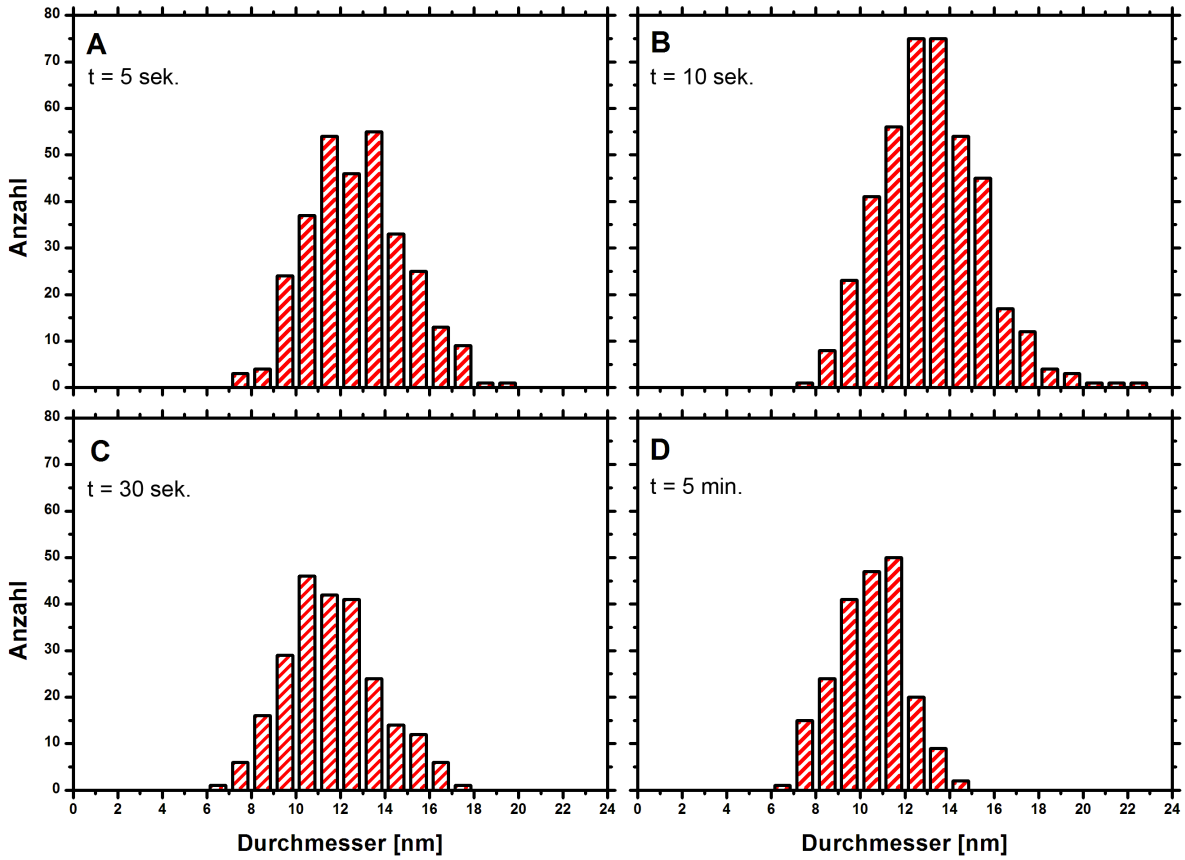

Abbildung 3.5: Die Abbildung zeigt die Abnahme des mittleren Filamentdurchmessers bei fortschreitender Wachstumszeit.

3.2 Modellierung der Vimentin-Wachstumskinetik

Um das Wachstum der Vimentin-IFs quantitativ zu erfassen, wurde eine Serie von Reaktionen zweiter Ordnung benutzt. Diese beschreiben die Bildung eines ULF aus den vorhanden Vorstufen, sowie die Bildung der langen Filamente. Als Grundlage des kinetischen Modells wurden die Beobachtungen von Herrmann und Aebi verwendet [41].

3.2.1 Das einfache Modell

Im ***einfachen Modell*** werden vier verschiedene Reaktanden verwendet um die Bildung von Filamenten zu beschreiben. Zum Zeitpunkt $t = 0$ existiert nur ein Vorrat an löslichen Tetrameren. Jeweils zwei Tetramere können dann zu einem Oktamer aggregieren und zwei Oktamere bilden danach ein Hexadekamer. Als vierter Reaktand kommt das ULF ins Spiel, welches aus zwei Hexadekameren entstehen kann und zugleich das kürzeste Filament beschreibt. Das bedeutet, dass das ***einfache Modell*** nicht zwischen einem Filament und einem ULF unterscheidet. Betrachtet man das 3-Phasen Modell [41], so beschreibt die Bildung des ULF den ersten Schritt, die laterale Assoziation ausgehend von Tetrameren über Oktamere und Hexadekamere zum ULF. Die Möglichkeit, dass sich auf dem Reaktionsweg von Tetramer zum ULF andere Zwischenstufen bilden, beispielsweise drei oder sechs Tetramere, besteht, wurde aber außer Acht gelassen. Würde man alle Möglichkeiten berücksichtigen, müsste der erste Schritt des Modells durch 16 einzelne Reaktionen abgebildet werden. Um das Modell so einfach wie

möglich zu halten, wurde in dieser Arbeit jedoch davon abgesehen alle möglichen Reaktionen in das Modell einfließen zu lassen.
Im Folgenden werden die Variablen und Geschwindigkeitskonstanten aufgelistet, die im ***einfachen Modell*** verwendet worden sind:

- T: Konzentration der Tetramere zum Zeitpunkt t.
- O: Konzentration der Oktamere zum Zeitpunkt t.
- H: Konzentration der Hexadekamere zum Zeitpunkt t.
- F: Konzentration der Filamente zum Zeitpunkt t. Es wird nicht zwischen ULF und Filament unterschieden.
- k_1: Geschwindigkeitskonstante der lateralen Aggregation zwischen T, O und H. Angenommen wird eine Interaktion der Reaktanden vom Typ A_{11}, diese wurde für IF-Proteine in [43] beschrieben.
- k_t: Geschwindigkeitskonstante der longitudinalen Assoziation von einem Tetramer an das Ende eines Filaments
- k_f: Geschwindigkeitskonstante der longitudinalen Assoziation von zwei Filamentenden.

Daraus ergeben sich die folgenden Reaktionen:

$$\frac{dT}{dt} = -2k_1T^2 - k_tTF \tag{3.1}$$

$$\frac{dO}{dt} = k_1T^2 - 2k_1O^2 \tag{3.2}$$

$$\frac{dH}{dt} = k_1O^2 - 2k_1H^2 \tag{3.3}$$

$$\frac{dF}{dt} = k_1H^2 - k_fF^2 \tag{3.4}$$

Die mittlere Länge der Filamente kann mit Hilfe des ***einfachen Modells*** mit der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$L_m(t) = \frac{c_0 - T(t) - 2O(t) - 4H(t)}{d_lF(t)} + corr \tag{3.5}$$

Die Variable L_m repräsentiert die MFL zum Zeitpunkt *t*. c_0 beschreibt die Anfangskonzentration der Vimentintetramere zum Zeitpunkt Null. d_l ist die lineare Dichte an Tetrameren pro µm Filament; in diesem Fall 184 [42]. *corr* ist ein Korrekturfaktor, der die Längenreduktion eines Filaments aufgrund der Zusammenlagerung von ULFs berücksichtigt. Wie schon gezeigt wurde [3], kann eine Reduktion der Filamentlänge um ca. 20 nm während des Wachstums mit dem SFM gemessen werden. Aufgrund dieser Tatsache wurde für den Korrekturfaktor ein Wert von 20 nm angenommen.
Die Gleichung berechnet die mittleren Filamentlängen über die Anzahl der Tetramere, die zu einem Zeitpunkt in Filamente integriert worden sind. Mit Hilfe von dem Programm Berkeley Madonna kann

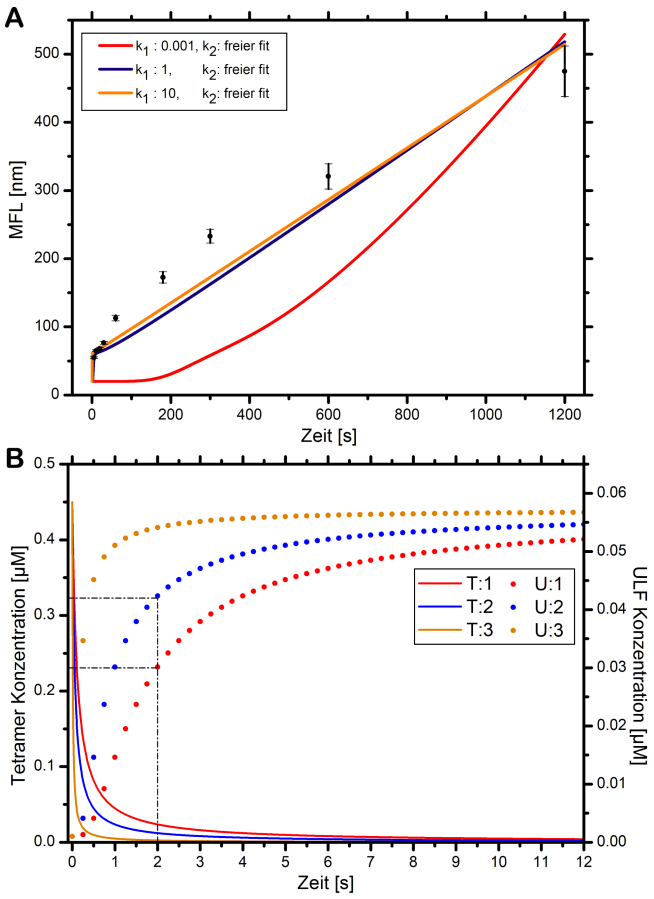

Abbildung 3.6: Die Abbildung zeigt die Möglichkeiten des einfachen Modells. **A.** Zeigt verschiedenen Anpassungen an die Messdaten. Dabei wurden die Werte für k_1 teilweise festgehalten. Es ist deutlich erkennbar, dass das einfache Modell nicht vollständig an die Messdaten angepasst werden kann. Die Aussage aus dem einfachen Modell ist aber, das k_1 mindesten einen Wert von $10^{-7}M^{-1}s^{-1}$annehmen muss. **B.** Zeigt den Verlauf der Tetramer- und ULF-Konzentration (T1-3, U1-3) bei einem k_1 von 10, 20 und 100 *$10^{-7}M^{-1}s^{-1}$(1 bis 3).

mittels der Gleichungen 3.1 bis 3.4 der Konzentrationsverlauf jeder Spezies zum Zeitpunkt t berechnet werden. Da die Anzahl der Tetramere bei $t = 0$ bekannt ist, kann durch einfache Subtraktion der Anzahl der Tetramer in den Zwischenstufen (T, O und H) berechnet werden, wieviele Tetramere schon Filamente gebildet haben (vgl. Gl. 3.5, Zähler). Da die mittlere Anzahl von Tetrameren in einem µm Filament bekannt ist (vgl. [42], 184), kann auf diese Weise die MFL bestimmt werden. Die Anzahl der Tetramere in Filamenten wird durch die Anzahl der Filament dividiert und mit dem Faktor d_l multipliziert (vgl 3.5, Nenner).

Mit dem ***einfachen Modell*** konnten die Messdaten nicht reproduziert werden. Wie man sehr schön in Abbildung 3.6 sehen kann, ist der frühe Anstieg der gemessenen MFL (s. Abb 3.6 **A**, Symbole) nicht mit dem ***einfachen Modell*** zu erklären. Trotzdem konnte mit dem ***einfachen Modell*** eine erste Abschätzung der Reaktionskinetik durchgeführt werden. Dazu wurde ein Satz Messdaten mit verschiedenen Werten für die Geschwindigkeitskonstante k_1 angepasst. k_2 wurde immer frei angepasst. Es ist daher offensichtlich, dass der Wert für k_1 mindestens im Bereich von $10^{-7}M^{-1}s^{-1}$ liegen muss (s. Abb. 3.6 **A**). Ist k_1 kleiner als dieser Wert, werden ULFs nicht schnell genug gebildet um ein ausreichend schnelles Längenwachstum der Filamente zu unterstützen. Als Folge gerät auch das Längenwachstum ins Stocken. Man kann nun auf dieser Grundlage das ***einfachen Modell*** benutzen um nur die Änderung der ULF-Konzentration über die Zeit (s. Abb. 3.6 **B**) zu betrachten ($k_2 = 0$). Dabei stellt man fest, dass bei einem k_1 von $10^{-7}M^{-1}s^{-1}$ 50% der ULFs nach ~ 2 Sekunden gebildet sind. Bei einem k_1 von

$2 * 10^{-7} M^{-1} s^{-1}$sind 90% der ULFs bereits nach ca. zwei Sekunden gebildet und nach 10 Sekunden ist die maximal mögliche ULF-Konzentration erreicht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde zunächst ein Wert von $2 * 10^{-7} M^{-1} s^{-1}$für k_1 in späteren Betrachtungen gewählt. Dieser Wert fügt sich auch gut in frühere Beobachtungen ein, bei denen 10 Sekunden nach dem Start des Filamentwachstum hauptsächlich ULFs als vorherrschende Spezies beschrieben werden. Zusätzlich konnte schon mit Hilfe des ***einfachen Modells*** die Aussage gemacht werden, dass Tetramere wahrscheinlich nicht signifikant zum Wachstum längerer Filamente beitragen. Mehr Aussagen waren mit dem ***einfachen Modell*** nicht mehr möglich. Daher war es nötig die Reaktionsgleichung anzupassen und neue hinzuzufügen. Im nächsten Abschnitt wird daher das ***erweiterte Modell*** eingeführt.

3.2.2 Das erweiterte Modell

Das ***erweiterte Modell*** baut auf dem ***einfachen Modell*** auf. Allerdings wird hier angenommen, dass das kleinste Filament das Produkt aus der longitudinalen Fusion zweier ULFs ist. ULFs und Filamente werden also im Gegensatz zum einfachen Modell getrennt betrachtet. Weiterhin kann im ***erweiterten Modell*** unterschieden werden, auf welche Weise sich die Filamente verlängern. Dies kann durch die Anlagerung von einzelnen Tetrameren oder ULFs geschehen oder durch die Fusion von Enden längerer Filamente. Abbildung 3.7 zeigt den Aufbau des erweiterten Modells als Reaktionschema. Schritt eins bis drei sind dabei identisch mit dem ***einfachen Modell***. Da ab jetzt ULFs und Filamente getrennt betrachtet werden ist es zudem nötig weitere Zustandsvariablen und Geschwindigkeitskonstanten zu definieren. In Abbildung 3.7 sind dies die Schritte vier und fünf. Hier werden die Möglichkeiten definiert, wie das longitudinale Wachstum ablaufen kann. Zusätzlich werden die neuen Geschwindigkeitskonstanten für das Wachstum hier angezeigt (k_2 und k_u).
Die Konzentration der ULFs wird im Folgenden durch die Variable U beschrieben und somit von der Konzentration der Filamente, F, getrennt. Die zusätzlichen Geschwindigkeitskonstanten sind wie folgt definiert:

k_2 : Geschwindigkeitskonstante der longitudinalen Assoziation von zwei ULFs. Angenommen wird eine Interaktion der Reaktanden vom Typ A_{11}, diese wurde für IF-Proteine in [43] beschrieben.

k_u : Geschwindigkeitskonstante der longitudinalen Assoziation von einem ULF an das Ende eines längeren Filaments.

Die Beschreibung der Reaktion zwischen Tetrameren, Oktameren und Hexadekameren (siehe Gl.3.1, 3.2 und 3.3) bleibt auch im ***erweiterten Modell*** dieselbe. Der Ablauf der lateralen Assoziation von Tetrameren bis hin zum ULF ist bei beiden Modellen gleich. Für die Dynamik der ULFs sowie der Filamente und der Berechnung der MFL sind jedoch neue Definitionen nötig. Die Änderung der ULFs und Filamente über die Zeit wird daher folgendermaßen beschrieben:

$$\frac{dU}{dt} = k_1 H^2 - 2k_2 U^2 - k_u UF \tag{3.6}$$

$$\frac{dF}{dt} = k_2 U^2 - k_f F^2 \tag{3.7}$$

Die Gleichung 3.6 beschreibt nun die Konzentration der ULFs über die Zeit. Diese wird positiv beeinflusst durch die Bildung von ULFs aus zwei Hexadekameren. Zur Abnahme der ULF-Konzentration tragen hier zwei Reaktionen bei: Das longitudinale Zusammenwachsen von zwei ULF sowie das Anwachsen an ein längeres Filament. Die Konzentration der Filamente (s. Gl. 3.7) wird jetzt durch das

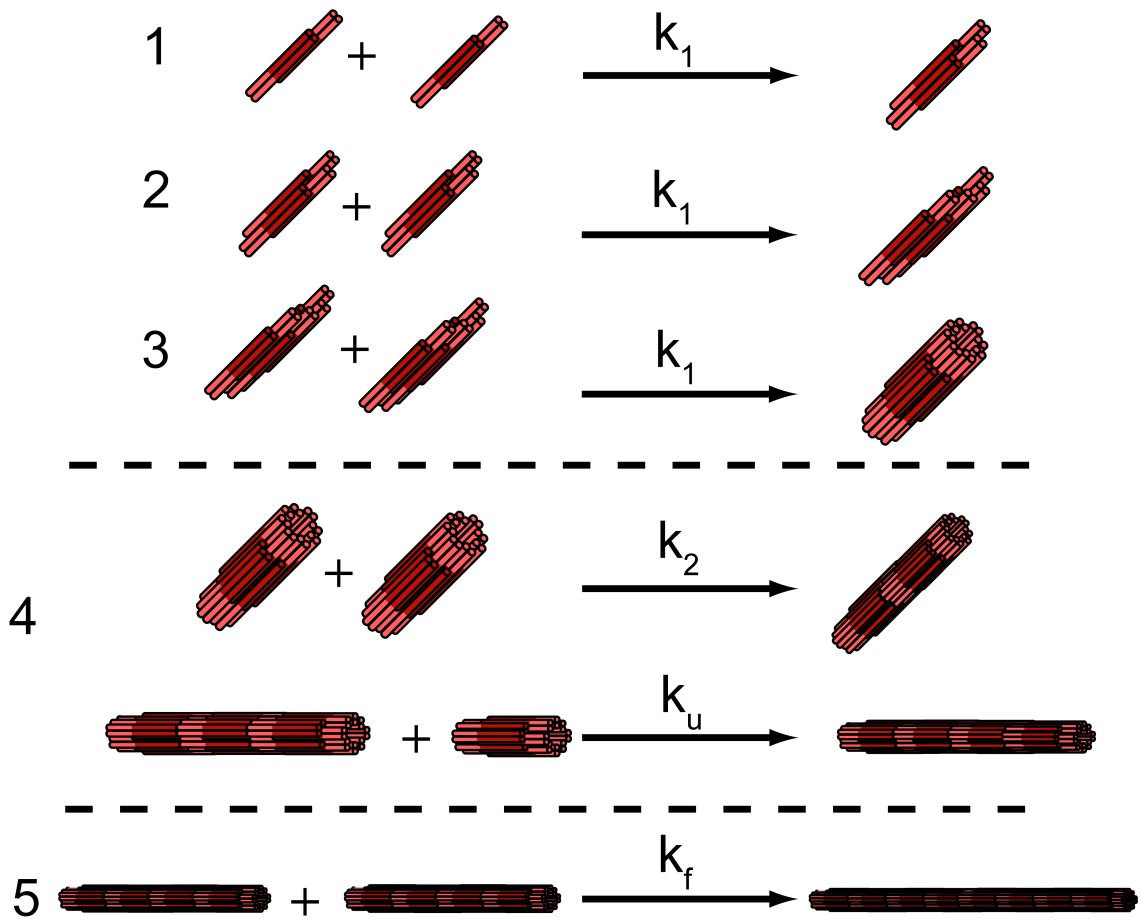

Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des ***erweiterten Modells***. Die Fusion von Tetrameren mit den Enden längerer Filamente wurde zur Vereinfachung weggelassen. Das Filamentwachstum beginnt mit der lateralen Assoziation von (**1**) Tetrameren zu Oktameren gefolgt von (**2**) Hexadekameren hin zu (**3**) ULFs. **4**. Für das erste longitudinale Wachstum gibt es folgende Möglichkeiten (i) zwei ULF wachsen mit den Enden zusammen und bilden ein kurzes Filament. (ii) Ein ULF kann sich longitudinal an ein Filament anlagern. **5**. Die letzte Möglichkeit im ***erweiterten Modell*** beschreibt die End-zu-End Fusion von Enden langer Filamente.

Zusammenwachsen von zwei ULFs oder Filamentenden beeinflusst.
Das ***erweiterte Modell*** bietet die Möglichkeit verschiedene Szenarien des Filamentwachstums durch zuspielen. Indem man eine Geschwindigkeitskonstante gleich Null setzt, kann die dazugehörige Reaktion unterbunden werden. Um die verschiedenen Möglichkeiten für das Filamentwachstum zu berücksichtigen wurden daher die Parameter k_t, k_u und k_f (Tetramer, ULF und Filament End-zu-End Fusion) abwechselnd auf Null gesetzt. Daraus folgt, dass das ***erweiterte Modell*** (Gl. 3.1 - 3.3,3.6 und 3.7) insgesamt $2^3 = 8$ verschiedene Möglichkeiten des Filamentwachstums abwechselnd berücksichtigen kann (siehe Abb. 3.8). Die Möglichkeit, dass sich ein Filament wieder in seine Bestandteile auflösen kann, wurde in diesem Modell noch nicht berücksichtigt, könnte aber später einmal leicht eingebaut werden.

Im ***erweiterten Modell*** werden ULFs und Filamente getrennt berücksichtigt. Daher muss auch die Gleichung zur Berechnung der MFL angepasst werden. Im Modell wird nicht die individuelle Länge der gemessenen Filamente, sondern nur die mittlere Länge berücksichtigt. Daher muss die Berechnung der MFL für das Modell mit der gewichteten mittleren Länge von ULFs und Filamenten erweitert werden.

$$\frac{L_m(t) * F(t) + l_{ULF} * U}{F + U} \tag{3.8}$$

Dabei ist l_{ULF} die Länge eines einzelnen ULFs. Für $L_m(t)$ wird jetzt die Gleichung 3.5 eingesetzt. Nach Umstellung und Erweiterung auf denselben Nenner nimmt die Gleichung folgende Form an.

$$L_m(t) = \frac{c_0 - T(t) - 2O(t) - 4H(t) - 8U(t) + d_l * l_{ULF}U(t)}{d_l(F(t) + U(t))} \tag{3.9}$$

Vor der Anpassung des ***erweiterten Modells*** an die eigentlichen Messdaten wurde das Ergebnis zusätzlich numerisch untersucht. Dazu wurden die schon beschriebenen acht verschieden Szenarien (s. Abb. 3.8) mit demselben Satz an Parametern berechnet. Die Parameter wurden im ersten Schritt teilweise nach den Ergebnissen des ***einfachen Modells*** ausgewählt. So wurde für die Geschwindigkeitskonstante k_1 ein Wert von $2 * 10^{-7} M^{-1} s^{-1}$angenommen (s Abschnitt 3.2.1). Für die Geschwindigkeitskonstanten, die das Zusammenlagern von zwei ULFs bzw. von ULFs an Filamente kontrollieren (k_2 und k_u), wurde im ersten Schritt jeweils ein Wert von 1 angenommen. Ebenso wurde der Anlagerung von Tetrameren an Filamente, k_t, der Wert 1 zugewiesen. Für den Prozess der End-zu-End Fusion längerer Filamente (k_f) wurde ein Wert von 0.1 gewählt. Die End-zu-End Fusion der Filamentenden ist sehr wahrscheinlich langsamer als alle anderen beteiligten Schritte. Aus diesem Grund wurde k_f für die erste Simulation um den Faktor 10 gegenüber den anderen Schritten verlangsamt.
Die Ergebnisse wurden dann mit dem prinzipiellen Verlauf der Messdaten verglichen. Bei diesen Betrachtungen stellte sich heraus, dass immer zwei Szenarien den gleichen Verlauf aufwiesen (s. Abb. 3.9 **A** und Tab. 3.3). Dieses Verhalten ist darauf zurückzuführen, dass Szenario 1 bis 4 die Verlängerung eines Filaments durch das Anlagern von Tetrameren beinhaltet, Szenario 5 bis 8 hingegen nicht. Diese Reaktion scheint das Längenwachstum nicht signifikant zu beeinflussen. Würde das Längenwachstum durch das Anlagern von Tetrameren vorangetrieben, müsste ein deutlicher Unterschied zwischen den Szenarien mit und ohne Tetramerassoziation sichtbar sein. Betrachtet man nun die nächsten Besonderheiten der Szenarien, so konnten wieder zwei sehr unterschiedlich Kurvenverläufe beobachtet werden. Ein Teil der Szenarien (2 und 6 sowie 4 und 8) zeigen einen Kurvenverlauf der innerhalb der ersten 25 Sekunden auf ein Plateau ansteigt (s. Abb. 3.9 **A**.). Im nächsten Schritt wurden dann die verschiedenen Szenarien genauer untersucht. Dadurch sollte gezeigt werden, wie sich die einzelnen Szenarien bei verschiedenen Werten der Geschwindigkeitskonstanten verhalten. Zunächst wurden die Szenarien 2 und 4 sowie 6 und 8 untersucht (s. Abb. 3.9 **A**). Szenario 2 und 6 zeichnet sich dadurch aus, dass das Filamentwachstum nur durch die Anlagerung von ULFs vorangetrieben wird. In Abbildung 3.9 **A** sieht man, dass in diesen Szenarien schnell ein Plateau erreicht wird. Nachdem dieses Plateau erreicht ist (s. Abb. 3.9 grüne Kurve & Symbole) kann kein weiteres Längenwachstum mehr beobachtet werden.
Danach wurden Szenario 2 und 4 genauer untersucht (s. Abb. 3.9 **B**). Szenario 6 und 8 wurden hierbei ausgelassen. Abbildung 3.9 **B** zeigt, wie sich die Szenarien 2 und 4 bei einer Erhöhung der jeweiligen variablen Geschwindigkeitskonstanten verhalten. Betrachtet man Szenario 2, so ist hier k_u die variable Geschwindigkeitskonstante (s. Abb 3.8). Bei einer Erhöhung von k_u werden daher im Durchschnitt längere Filamente gebildet, jedoch ändert sich der prinzipielle Verlauf der Kurve nicht. Es wird immer noch sehr schnell ein Plateau erreicht. Ab diesem Zeitpunkt kann dann kein weiteres longitudinales Filamentwachstum mehr beobachtet werden. Das Längenwachstum wird hier nur durch die Anlagerung von ULFs vorangetrieben. Sind diese ULFs aufgebraucht, kann auch kein weiteres Längenwachstum mehr stattfinden. Dass longitudinales Wachstum alleine durch ULFs vorangetrieben wird, kann damit ausgeschlossen werden.

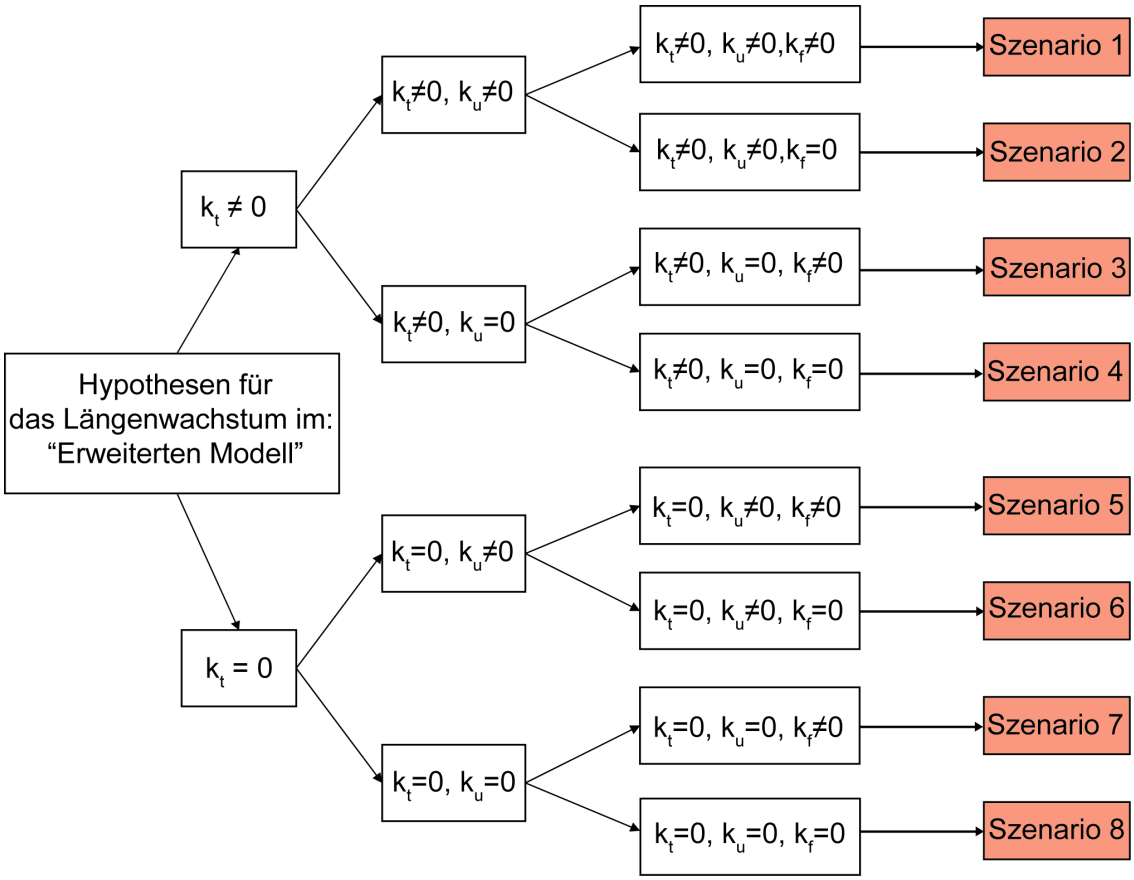

Abbildung 3.8: Die Abbildung stellt die Kombination der Hypothesen zum Filamentwachstum in einem Baumdiagramm dar. Es wurden drei Möglichkeiten in Betracht gezogen: (i) die Anlagerung von Tetrameren bzw. (ii) von ULF und (iii) die Fusion von Enden längerer Filamente. Aus den Kombinationen dieser drei Hypothesen ergeben sich acht verschiedene Szenarien (1-8) für das Filamentwachstum. Für alle acht Szenarien wird angenommen, dass k_1 und k_2 (laterale Aggregation von Tetrameren zu ULFs und die Anlagerung von zwei ULFs zu einem kurzen Filament) positive Werte annehmen. Die Bedeutung der einzelnen k´s findet sich im Text (siehe Gl. 3.1 bis 3.9)

Als nächstes wurde das Szenario 4 betrachtet (s. Abb 3.9 **B**). Hier ist die Anlagerung von Tetrameren die einzige Möglichkeit längere Filamente zu erhalten. Die variable Geschwindigkeitskonstante für das longitudinale Wachstum ist hier also k_t. Es konnte gezeigt werden, dass auch eine signifikante Erhöhung von k_t keine Änderung der Filamentlängen ergibt ($k_t \gg 100$, nicht gezeigt). Die MFL steigt kaum über die Länge eines ULFs hinaus.
Die Szenarien 2 und 6 sowie 4 und 8 konnten daher mit einiger Sicherheit als mögliche Modelle für das Filamentwachstum ausgeschlossen werden. Somit bleiben noch die Szenarien 1 und 5 sowie 3 und 7. Diese werden im Folgenden näher betrachtet. Diese Szenarien erreichen kein Plateau, sondern eine quasi-lineare Wachstums-Phase. Alle vier Szenarien (1 und 5 sowie 3 und 7) erreichen nach 20 Minuten Filamentlängen, die auch bei den Experimenten beobachtet werden konnten (vgl. Tabelle 3.2). Die Szenarien 1 und 5 unterscheiden sich von 3 und 7 dadurch, dass sie durch die Elongation der Filamente durch ULFs und End-zu-End Fusion längere Filamente erlauben. Szenario 3 und 7 hingegen erlaubt nur die End-zu-End Fusion von Filamenten als Mechanismus des Längenwachstums (vgl. Abb. 3.8). In Abbildung 3.9 **C** wurde daher Szenario 3 noch einmal direkt mit Szenario 1 verglichen. Da Szenario 1 und 5 im Verlauf (s. Abb. 3.9 **C**.) den experimentellen Daten schon sehr nahe kommt, wurde nur noch die variable Geschwindigkeitskonstante in Szenario 3 verändert. Damit sollte versucht werden, ob Szenario 3 ähnliche Ergebnisse produziert wie Szenario 1 (s. Abb. 3.9 **C**). Obwohl durch

eine Erhöhung von k_f in Szenario 3 die experimentelle MFL nach 20 Minuten relativ gut reproduziert werden konnten bleibt jedoch ein signifikanter Unterschied zum Szenario 1 und zu dem Verlauf der experimentellen Daten. Innerhalb der ersten Sekunden bis Minuten werden kurze Filamente gebildet. Dadurch können schon nach kurzer Zeit Filamente im Bereich um 150 nm beobachtet werden (vgl. Tabelle 3.2). Dieses Verhalten kann mit den Szenarien 3 und 7 nicht reproduziert werden. Hier werden die Filamente nur durch den Mechanismus der End-zu-End Fusion verlängert. Ohne die Möglichkeit der Anlagerung von ULFs an Filamentenden werden am Anfang nicht so schnell kürzere Filamente gebildet. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist in diesem Regime langsamer. Diese Betrachtung zeigte, dass der Mechanismus der End-zu-End Fusion der Filamente stattfinden muss, um lange Filamente zu erzeugen. Jedoch wird auch der Mechanismus der ULF-Anlagerung an Filamente benötigt. Ohne diesen kann der beobachtete Anstieg der MFL während der ersten Minuten nicht erklärt werden.

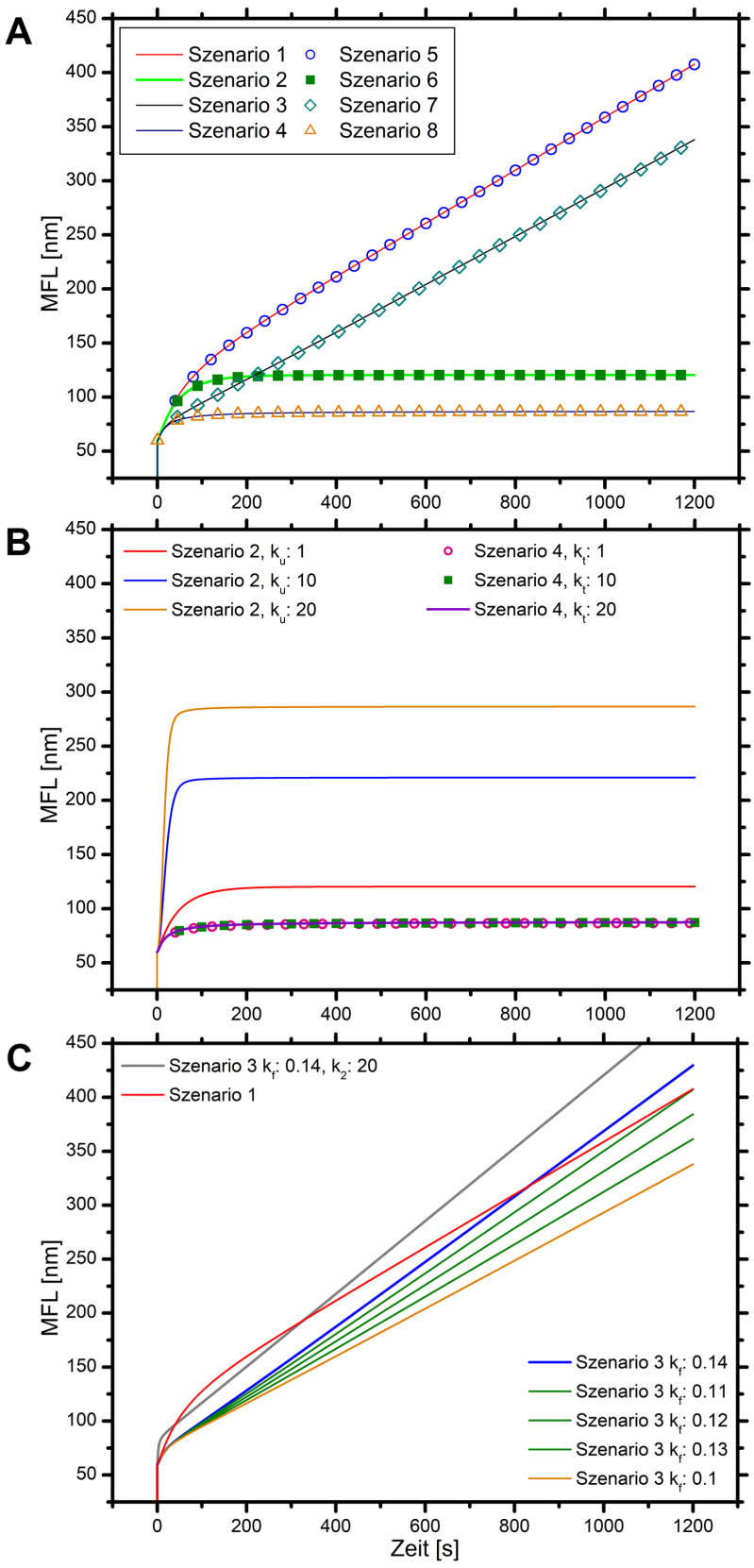

Abbildung 3.9: Die Abbildung zeigt numerische Lösung aller (**A**) sowie spezieller Betrachtungen (**B** & **C**) einzelner Szenarien des ***erweiterten Modells***. **A.** Für die Berechnung wurden die folgenden Parameter eingesetzt, $k_1 = 20$; $k_2 = 1$; $k_t = 1$; $k_u = 1$; $k_f = 0.1$; $d_l = 184$ (alle k´s sind in $[10^{-6}M^{-1}s^{-1}]$). **B & C** zeigen die nähere Betrachtung einzelner Szenarien ob diese die Messdaten erklären könnten. Dabei wurden die jeweiligen Szenarien mit verschiedenen Werten für die variablen Geschwindigkeitskonstanten berechnet (s. Abb. 3.8). Die Beschreibung findet sich im Text.

Die theoretische Betrachtung der acht Szenarien zeigte somit deutlich, dass das Filamentwachstum mit dem Szenario 1 bzw 5 erklärt werden kann. Es muss offensichtlich der Mechanismus der ULF-Anlagerung und End-zu-End Fusion stattfinden. Die Addition von Tetrameren spielt für das Längenwachstum, wie oben gezeigt, keine signifikante Rolle. Aus diesem Grund wurde nur noch das Szenario 5 des ***erweiterten Modells*** an die Messdaten angepasst. Auf diesen Weise wurde auch die Anzahl der anzupassenden Parameter verringert. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus der Anpassung von Szenario 5 an die Messdaten dargestellt.

Tabelle 3.3: Vergleich der acht unterschiedlichen Szenarien aus dem ***erweiterten Modell***.

Ähnliche Dynamik	Hypothese zum Filamentwachstum	Verhalten	Bewertung
Szenario 4 und 8	nur durch Tetramere	kein Wachstum	passt nicht auf die Messdaten
Szenario 2 und 6	Durch ULFs, keine End-zu-End Fusion	erreicht schnell ein Plateau bei kurzen Filamentlängen	passt nicht auf die Messdaten
Szenario 3 und 7	nur End-zu-End Fusion, keine ULFs	lineares Filamentwachstum	passt teilweise, jedoch nicht auf den ersten frühen Anstieg
Szenario 1 und 5	Durch ULF und End-zu-End Fusion	Anfang schnelles, später langsameres Wachstum mit linearen Eigenschaften	Beschreibung der Messdaten ist möglich

3.3 Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten

Um das ***erweiterte Modell*** an die Messwerte aus EM, SFM und den "Stopped-Flow" Experimenten anzupassen, wurde das Programm Berkeley Madonna benutzt. Berkeley Madonna erlaubt den Import von Messwerten aus einer Textdatei. Die jeweiligen Modelle können dann an diese importierten Daten angepasst werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit auszuwählen, welche Parameter für die Anpassung variiert werden sollen. Aufgrund der theoretischen Betrachtungen des Modells (s. Abschnitt 3.2) fiel die Entscheidung, nur das Szenario 5 an die experimentellen Ergebnisse anzupassen. Genau genommen wäre auch Szenario 1 für die Anpassung an die Messdaten geeignet. Der einzige Unterschied zwischen Szenario 1 und 5 ist die Möglichkeit des Filamentwachstums durch Tetramere. Allerdings wurde im Abschnitt 3.2, Abbildung 3.9 dargestellt, dass Tetramere nicht signifikant zum Längenwachstum der Filamente beitragen. Aufgrund dieser Tatsache wurde Szenario 1 im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.
Zusätzlich zu dieser qualitativen Untersuchung aller möglichen Szenarien des ***erweiterten Modells*** wurde der Einfluss der einzelnen Parameter quantitativ charakterisiert. Diese Betrachtung wurde im Rahmen einer Kooperation durchgeführt. Hier wurde eine Sensitivitätsanalyse für die einzelnen Parameter durchgeführt [47]. Ergebnisse dazu finden sich in [49].

3.3.1 Anpassung des Modells an die EM und SFM Ergebnisse

Da Aufgrund der Ergebnisse in Abschnitt 5.1.1 und 5.1.2 die Entscheidung gefallen war, nur das Szenario 5 des erweiterten Modells an die Messdaten anzupassen, werden im Folgenden nur die Resultate dieser Anpassung vorgestellt. Im Wesentlichen wurden für die Anpassung des ***erweiterten Modells***,

Szenario 5, drei Parameter frei variiert. Dies waren die Parameter k_2, k_u und k_f. Die Geschwindigkeitskonstante k_2 kontrolliert die erste longitudinale Reaktion von zwei ULFs zu einem kurzen Filament. k_u und k_f kontrollieren das Längenwachstum der Filamente einerseits über die Anlagerung von ULFs und andererseits über End-zu-End Fusion längerer Filamente. Die Geschwindigkeitskonstante k_1, die das laterale Wachstum von Tetrameren hin zu ULFs kontrolliert, wurde auf einem Wert von $20 * 10^{-6} M^{-1} s^{-1}$festgehalten. Dies ergab sich aus den Betrachtungen der Modelle (s. Abschnitt 5.1.1 und 5.1.2), aus denen hervorging, dass die Mindestgeschwindigkeit des lateralen Wachstums in diesem Bereich liegen muss. Dieser Wert kann auch unabhängig von den Ergebnissen der "Stopped-Flow"-Experimente angenommen werden. Da ein exakter Wert hier keine entscheidende Rolle spielt. Die Reaktion muss lediglich schnell genug ablaufen. Daher wird die genauere Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante k_1 erst im nächsten Abschnitt beschrieben. Das Ergebnis der Anpassung an die Messdaten aus EM und SFM ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Die errechneten Werte für die Parameter sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Ergebnisse der Anpassung mit Szenario 5

Geschwindigkeitskonstante	**EM, Konzentration [µM]**		**SFM, Konzentration [µM]**	
$[1x10^{-6} M^{-1} s^{-1}]$	0.9	0.45	0.9	0.45
k_1	**20**	**20**	**20**	**20**
k_2	**0.3**	**0.32**	**0.59**	**0.28**
k_u	**2.2**	**1.62**	**0.44**	**1.21**
k_f	**0.12**	**0.11**	**0.11**	**0.11**

k_1 wurde während der Anpassung bei $20x10^{-6} M^{-1} s^{-1}$ festgehalten.
siehe Tabelle 3.2 und Abbildung 3.10

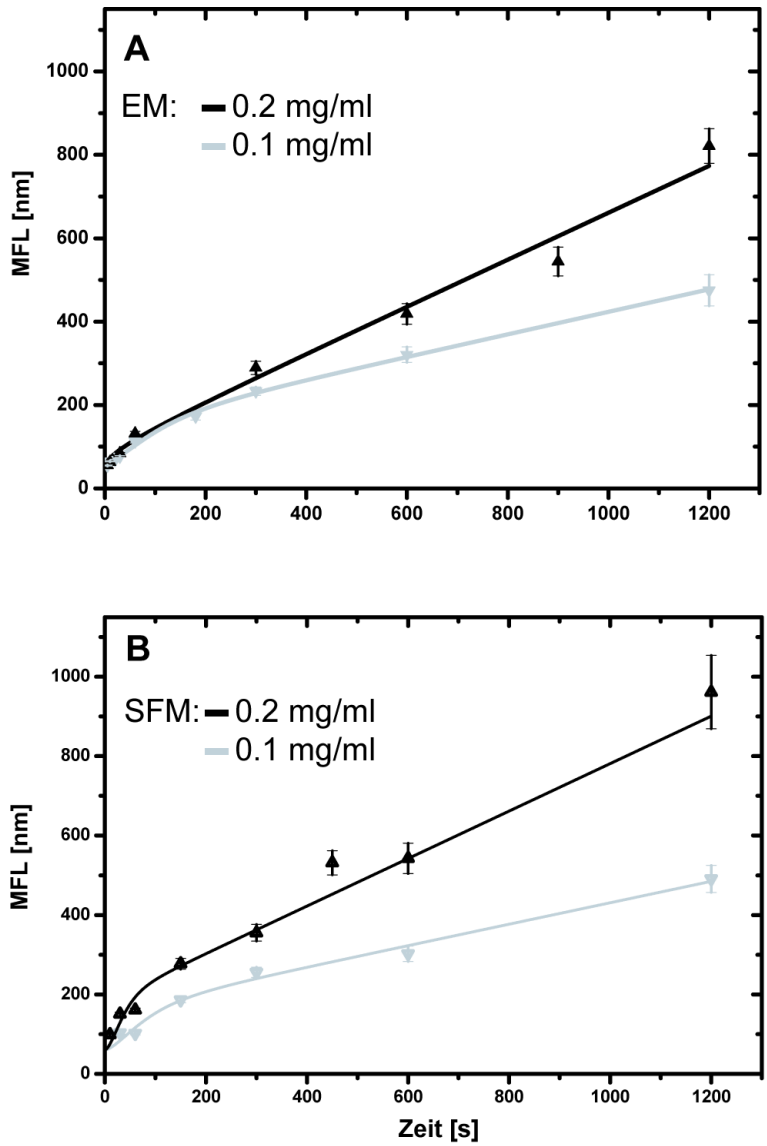

Abbildung 3.10: Die Abbildung zeigt die mathematische Anpassung des Szenarios 5 des ***erweiterten Modells*** an die errechneten MFLs aus den EM und SFM Experimenten. **A.** Zeigt die Anpassung an Daten aus den EM-Experimenten. **B.** Zeigt die Anpassung an Daten aus den SFM-Experimenten.

3.4 Schnelle Kinetik des Vimentinwachstums

In den vorangegangenen Betrachtungen wurde das Filamentwachstum über einen längeren Zeitraum beobachtet und modelliert. Für die erste schnelle Kinetik, die Bildung der ULFs durch laterale Assoziation von Tetrameren, wurde dabei mit Hilfe des ***einfachen Modells*** ein erster Wert für die Geschwindigkeitskonstante abgeschätzt (s. Abschnitt 5.1.1). Es konnte so ein Mindestwert ermittelt werden, bei dem die Bildung der ULFs nicht der limitierende Faktor des Filamentwachstums ist. Dies stellt natürlich nur eine erste Abschätzung dar, welche für die Betrachtung des Längenwachstum über die ersten 20 Minuten durchaus ausreichend war.
Im Folgenden soll nun der Reaktionsmechanismus der ersten schnellen Kinetik der ULF-Bildung näher untersucht werden. Dabei sollte mit Hilfe der "Stopped-Flow"-Technik durch sehr schnelles Vermischen der Reaktionslösungen die Filamentbildung während der ersten Millisekunden bis hin zu einigen Sekunden betrachtet werden. Die Aufnahme dieser schnellen Kinetik ist möglich, da die Sprit-

zen von sehr präzisen Schrittmotoren angetrieben werden. Diese Schrittmotoren werden über einen Computer gesteuert und synchronisiert. Aus den gewonnenen Daten sollten dann auf Basis des ***erweiterten Modells*** die Geschwindigkeitskonstanten für das laterale Wachstum bestimmt werden. Das Längenwachstum wurde an dieser Stelle somit nicht mehr betrachtet. Die Messungen wurden dabei nach dem in Abschnitt 2.7.2 beschriebenen Schema durchgeführt.

3.4.1 Testen des Stopped-Flow-Moduls

Totzeit

Vor der eigentlichen Messung in der Küvette des Stopped-Flow Moduls werden die verschiedenen Lösungen gemischt und durch Teflonschläuche in die Küvette transportiert. Die Zeit, die für das Mischen und den Transport benötigt wird, ist für die Messung verloren und wird als Totzeit bezeichnet. Mittels gut bekannter schneller Reaktionen kann man die Totzeit des Gerätes bestimmen.
Zum Bestimmen der Totzeit wurde die Reduktion von Dichlorophenolindophenol (DCIP) durch Ascorbinsäure (AS) genutzt (siehe Kapitel 2.7). Im Kapitel Material und Methoden unter 2.7.2 sind die Versuchsbedingungen dieser Messungen angegeben.

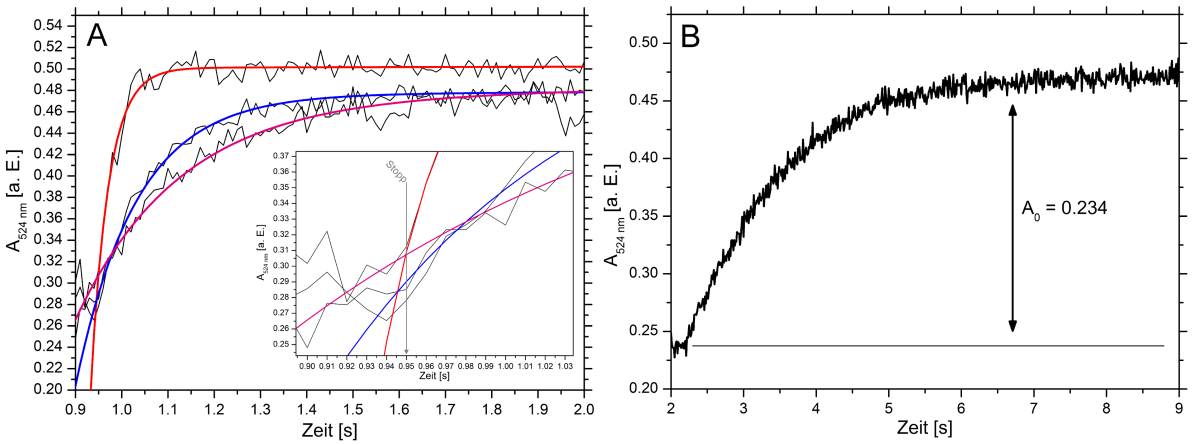

Abbildung 3.11: Die Abbildung zeigt das Ergebnis für die Bestimmung der Totzeit des SFM-3. Gemessen wurde jeweils **A.** die schnelle (bei pH 2) bei AS-Konzentrationen zwischen 0.6 und 2 mM. Die Waschphase und Schussphase wurde bei 0.95 ms beendet. Hier wurde der Fluss gestoppt. **B.** zeigt die langsame Reaktion bei pH 9. Die Änderung in der Absorption bei pH 2.0 wurde für die höchste AS Konzentration bestimmt. Die Anpassung wurde mit dem Programm BioKine 4.10 (Biologic, Frankreich) durchgeführt.

Um die Totzeit zu bestimmen wurde die Reduktion von DCIP einmal bei pH 2.0 und einmal bei pH 9.0 gemessen. Die langsamere Reaktion wurde verwendet um den Verlauf der Reaktion zu kontrollieren (s. Abb. 3.11). Aus beiden Messungen wurde jeweils die Änderung der Adsorption bestimmt. Für die schnelle Reaktion bei pH 2.0 wurde eine Geschwindigkeitskonstante nach dem Schema für Reaktionen pseudo 1. Ordnung bestimmt. Nach der Gleichung 2.19 errechnet sich dann die Totzeit:

$$Totzeit \quad = \quad \frac{1}{20.07s^{-1}} * ln(\frac{0.234}{0.205}) =\sim 6.5 * 10^{-3}s$$

Zusätzlich wurden in der Reaktion bei pH 2 drei verschiedene Konzentrationen AS eingesetzt. Die Schnittpunkte der Kurven geben eine Abschätzung der Totzeit des SFM-3 an (s. Abbildung 3.11 **A**).

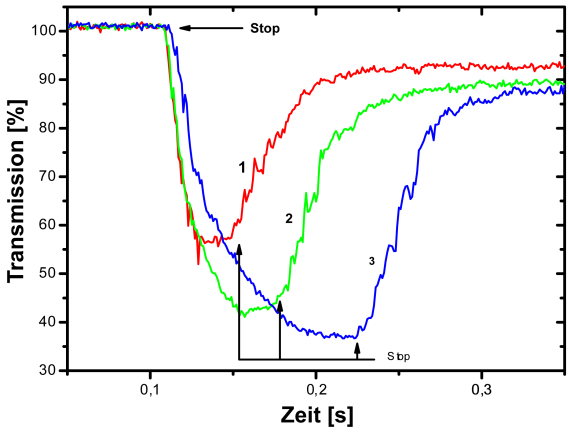

Abbildung 3.12: Die Abbildung zeigt die Messungen zur Qualität des Waschens bei aufeinander folgenden Experimenten (1 - 3) sowie die Qualität des Stopps. Man kann deutlich erkennen, dass jeder Waschschritt erfolgreich ist, da das Messsignal bei jedem Versuch wieder den Ausgangswert von 100 % Lichttransmission erreicht. Weiterhin hat die vorhergehende Reaktion keinen Einfluss auf den prinzipiellen Kurvenverlauf. An den Kurven kann man auch sehr gut sehen, dass der Stopp (Pfeile) sehr schnell ist und dadurch keine Artefakte in der Datenaquisition erzeugt.

Die errechneten Geschwindigkeitskonstanten bei den drei unterschiedlichen Verdünnungen wiesen eine zufriedenstellenden linearen Verlauf auf (nicht gezeigt) und deuteten somit darauf hin, das die Reaktion einer pseudo-ersten Ordnung folgt. Die Schnittpunkte lagen in einem Bereich zwischen einer und 4 ms vor dem eigentlich Stopp. Dieses Ergebnis passt zu den Resultaten der Berechnung der Totzeit auf Grundlagen der Reaktion bei pH 2 und 9 (s. o). Die Totzeit des SFM-3 im vorhandenen Aufbau kann daher in einem Bereich zwischen 4 und 6.5 ms angegeben werden.

Qualität des Waschschrittes

Zwischen jeder Reaktion muss die alte Reaktionslösung aus der Leitung zwischen dem zweiten Mixer und aus der Küvette gespült werden. Durch das Vorgehen, die Testreaktion (Reduktion von DCIP mit AS) nacheinander mit immer größeren Volumina durchzuführen, kann man den Einfluss des "Waschens" darstellen. Weiterhin kann man in diesem Versuch auch den Einfluss des Stopps untersuchen. Beim Stoppen werden die Schrittmotoren angehalten und gleichzeitig wird nach der Beobachtungsküvette ein Ventil geschlossen. Dadurch wird verhindert, dass die Flüssigkeitssäule weiter durch den Schlauch zum Abfallbehälter abfließt. In diesem Testversuch konnte gezeigt werden, dass durch den Stoppvorgang keine Artefakte im Messsignal erzeugt wurden (s. Abb 3.12, Pfeile). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der prinzipielle Verlauf einer Messung auch bei unterschiedlichen Reaktionsvolumina gleich bleibt und das Waschen zwischen den einzelnen Versuchen (s. Abb. 3.12, 1 bis 3) erfolgreich ist. Das Signal geht nach jedem Versuch wieder auf den Anfangswert von 100% Lichttransmission zurück. Der Wert von 100% Lichttransmission ist auf den Puffer geeicht.

Verdünnungsreihe im Stopped-Flow

Durch die hohe Präzision der Schrittmotoren des SFM-3 können sehr leicht, mit jeweils einer Spritzenfüllung, Verdünnungsreihen durchgeführt werden. Im folgenden Testexperiment wurde die Stabilität einer solchen Verdünnungsreihe geprüft. Dazu wurden die Spritzen, wie in Material und Methoden

2.7.2 beschrieben, gefüllt. Während der Messungen wurde das Endvolumen immer konstant gehalten. Nur die Verdünnung der AS wurde variiert. Auf diese Weise war das eingesetzte Volumen von DCIP (V3) immer gleich, genauso wie das von AS und Verdünnungspuffer (V1 + V2). Daher ist das Verhältnis von AS und DCIP immer 1/1 ((V1+V2)/V3). Die Endkonzentration des DCIP im Experiment ist somit 1/2 zur Ausgangskonzentration in der Spritze 3. Aus den Messdaten wurde mit Hilfe

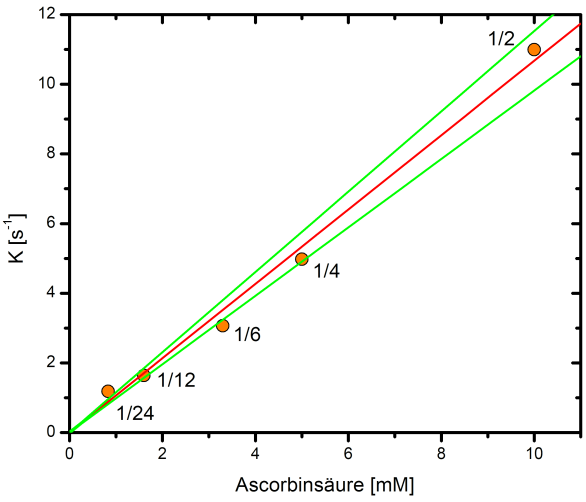

Abbildung 3.13: Die Abbildung zeigt die errechneten Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung für eine Verdünnungsreihe im SFM-3 mit der Testreaktion. Die Verdünnungsreihe wurde direkt im SFM-3 durchgeführt. Die Zahlen an den Messpunkten geben die jeweilige Verdünnungstufe an. Die Endkonzentration an DCIP betrug 50 µM.

der BioKine Software für jede Verdünnung die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung errechnet und gegen die Konzentration von AS aufgetragen (s. Abb. 3.13). Das Ergebnis zeigt eine zufriedenstellende lineare Abhängigkeit der errechneten Geschwindigkeitskonstante von der eingesetzten Konzentration für die Verdünnungsreihe. Laut Herstellerangaben sind noch höhere (bis zu 1/50) Verdünnungstufen problemlos erreichbar. Dies wurde aber in dieser Arbeit nicht mehr getestet, da die oben gezeigten für die nachfolgenden Messungen ausreichend waren.

3.4.2 Überprüfen des Lichstreuungssignals im SFM-3

Um die Bildung der ULFs aus Tetrameren zu verfolgen, wurde die Reaktion mit der "Stopped"-Flow Methode untersucht. Gemessen wurde dabei die Intensität des gestreuten Laserlichts bei einem Winkel von 90°. Wie schon in Abschnitt 2.8 und 2.8.2 beschrieben kann zwischen der Laserlichtstreuung aus der reinen Tetramerlösung und der Lichtstreuung während des Filamentwachstums unterschieden werden. Die Intensität des gestreuten Lichtes wird dabei proportional vom Molekulargewicht der Proteinkomplexe abhängen. Während dieser ersten Sekunden wird ein Anstieg um den achtfachen Wert der Streuintensität gegenüber dem der Tetramere ohne Wachstum erwartet.
Um die Gültigkeit der Lichtstreuung noch einmal zu überprüfen, wurde eine Vimentinmutante eingesetzt. Diese Mutante besteht nur noch aus der zentralen Rod-Domäne. Ihr fehlen die Kopf- und Schwanz Domänen (Head, Tail, s. Abb. 1.1). Diese "Rod-Mutante" liegt im P_i-Puffer als Dimer vor und bildet bei Zugabe von Salz nur Tetramere [56]. Sie zeigt kein weiteres Wachstum. Die Mutante stammt aus Beständen der Arbeitsgruppe Herrmann und wurde mir zur Verfügung gestellt. Eine Messung im SFM-3 mittels Lichtstreuung sollte eine Verdopplung zwischen der Streuintensität der Rod-Dimere und den Tetrameren bei Zugaben von Salz zeigen. Für diese Messung wurde die Vimen-

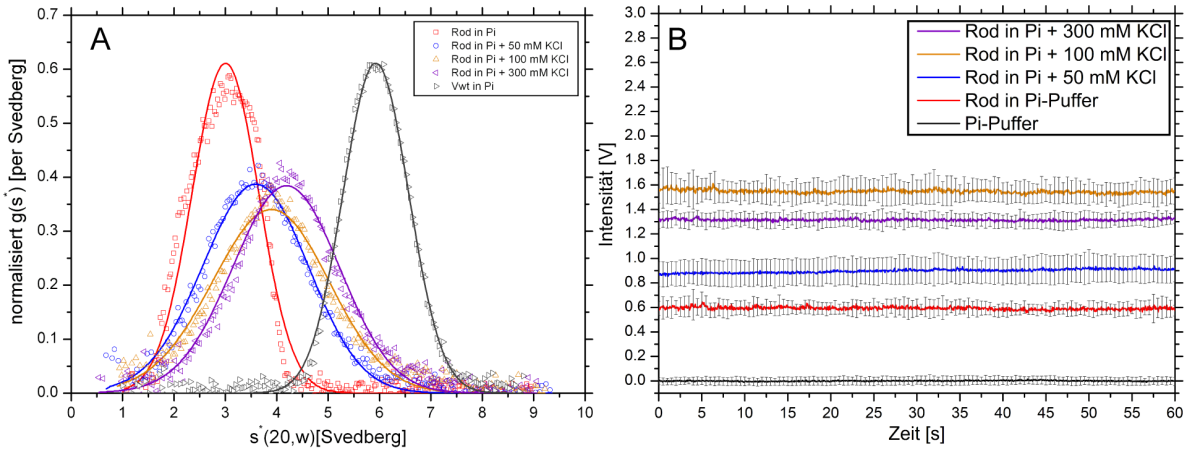

Abbildung 3.14: Die Abbildung zeigt die Messung der Vimentin-Rod Mutante in der AUZ (**A**) und im SFM-3 (**B**) bei 37° C. **A**, Bei der Messung in der AUZ kann man die Verschiebung des Sedimentationskoeffizenten beobachten, der auf die Interaktion der Dimer hin zu Tetrameren zurückzuführen ist. Die ermittelten Werte decken sich mit früheren Beobachtungen [56]. Die Ergebnisse sind aus je 10 Messungen ermittelt. **B**, Hier sind die Streuintensitäten der jeweiligen Lösungen bei 90° im SFM-3 dargestellt. Auch hier ist der Anstieg der Streuintensität zwischen Dimeren und Tetrameren sichtbar. Eine Verdoppelung der Streuintensität kann für höhere Salzkonzentrationen, bei der Tetramere vorherrschen, bestätigt werden (s. Tab. 3.6). Die dargestellten Kurven sind Mittelwerte aus min. 10 Messungen.

tin Rod-Mutante gleichzeitig mit der AUZ und dem SFM-3 vermessen. Mit der AUZ konnte gezeigt werden, dass die Vimentin-Rod Mutante in P_i-Puffer ohne Salz als Dimer vorliegt und bei steigender Salzkonzentration Tetramere bildet (s Abb. 3.14 **A**). Als Kontrolle wurde noch Vimentin wild typ im P_i-Puffer mitgemessen. In [56] wurden Vimentin Mutanten und Vimentin wild typ in verschiedenen Puffern mit der AUZ charakterisiert. Für die Messungen in der AUZ wurde eine Proteinkonzentration von 0.2 mg/ml eingesetzt. Die hier ermittelten Sedimentationskoeffizienten (s. Tab. 3.5) für die einzelnen Messungen stimmen gut mit den veröffentlichten Werten für Dimere und Tetramere überein [56]. Ab einer Salzkonzentration von 100 mM KCl im P_i-Puffer scheint die vorherrschende Spezies der Vimentin-Rod Mutante ein Tetramer zu sein.
Zeitgleich mit den Messungen in der AUZ wurde die Vimentin-Rod Mutante im SFM-3 gemessen (Konzentration: 0.2 mg/ml). Es sollte überprüft werden, ob tatsächlich ein Signalanstieg um das Doppelte zwischen Dimer und Tetramer gemessen werden kann. In Abbildung 3.14 **B** ist das Ergebniss dieser Messung dargestellt. Auf das schnelle Mischen der Lösungen wurde hier verzichtet. Die jeweilige Probe wurde direkt in die Messküvette gegeben. Der P_i-Puffer ohne Protein wurde auf eine Streuintensität von 1 V eingestellt. Diese Grundstreuung wurden von allen Messsignalen abgezogen. Eine Messung dauerte jeweils eine Minute. In Tabelle 3.6 sind die Mittelwerte der Messungen dargestellt. Bei einer Salzkonzentration von 300 mM KCl im P_i-Puffer, bei der die Vimentin-Rod Mutante laut den Ergebnissen der AUZ-Messung hauptsächlich als Tetramer vorliegt, wird eine Verdopplung des Messsignales am genauesten erreicht.

3.4.3 Ergebnisse der Kinetikmessung im SFM-3

Um die erste schnelle Kinetik der Filamentbildung im "Stopped-Flow" zu messen wurde das Wachstum bei verschiedenen Proteinkonzentrationen initiiert (s. Tabelle 2.6). Weiterhin wurde für jede eingesetzte Konzentration die Lichtstreuung der Tetramere alleine ohne Wachstum ermittelt. Diese Tetramergrundlinie war für die erste Betrachtung der Messungen sowie für die spätere Anpassung des Modells wichtig.

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Messung des Vimentin-Rods in der AUZ

Probe **Puffer**	**Rod** P_i	**Rod** P_i**, 50 mM KCl**	**Rod** P_i**, 100 mM KCl**	**Rod** P_i**, 300 mM KCl**	**Vwt** P_i
Parameter	Spezies 1	Spezies 1	Spezies 1	Spezies 1	Spezies 1
$C\,[OD]$	0.975 (0.0132)	0.961 (0.007)	0.931 (0.01)	0.975 (0.01)	0.980 (0.007)
$s\,[S]$	3.053 (0.010)	3.701 (0.008)	4.013 (0.013)	4.274 (0.010)	5.937 (0.006)
$M\,[kDa]$	107.76 (3.57)	51.75 (0.91)	45.2 (1.16)	56.35 (1.18)	226.86 (4.54)

c, gemessene optische Dichte für die jeweilige Spezie
Für die Sedimentationsläufe wurde die Intensitätsänderung bei 230 nm ermittelt.
s, errechneter Sedimentationskoeffizient
M, apparentes Molekulargewicht in kDa, ermittelt aus dem mittleren s-Wert
und der Bandenverbreiterung unter Annahme einer homogenen Spezies.

Tabelle 3.6: Verhältnis der Streuintensitäten zwischen Rod-Dimer- und Tetramer.

[KCl]:Probe	**Rod in P_i+ KCl** **Signal [V]**	**Rod in P_i** **Signal [V]**	**Verhältnis**
50 mM : Rod	0.89826 (0.11)	0.59296 (0.012)	1.51487 (0.091)
100 mM : Rod	1.54705 (0.098)	0.59296 (0.012)	2.60902 (0.080)
300 mM : Rod	1.31456 (0.062)	0.59296(0.012)	2.21693 (0.044)

Die Zahlen in Klammer geben die Standardabweichung an.

Die Schusssequenz sowie die eingesetzten Volumina pro Spritze des "Stopped-Flow" sind in Abschnitt 2.8.3 dargestellt. Die Datenpunkte wurden mit einem Abstand von 20 und 50 ms erfasst. Die in Abbildung 3.15 dargestellten Kurven wurden aus jeweils drei aufeinander folgenden Messungen gemittelt. Das "Stopped-Flow"- Modul wurde für die Messungen mit einem Thermostat auf 37° C temperiert.

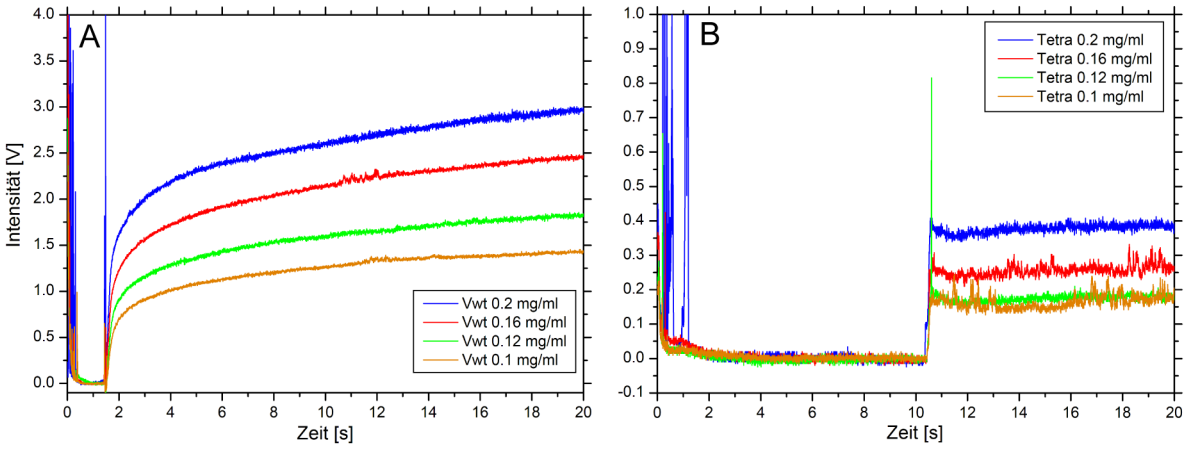

Abbildung 3.15: Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Messungen mit dem "Stopped-Flow" bei den vier unterschiedlichen Konzentrationen. Jede hier dargestellte farbige Kurve stellt den Mittelwert aus mindestens drei aufeinander folgenden Messungen dar. **A** zeigt die gemessenen Kinetiken während des Filamentwachstums an. In **B** sind die gemessenen Streuintensitäten der Tetramerlösung bei der jeweiligen Proteinkonzentration dargestellt. Die Pause zwischen Waschschritt und der Messung der Tetramerlösung (**B**, 0 bis 10 s) war hier bewusst länger gewählt um zu sehen, ob das Messsignal nach dem Waschen immer wieder den Grundwert erreicht und dieser keinen Schwankungen unterliegt. Die Standardabweichung der Messungen ist hier der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt. Sie ist aber vergleichbar mit den Messungen zum Vimentin-Rod (s. Abbildung 3.14 **B**).

Um die Kurven vergleichen zu können wurde mit der Streuung des Puffers (2 mM Phosphat, pH 7.5) korrigiert. Alle Kurven wurden zudem mit ihrer Pufferstreuung während der Waschphase auf 0 V

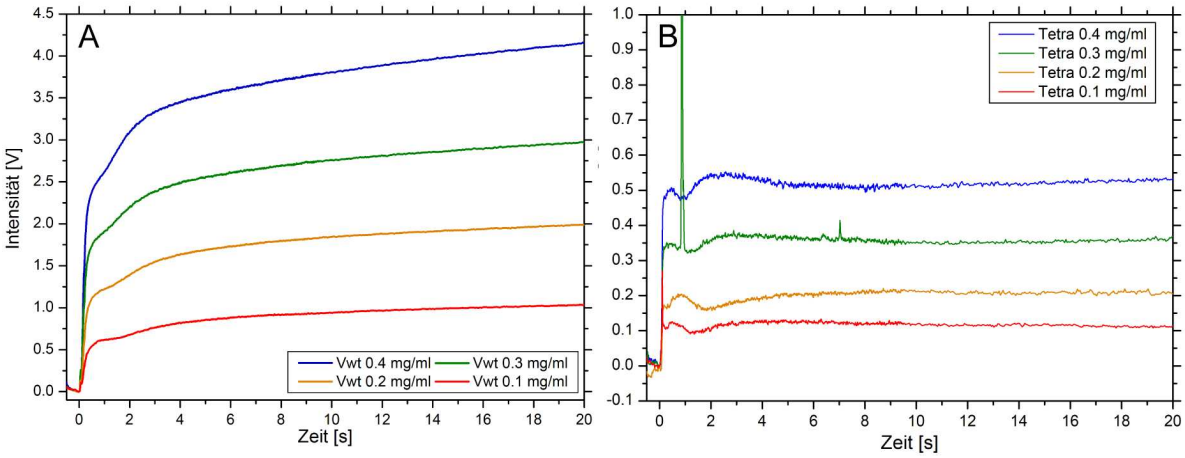

Abbildung 3.16: Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Messungen mit dem "Stopped-Flow" für höhere Konzentrationen. Jede der hier dargestellten farbigen Kurve stellt den Mittelwert aus zehn (**A**) bzw. fünf (**B**) aufeinander folgenden Messungen dar. Mit ***Vwt*** werden hier die Wachstumskurven bezeichnet; mit ***Tetra*** die gemessene Tetramerstreuung ohne Wachstum. **A** zeigt die gemessenen Kinetiken während des Filamentwachstums an. Während der ersten zwei Sekunden ist eine scheinbare Verlangsamung der Reaktion zu erkennen. Die gemessene Intensität steigt in einem kurzen Bereich nicht nennenswert an. In **B** sind die gemessenen Streuintensitäten der Tetramerlösung bei der jeweiligen Proteinkonzentration dargestellt. Der Bereich der Standardabweichung ist hier der Übersichtlichkeit wegen weggelassen worden, ist aber vergleichbar mit der in Abbildung 3.14 gezeigten. Die Messungen der Teramerlösungen zeigen eine starke Schwankung im Bereich der ersten zwei Sekunden. Diese Schwankung korreliert sehr genau mit dem Zeitraum der scheinbaren Verlangsamung in den Wachstumskurven.

gesetzt. Da bei diesen Messungen der relative Anstieg der gemessenen Intensität und nicht absolute Werte eine entscheidende Rolle spielten, war dieses Vorgehen zulässig.
Die Abbildung 3.15 **A** zeigt die Ergebnisse der Messungen bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Die hier dargestellten Kurven entsprechen jeweils drei gemittelten Einzelmessungen. In Abbildung 3.15 **B** ist die Streuintensität der reinen Tetramerlösung ohne Filamentwachstum gegeben. Der Zeitraum bis zur eigentlichen Messung wurde an dieser Stelle absichtlich länger (~10 Sekunden) gewählt. Dadurch sollte gezeigt werden, dass das Signal nach dem Waschen keinen großen Schwankungen unterworfen ist. Durch einen Vergleich der Streuintensitäten zwischen Tetrameren und der eigentlichen Kinetik kann gezeigt werden, dass der Anstieg der Intensität des gestreuten Laserlichts tatsächlich der in Abschnitt 2.8 beschriebenen Annahme folgt. Die Verhältnisse zwischen Tetramerstreuung und der entsprechenden Streuintensität in der Kinetikmessung sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Ein Anstieg um ungefähr einen Faktor von Acht kann dabei für jede Proteinkonzentration festgestellt werden.
Der Versuch wurde mit einer höheren Proteinkonzentration in der Spritze wiederholt. Das Ziel war dabei die Messung des Vimentinwachstums über eine Konzentration von 0.2 mg/ml hinaus. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Diese Messung zeigte einen zu den in Abbildung 3.15 dargestellten Kurven unterschiedlichen Kurvenverlauf. In Abbildung 3.16 **A** sind die Messungen während des Wachstums von Vimentin dargestellt. Man kann innerhalb der ersten zwei Sekunden eine deutliche Verlangsamung des Wachstums erkennen. Auf der anderen Seite wurde auch bei der Messung der reinen Tetramerlösung (siehe Abbildung 3.16 **B**) eine Schwankung der Streuintensität während der ersten zwei Sekunden registriert. Weiterhin stimmen die Streuintensitäten bei gleicher Proteinkonzentration zwischen den unterschiedlichen Messtagen nicht direkt überein. Dies hängt aber von der jeweiligen Einstellung des Photomultipliers ab. Die Vorspannung des Photomulitiplier wurde immer so gewählt, dass die gemessene Intensität des P_i-Puffers gleich war. Der Wert der Vorspannung schwankt dabei zwischen -600 und -700 V. Man kann daher davon ausgehen, dass

Tabelle 3.7: Verhältnis der Streuintensitäten während des Vimentinwachstums

Verhältnis von	Messung 1 (s. Abb. 3.15)	Messung 2 (s. Abb. 3.16)
Vwt: Tetra (0.4 mg/ml)§		8.24
Vwt:Tetra (0.3 mg/ml)		8.05
Vwt:Tetra (0.2 mg/ml)	7.8	9.5
Vwt:Tetra (0.16 mg/ml)	9.5	
Vwt:Tetra (0.12 mg/ml)	10.2	
Vwt:Tetra (0.1 mg/ml)	8.4	8.4

Die Streuintensität der wachsenden Filamente wurde nach 20 s ermittelt.
§: Vwt, Streuintensität von Vimentin nach 20 s
bzw. Tetra, Mittelwert Tetramerstreuintensität

die leichten Unterschiede in der Streuintensität der Proteinlösung bei verschiedenen Messungen vom unterschiedlichen Ausgangswert der Vorspannung des Photomulitplier herrühren. Die Abflachung der Messkurve innerhalb der ersten zwei Sekunden kann so allerdings nicht erklärt werden. Um diese offensichtliche Abweichung der Messungen näher zu untersuchen wurde im nächsten Versuch der Einfluss der Flussgeschwindigkeit der Reaktionslösungen auf die Messung untersucht.

3.4.4 Einfluss der Flussgeschwindigkeit auf das Messergebnis

Aufgrund des unterschiedlichen Kurvenverlaufs in den vorangegangenen Messungen (siehe Abb. 3.15 und 3.16) wurde in einem Testexperiment der Einfluss der Flussgeschwindigkeit auf die eigentliche Messung überprüft. Im "Stopped-Flow"-Gerät ist es möglich die Geschwindigkeit, mit der die Flüssigkeitssäule durch die Zuleitungen und den Mixer in die Beobachtungsküvette gedrückt wird, zu beeinflussen. Die Spritzen des "Stopped-Flow" wurden so programmiert, dass sie in einer vorgegebenen Zeit ein festgelegtes Volumen Lösung durch die Zuleitungen drücken. Daraus ergaben sich die verschiedenen Flussgeschwindigkeiten. Die Schuss-Sequenz und die Beladung der Spritzen sind in Tabelle 3.8 angegeben. Es wurden insgesamt sechs unterschiedliche Messungen durchgeführt. Die Schusszeiten wurden dabei zwischen 50 und 1600 ms eingestellt (50, 100, 200, 400, 800 und 1600 ms). Daraus ergaben sich Flussgeschwindigkeiten zwischen 4 ml/s bei einer Schussgeschwindigkeit von 50 ms und 0.125 ml/s bei 1600 ms Schussgeschwindigkeit. In Abbildung 3.17 ist das Ergebnis dieser Messung dargestellt. Die dargestellten Kurven sind jeweils aus fünf aufeinander folgenden Messungen gemittelt.
Das Ergebnis bestätigt den Einfluss der Schussgeschwindigkeit auf die eigentliche Messung. Vergleicht man die Ergebnisse bei hohen Geschwindigkeiten (vgl. Abbildung 3.17 **A**, blaue Kurve), so erkennt man keine "Verzögerung" des Wachstums mehr. Auch bei der Messung der entsprechenden Tetramerkonzentration werden während der ersten Sekunden keine Schwankungen in der Streuintesität mehr verzeichnet (Abbildung 3.17 **B**, blaue Kurve). Wird die Geschwindigkeit verlangsamt, so kann man deutlich die Bildung der scheinbaren Wachstumsverzögerung erkennen. Ebenso tauchen die Schwankungen in der Streuintensität der Tetramelösung innerhalb der ersten Sekunden bei diesen Messungen wieder auf (vgl. Abbildung3.17 **A** & **B**, rote und grüne Kurve). Bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.25 ml/s kann man deutlich die Bildung eines Plateaus während des laufenden Schusses erkennen. Hier halten sich das laterale Wachstum und die Flussgeschwindigkeit die Waage (vgl. Abbildung 3.17 **A**, grüne Kurve ab 0.5 sek.). Nach dem Stoppen steigt die Streuintensiät nochmals an und man erhält wieder eine abflachende Kurve. Bei der letzten Messung mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.125 ml/s verschwindet das Plateau während des Schusses. Hier kann man das Wachstum schon in der langsam fließenden Flüssigkeitssäule nachweisen (vgl. Abbildung 3.17 **A**, Magenta Kur-

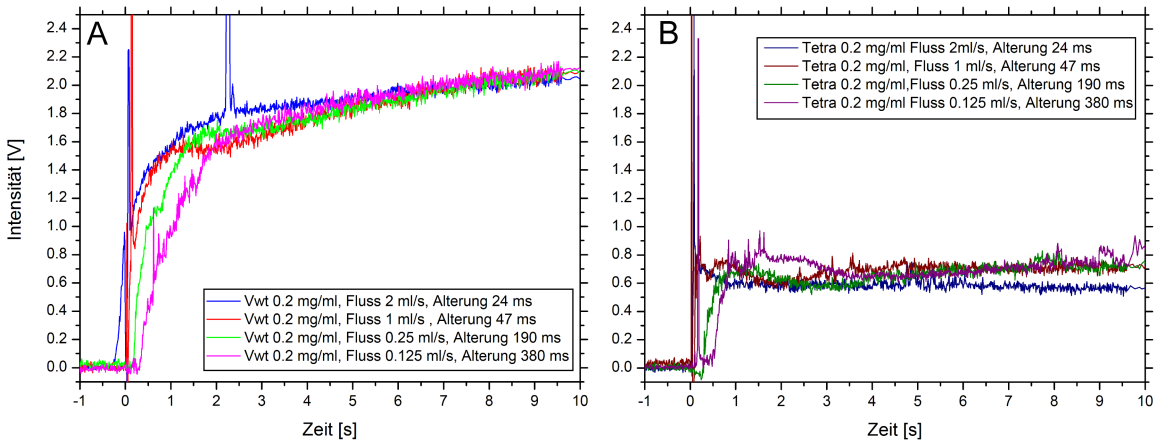

Abbildung 3.17: Die Abbildung zeigt die Messergebnisse für verschiedene Flussgeschwindigkeiten zwischen 2 ml/s und 0.125 ml/s. Die Messungen für die Geschwindigkeiten von 50 und 400 ms (4 ml/s und 0.5 ml/s) sind hier weggelassen. Bei 4 ml/s Flussgeschwindigkeit war keine sinnvolle Messung mehr möglich. Zwischen 1 und 0.5 ml/s war kein deutlicher Unterschied erkennbar, weswegen die Messung mit 0.5 ml/s der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt ist.

Tabelle 3.8: Schuss-Sequenz für die Messung des Einflusses der Flussgeschwindigkeit.

Zeit [ms]	**200**	**200**	**5000**	**50 - 1600***
Spritze 1 [µl]#				100
Spritze 2 [µl]	200			100
Spritze 3 [µl]		200		

#: Spritze 1: Vimentin mit 0.4 mg/ml, Spritze 2: 2x Assemblypuffer (2 mM Phosphat, pH 7.5, mit 200 mM KCl), Spritze 3: P_i-Puffer (2 mM Phosphat, pH 7.5).
*: Der eigentliche Schuss wurde mit sechs unterschiedlichen Schussgeschwindigkeiten durchgeführt: 50, 100, 200, 400, 800 und 1600 ms. Dies ergab Flussgeschwindigkeiten zwischen 4 und 0.125 ml/s.

ve zwischen 0 und 2 sek.). Nach dem Stopp sieht man hier auch kein Abflachen der Kurve mehr. Diese Geschwindigkeit ist zu langsam um das erste schnelle laterale Wachstum sinnvoll zu verfolgen. An dem Punkt an dem die Flüssigkeitssäule gestoppt wird ist diese Messung schon am Rande des interessanten Bereichs bzw. über die laterale Wachstumsphase hinaus. Bei der Messung der Tetramere wird allerdings weiterhin während der ersten Sekunden eine starke Schwankung des Streulichtsignals festgestellt.
Für die Messungen zum Wachstum von Vimentin sollten daher Flussgeschwindigkeiten in einem Bereich zwischen 1 ml/s und 4 ml/s gewählt werden.

3.4.5 Modellierung der Stopped-Flow Kinetik

Im folgenden Abschnitt soll auf die Modifikationen am ***erweiterten Modell*** eingegangen werden. Diese Änderungen betrafen hauptsächlich den Ausschluss der Gleichungen für das Längenwachstum sowie die Einführung des Formalismus zur Berechnung der Lichtintensität. In Anlehnung an das in Kapitel 5.1.2 eingeführte ***erweiterte Modell*** wurde der folgende Formalismus verwendet.

$$\frac{dT}{dt} = -2k_1T^2 \tag{3.10}$$

$$\frac{dO}{dt} = k_1T^2 - 2k_2O^2 \tag{3.11}$$

$$\frac{dH}{dt} = k_2 O^2 - 2k_3 H^2 \tag{3.12}$$

$$\frac{dU}{dt} = k_3 H^2 - 2k_4 U^2 \tag{3.13}$$

$$\frac{dU2}{dt} = k_4 U^2 \tag{3.14}$$

Die Streuintensität der einzelnen Zwischenstufen wurde in Abhängigkeit der Streuintensität der Tetramerlösung berechnet. Dazu wurde die gemessene mittlere Streuintesität der jeweiligen Tetramerkonzentration mit dem entsprechenden Faktor (2 für ein Oktamer, 4 für ein Hexadecamer, 8 für ein ULF) multipliziert. Die endgültige Streuintensität für einen bestimmten Zeitpunkt ergibt sich dann aus der folgenden Gleichung (beispielhaft für ein ULF):

$$Intensitaet_{ULF} = \frac{U}{(\frac{c_0}{8})} * (8 * Intensitaet_{Tetramer}) \tag{3.15}$$

Hier ist c_0 die Anfangskonzentration an Vimentin-Tetrameren in µM und $Intensitaet_{Tetramer}$ die gemessene mittlere Streuintensität der Tetramerlösung (vgl. Abb 3.15 **B**) für die jeweilige Vimentinkonzentration. Die Gesamtintensität ist dann die Summe der nach Gleichung 3.15 berechneten Streuintensitäten aller gebildeten Zwischenstufen zum jeweiligen Zeitpunkt. Das vollständige Modell als Eingabeskript für das Programm Berkeley Madonna befindet sich im Anhang (siehe Abschnitt 5.1.3)

3.4.6 Anpassen des Modells an die Stopped-Flow Messdaten

Aufgrund der Ergebnisse zur Flussgeschwindigkeit für die Messungen an Vimentinlösungen (vgl. Abschnitt 3.4.4) wurden nur die Messungen mit dem Modell angepasst, die kein Abflachen des Messsignals während der ersten 1-3 Sekunden aufwiesen.

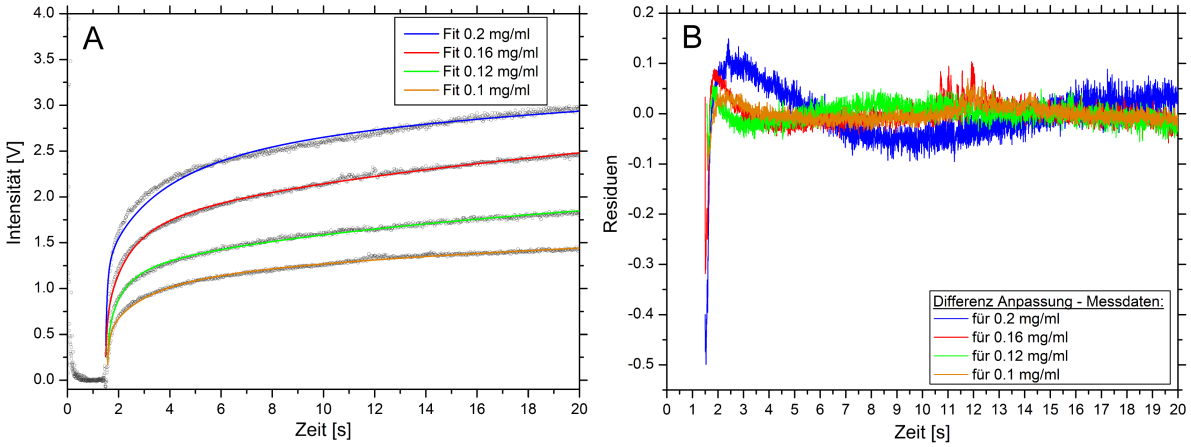

Abbildung 3.18: Die Abbildung zeigt die Anpassung des Modells an die Messdaten aus den Stopped-Flow Experimenten (vgl Abbildung 3.15). **A** zeigt die Anpassung des Modells an die gemessenen Streuintensitäten aus dem "Stopped-Flow". Der Verlauf der Messkurve ist dabei reproduzierbar. **B**. Hier sind die Residuen aufgetragen. Sie zeigen die Differenz der mit dem Modell berechneten Kurve zu den eigentlichen Messdaten auf. Bei einer perfekten Übereinstimmung würde die Kurve für jeden Zeitpunkt den Wert Null annehmen.

Während der Anpassung stellte sich heraus, dass die Parameter für die ersten zwei Assoziationsreaktionen, Tetramere zu Oktameren und Oktamere zu Hexadekameren, kaum voneinander abwichen. Für die endgültigen Anpassungen wurden daher die Parameter k_1 und k_2 (vgl. 3.4.5) gleichgesetzt. Der Wertebereich für die nunmehr drei Parameter ($k_1 = k_2$, k_3, & k_4) wurde bei der Anpassung nicht festgehalten.
In Abbildung 3.18 **A** sind die Ergebnisse der Anpassung des Modells an die gemessenen Wachstumskurven dargestellt. Dem gegenüber zeigt Abbildung 3.18 **B** die Differenz zwischen dem Modell und den eigentlichen Messdaten für die einzelnen Anpassungen. Die Beschreibung des lateralen Wachstums mit den drei Reaktionsschritten des in dieser Arbeit entwickelten Modells kann den Kurvenverlauf hinreichend erklären. Allerdings wird bei einer Konzentration von 0.2 mg/ml Vimentin die Genauigkeit des Modell geringer. Dieser Umstand wird am Ende der Arbeit (s. Diskussion, Kapitel 4.3) eingehend beleuchtet. Darüber hinaus bestätigte das Ergebnis die Aussagen des **einfachen** und **erweiterten Modells** im Hinblick auf die abgeschätzte Geschwindigkeitskonstante von $20x10^{-6}M^{-1}s^{-1}$. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Geschwindigkeit der lateralen Assoziationschritte nicht gleich ist, und das schon während der ersten 20 Sekunden eine Verlängerung der ULFs stattfindet (s. Tab. 3.9, k_4). Die errechneten Geschwindigkeitskonstanten decken sich daher gut mit den vorhergehenden Resultaten der Wachstumskinetik über 20 Minuten.

Tabelle 3.9: Anpassung des Modells (vgl. 3.4.5) an die gemessenen "Stopped-Flow"-Daten .

Proteinkonz.	**Parameter**			
[mg/ml], ([µM])	$k_1 = k_2\,[1x10^{-6}M^{-1}s^{-1}]$	$k_3\,[1x10^{-6}M^{-1}s^{-1}]$	$k_4\,[1x10^{-6}M^{-1}s^{-1}]$	χ^2
0.2, (0.94)	34.01	0.73	0.01	0.057
0.16, (0.75)	32.52	2.97	0.11	0.031
0.12, (0.56)	70.49	6.29	0.21	0.018
0.1, (0.47)	51.01	2.32	0.10	0.017

Kapitel 4

Diskussion

Wo bist Du zwischen zwei Gedanken

4.1 Untersuchung der Wachstumskinetik

Die Selbstorganisation (engl. "self-assembly") ist ein allgemein gültiges Prinzip, dass man in allen Bereichen der Biologie finden kann, sei es auf der molekularen oder makroskopischen Ebene. Mit dem Begriff Selbstorganisation wird ein Prozess beschrieben, der aus vorhandenen, ungeordneten Komponenten definierte Strukturen und Muster erzeugt. Die in dieser Arbeit untersuchte Wachstumskinetik von Vimentin zu langen IFs ist ein Beispiel für eine intermolekulare Selbstorganisation. Die Vorstufen der Filamente, das Protein Vimentin, kann ohne weitere Einwirkung oder Steuerung von außen lange Filamente bilden. Obwohl in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf der Beobachtung der Vimentin-Wachstumskinetik lag, ist die Fähigkeit zur Selbstorganisation allen IF-Typen gemein.
Der Prozess der molekularen Selbstorganisation ist in Zellen ein wichtiges Funktionsmerkmal. So besitzen alle drei Komponenten (AF, MT und IFs) des Zytoskeletts die Fähigkeit zur Bildung langer Filamente aus den jeweiligen Vorstufen (Aktin, Tubilin und z.B. Vimentin). Ebenso ist der Aufbau der Zellmembranen aus Lipiden ein Beispiel molekularer Selbstorganisation. Die für neurodegenrative Krankheiten verantwortlich gemachten Prionen sind ebenfalls ein Beispiel für die Bildung von geordneten Strukturen aus Vorstufen. Hier bilden falsch gefaltete Proteine unlösliche amyloide Fasern aus, die z.B. eine Krankheit wie BSE oder CJD auslösen [22].
Auch für die Nanotechnologie ist das Verstehen von selbstorganisierenden Molekülstrukturen ein wichtiger Aspekt. Diese Methode wird gemeinhin als Ansatz gesehen kleinste Strukturen von Grund auf herzustellen und nicht auf Grundlage einer Schablone, die aus einem bestehenden Material herausgearbeitet wird ("Bottom-Up"-Ansatz).
Ein wichtiger Teil zum Verständnis des selbstorganisierenden Wachstums ist die genaue Kenntnis der Kinetik dieses Prozesses. Die Ziele dieser Arbeit waren, die Wachstumskinetik für IFs zu untersuchen und zu quantifizieren. Für das Wachstum von Aktinfilamenten und Mikrotubuli wurden die Reaktionskinetiken einschließlich der Geschwindigkeitskonstanten schon abgeleitet [70, 69, 68, 103, 102, 99].

Am Beispiel des Typ III IFs Vimentin wurde damit begonnen, dies auch für IFs zu etablieren. Die Untersuchung der Wachstumskinetik von Vimentin ging einher mit der Entwicklung eines Modells, mit dessen Hilfe numerische Simulationen mit den gewonnen Ergebnissen verglichen werden konnten. Um die Messdaten mit den Modellrechnungen vergleichen zu können, musste vorher überprüft werden, ob die Messungen mit dem EM und SFM vergleichbare Daten liefern. Für die Entwicklung des kinetischen Modells wurde zuerst ein möglichst einfacher Reaktionsverlauf auf Grundlage früherer Beschreibungen der Wachstumskinetik [41] angenommen. Da dieses Modell die Messergebnisse nicht hinreichend genau beschreiben konnte, wurde eine erweiterte Version des Modells erstellt. Mit dieser Modellbeschreibung konnten zusätzlich verschiedene Szenarien des Filamentlängenwachstums simuliert werden. Schließlich wurde auf diese Weise ein Szenario gefunden, welches das Längenwachstum am besten beschreiben konnte.
Diese Betrachtungen konnten allerdings nicht die Reaktionskinetik des Filamentwachstum während der ersten Millisekunden bis hin zu einigen Sekunden verfolgen. Diese Lücke wurde mit Hilfe von Versuchen mit der "Stopped-Flow"-Technik geschlossen. Im Folgenden werden die oben aufgeführten Punkte der Wachstumsmessung mit dem EM und SFM sowie die Problematik der Messungen mit dem "Stopped-Flow" noch einmal eingehend diskutiert.

4.2 EM- und SFM-Kinetikmessungen

Das Längenwachstum der Vimentinfilamente über einen Zeitraum von einigen Sekunden bis hin zu mehreren Minuten wurde durch Analyse der Filamentpopulationen mit Hilfe von Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie über einen Zeitraum von mehreren Minuten verfolgt. Dafür wurden die Filamente entweder fixiert (EM) oder in der verwendeten Pufferlösung auf eine Oberfläche aufgebracht (SFM). EM wurde hier gewählt, da die Vimentinfilamente in hoher Auflösung untersucht werden können. Allerdings müssen die Proben im EM unter nicht nativen Bedingungen betrachtet werden. Auf der anderen Seite sind die IFs an sich schon gut mit dem EM charakterisiert (siehe z.B. [44]). Daher konnte mit Hilfe der Bilder aus dem EM auch die Qualität der Vimentinfilamente beurteilt werden. Dem gegenüber wurden die Filamente mittels Rasterkraftmikroskopie (SFM) aufgenommen. Im Unterschied zum EM konnten dabei die hoch aufgelöste Aufnahmen direkt im verwendeten Phosphatpuffer, unter quasi-nativen Bedingungen, durchgeführt werden. Durch den Vergleich der Bilder aus beiden Mikroskopen konnte gezeigt werden, dass beide Techniken miteinander vergleichbare Ergebnisse liefern (siehe auch Abbildung 3.3 und 3.4). Dies wurde auch schon an anderer Stelle bestätigt [55]. Auf Grundlage der EM- und SFM-Aufnahmen wurde die Flexibilität der Filamente berechnet.

Verhalten der IFs auf verschiedenen Oberflächen

Beim Wachstum der Vimentinfilamente *in vitro* entsteht eine Verteilung unterschiedlicher Filamentlängen. Durch das Aufbringen der Lösung, auf die verschiedenen Trägeroberflächen der Mikroskope, wurde diese sichtbar gemacht. Das Wachstum von filamentförmigen Polymeren mit Hilfe der Längenverteilung nach verschiedenen Zeitschritten zu untersuchen, wurde schon an anderer Stelle vorgeschlagen [12]. Briehl et al. bestätigten ebenfalls, dass mit dieser Technik Aussagen über den Wachstumsmechanismus möglich sind.
Da hier keine anderen Messungen als Vergleich herangezogen werden konnten, musste getestet werden, ob sich die gemessene Verteilung bei unterschiedlichen Adsorptionszeiten auf verschiedenen Oberflächen ändert. Zusätzlich wurde überprüft wie groß der Unterschied zwischen den verschiedenen Oberflächen im EM (Kohlefolie) und SFM (Glimmer, Glas) ist. Die Ergebnisse, die in Kapitel 3.1.3

und Abbildung 3.2 dargestellt sind, belegen, dass die per EM und SFM gemessenen Filamentlängen vergleichbar sind. Allerdings zeigten die Ergebnisse, dass die Glasoberfläche keine gute Wahl für eine Kinetikmessung ist. Außerdem spielt die Adsorptionszeit eine entscheidende Rolle. Lässt man die Filamente zu kurz an die Oberfläche adsorbieren, werden im folgenden Waschschritt viele längere Filamente wieder abgewaschen und bei der anschließenden Auswertung wird eine falsche Verteilung gemessen. Zudem wird dadurch der aus der Verteilung ermittelte Wert für die mittlere Länge der Filament zu kurz werden. Auf der anderen Seite erhält man bei zu großen Adsorptionszeiten eine mit Filamenten überladene Oberfläche, so dass eine sinnvolle Auswertung der einzelnen Konturlängen nicht mehr möglich ist. Die in Kapitel 3.1.3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich bei längeren Adsorptionszeiten der aus den gemessenen Verteilungen ermittelte Wert für die mittleren Filamentlängen nicht mehr signifikant ändert. Allerdings konnten Adsorptionszeiten oberhalb von fünf Minuten nicht ausgewertet werden: Hier lagen die Filamente zu dicht übereinander und die Konturlängen der einzelnen Filamente waren nicht sauber zu bestimmen. Nach zwei Minuten Adsorptionszeit dagegen ist eine Auswertung noch sehr gut möglich. Hier waren genügend Filamente auf den Oberflächen, so dass eine sinnvolle Auswertung möglich war.
Mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest [104] konnte bestätigt werden, dass die gemessenen Verteilungen auf Kohlefilmen (EM) und Glimmer (SFM) innerhalb eines Signifikanzniveaus von 0.05 nicht voneinander abweichen. Beide Methoden liefern also beim Einsatz dieser Oberflächen vergleichbare Ergebnisse (siehe Kapitel 3.1.3). Die Ergebnisse der Glasoberfläche waren nicht mit den anderen Ergebnissen vergleichbar. Dies konnte ebenso mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest bestätigt werden (siehe Kapitel 3.1.3).
Der Grund dafür, dass die Ergebnisse auf der Glasoberfläche von denen auf Glimmer und auf Kohlefilmen abweichen, liegt sehr wahrscheinlich in der Vorbereitung dieser Oberfläche. Um eine saubere Glasoberfläche für das SFM zu erhalten, wurde diese in Caro'-scher Säure gereinigt (siehe Abschnitt 2.4.3). Diese Behandlung führt zu einer sauberen und hydrophilen Glasoberfläche, die für die Untersuchung der Filamente im SFM prinzipiell geeignet ist. Die hydrophilen Eigenschaften der Glasoberfläche nehmen aber sehr schnell ab und beeinflussen die Adsorptionskinetik der Filamente. Um eine solche Glasoberfläche in Kinetikmessungen wie sie hier durchgeführt wurden einzusetzen, müsste sichergestellt sein, dass die Reinigung immer kurz vor der eigentlichen Messung stattfindet. Da dies aber einen unverhältnismäßig hohen Aufwand darstellt, wurde auf weitere Messungen auf der Glasoberfläche für die Wachstumskinetik verzichtet.

Modellierung der Wachstumskinetik

Im ersten Schritt wurde versucht, ein möglichst einfaches Modell für das Filamentwachstum anzunehmen, das die vorherigen Ergebnisse berücksichtigt [41]. Daher wurde für die Wachstumskinetik ein Reaktionschema entwickelt, das zuerst einmal das laterale Wachstum von ULFs beschreibt (siehe Abschnitt 3.2.1). Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge konnte gezeigt werden, dass Vimentin nach der Dialyse in dem verwendeten Phosphatpuffer in Form von Tetrameren vorliegt (siehe Abschnitt 3.1.1). Aus diesem Grund wurde bei der Modellierung von Tetrameren als Startmolekül ausgegangen. In dem Modell bilden dann jeweils zwei Tetramere ein Oktamer, zwei Oktamere ein Hexadekamer und zwei Hexadekamere ein ULF. Diese drei Reaktionen sind die einfachste Variante, um von Tetrameren zu ULFs zu kommen. Natürlich wäre jede andere Kombination von Vorstufen denkbar, z. B. könnten auch Tetramere mit Oktameren reagieren. Würden alle möglichen Kombinationen in ein Modell überführt werden, müssten für die Bildung von ULFs aus Tetrameren 16 verschiedene Reaktionen beschrieben werden. Ein Modell mit alleine 16 verschiedenen Reaktionsgleichungen für das

laterale Wachstum und der entsprechenden Anzahl an Geschwindigkeitskonstanten wäre an dieser Stelle nicht sinnvoll. Es wäre nicht möglich, ernsthafte Aussagen über die Wachstumskinetik zu treffen, da zu viele verschiedene Parameter das Ergebnis beeinflussen würden.
Im ersten Ansatz wurde daher die Bildung von ULFs mit drei Reaktionen beschrieben. Weiterhin wurde kein Unterschied zwischen ULFs und Filamenten gemacht (vgl. *"**einfaches Modell**"* Abschnitt 5.1.1). Es stellte sich heraus, dass eine Beschreibung der Messdaten mit diesem Ansatz nicht möglich war. Allerdings konnte eine Untergrenze für die Geschwindigkeitskonstante des lateralen Wachstums vom Tetramer zum ULF abgeschätzt werden. Diese müssen mindestens in einem Bereich von $k_1 > 10^{-6} M^{-1} s^{-1}$ liegen (siehe Abb. 3.6).
Um das beobachtete mittlere Längenwachstum der Filamente besser zu beschreiben wurde das Modell um zwei Reaktionen erweitert (vgl. *"**erweitertes Modell**"*, Abschnitt 5.1.2). Filamente und ULFs werden dadurch getrennt betrachtet. Im ***erweiterten Modell*** besteht die Möglichkeit, dass Filamente durch die Anlagerung von ULFs, Tetrameren, oder durch End-zu-End-Fusion von langen Filamenten weiter wachsen können. Mit diesem Ansatz war es möglich verschiedene Szenarien des Längenwachstums zu überprüfen. Auf diese Weise konnten die Szenarien, die überhaupt keine Ähnlichkeit mit den gemessenen MFL zeigten, ausgeschlossen werden. Gleichzeitig konnten auf diese Weise auch diejenigen Mechanismen des Filamentlängenwachstums ausfindig gemacht werden, die wesentlich zum Filamentwachstum beitragen bzw. keinen signifikanten Einfluss darauf haben sowie welche Reaktionen zur Erklärung der gemessenen Ergebnisse notwendig sind. Insgesamt stellte sich heraus, dass sowohl die Anlagerung von ULFs als auch die End-zu-End-Fusion längerer Filamente benötigt wird, um die Messdaten beschreiben zu können. Tetramere alleine können nicht die treibende Kraft hinter dem longitudinale Wachstum der Vimentinfilamente sein. In Abschnitt 5.1.2 sind die Ergebnisse der verschiedenen Szenarien dargestellt.
Szenario 5 konnte die Messdaten am besten beschreiben. Durch Anpassung des Modells an die Daten wurden erste Geschwindigkeitskonstanten für das Längenwachstum ermittelt (s. Abschnitt 3.3).
Mit Hilfe der Mikroskope und der Präparationstechniken ist eine zeitliche Auflösung im Bereich von einigen Sekunden möglich. Die erste Kinetik des lateralen Wachstums ist schneller, daher wurde sie mit der "Stopped-Flow"-Methode bestimmt. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert. Eine abschließende Diskussion des kinetischen Modells für das Filamentwachstum schließt daran an (siehe Abschnitt 4.4)

4.3 Stoppped-Flow-Kinetiken

Im "Stopped-Flow"-Gerät (SFM-3) können durch schrittmotorgetriebene Spritzen die Reaktionslösungen sehr schnell vermischt und die Reaktion im Millisekundenbereich optisch verfolgt werden. Voraussetzung für die quantitative Analyse der Kinetik mit Hilfe des SFM-3 war die Gültigkeit der Lichtstreuungstheorie. Diese besagt, dass ein Anstieg der gemessenen Lichtintensität des Streulichtes proportional zur Zunahme des Molekulargewichtes ist. Dies gilt strikt nur dann (s. Abschnitt 2.8), wenn die gemessenen Strukturen klein ($\sim\frac{\lambda}{10}$) gegenüber der eingesetzten Lichtwellenlänge sind. Werden die gemessenen Teilchen größer, spielt die Interferenz mehrerer Streuzentren innerhalb eines Moleküls eine Rolle, um so mehr, je größer das Molekül wird. Daher wurde die Auswertung und Anpassung des Modells für die erste Kinetik nur für die Ergebnisse innerhalb der ersten 20 Sekunden nach Start des Wachstums durchgeführt. Innerhalb dieses Zeitrahmens werden im EM und SFM nur Filamentstücke von der Länge eines bzw. zweier ULFs gefunden. Zudem sollte mit dem SFM-3 auch nur die Anfangsphase der Assoziation überprüft werden.

Durch Messungen mit der Vimentin-Rod Mutante (s. Abschnitt 3.4.2) konnte zusätzlich bestätigt werden, dass bei einem Molekül von der Form eines IF bei Dimerisierung das Streusignal tatsächlich um den Faktor zwei ansteigt.
Das erweiterte Modell (s. Abschnitt 3.2.2) konnte direkt für die Anpassungen an die SFM-3-Ergebnisse eingesetzt werden. Es musste lediglich der Formalismus zur Berechnung der mittleren Filamentlänge gegen die Berechnung der Streuintensität ausgetauscht werden (s. Abschnitt 3.4.5). Die Anpassung des Modells an die Messergebnisse zeigte, dass die ersten zwei Reaktionsschritte, das Zusammenlagern von Tetrameren zu Oktameren sowie die Bildung von Hexadekameren aus Oktameren, mit derselben Geschwindigkeit ablaufen. Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten wurden daher hier gleichgesetzt, was auch die Anzahl der freien Parameter für die Anpassung reduzierte. Für die vorangegangenen Messungen mit EM und SFM wurde für das erste laterale Wachstum eine Geschwindigkeitskonstante von $20 * 10^{-6} M^{-1} s^{-1}$ abgeschätzt (s. Abschnitt 5.1.1). Diese geschätzte Konstante war für jeden Schritt des lateralen Wachstums gleich. Im SFM-3 dagegen, wurde für die ersten beiden Reaktionsschritte $2T \rightarrow O$ und $2O \rightarrow H$ eine Geschwindigkeitskonstante im Bereich zwischen $35 \, und \, 75 * 10^{-6} M^{-1} s^{-1}$ermittelt. Der dritte Schritt, die Bildung eines ULFs ($2H \rightarrow ULF$), war verhältnismäßig langsamer und lag im Bereich von $1 \, und \, 6 * 10^{-6} M^{-1} s^{-1}$. Betrachtet man die laterale Reaktion in ihrer Gesamtheit, also nur die Bildung der ULFs, so passen die im SFM-3 ermittelten Geschwindigkeitskonstanten gut zu den vorher abgeschätzten. Im Gegensatz zur vorherigen Annahme laufen die ersten zwei Schritte zwei- bis dreimal so schnell ab wie angenommen. Die Assoziation der Hexadekamere hingegen ist anscheinend mindesten fünfmal langsamer. Prinzipiell muss die Geschwindigkeit abnehmen, da die Konzentration der Hexadekamere, im Gegensatz zu der der Tetramere zu Beginn der Reaktion geringer ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Hexadekamere treffen und zu einem ULF reagieren, ist daher niedriger als z. B. die Bildung eines Oktamers aus zwei Tetrameren am Anfang der lateralen Wachstumsphase. Die Abschätzung ergab daher schon eine relativ gute Annäherung, wohingegen die Messungen mit dem SFM-3 den Bereich noch weiter eingrenzen konnten.
Während der Anpassung des Modells zeigte sich, dass diese bei der Konzentration von 0.2 mg/ml Vimentin an Genauigkeit verliert. Ob sich dieser Effekt bei höheren Konzentrationen fortsetzt und daher eine Erweiterung der Beschreibung des lateralen Wachstums nötig wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr überprüft werde. Die Messungen mit höheren Vimentinkonzentatrionen wurden durch die Bildung von Artefakten zerstört (s. Abschnitt 3.4.3). An dieser Stelle sei noch erwähnt, dass nicht nur, wie hier vorgestellt, die Flussgeschwindigkeit einen Einfluss auf die Artefaktbildung haben kann. Werden Lösungen mit unterschiedlicher Dichte oder Viskosität untersucht, können durch eine unvollständige Vermischung sogenannte Konvektionsartefakte entstehen. Diese treten zwischen zwei Sekunden und einigen Minuten nach dem Stopp auf und sind durch einen wellenförmigen Verlauf des Messsignals gekennzeichnet. Der Einfluss einer guten Vermischung könnte neben der Flussgeschwindigkeit gerade bei höheren Proteinkonzentrationen einen signifikanten Einfluss haben und sollte bei weiterführenden Messungen beachtet werden.
Eine genauere Bestimmung der Reaktionskinetik des lateralen Wachstums war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Allerdings deutete schon die erste Abschätzung der Geschwindigkeitskonstante für das laterale Wachstum auf ein Ergebnis in dieser Größenordnung hin.
Eine neue Anpassung des ***erweiterten Modells*** an die EM- und SFM-Ergebnisse mit dem im SFM-3 ermittelten Wert wurde nicht mehr durchgeführt, da sich die Werte der Anpassung nicht mehr änderten (Daten dazu nicht gezeigt).

4.4 IF-Wachstum - ein Modell

Die Beobachtungen des Filamentwachstums von Vimentin *in vitro* von Sekunden ("Stopped-Flow") bis in den Minutenbereich (EM und SFM) lassen sich gemeinsam mit den Modellbetrachtungen zu folgendem Bild zusammenfügen: Das Längenwachstum der IFs benötigt im wesentlichen zwei Reaktionen, die Addition von ULFs an Filamentenden sowie die Fusion von Enden längerer Filamente. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Beobachtungen auf diesem Gebiet [41, 43]. Zusätzlich dazu unterstützt das hier vorgestellte Modell die Aussage, dass ULFs die produktiven Elemente während der frühen Wachstumsphase darstellen (vgl Abbildung 3.9 **C**). Wie schon weiter oben erwähnt, startet das hier entwickelte Modell mit Vimentin-Tetrameren als kleinste Einheit. Die Annahme, dass Tetramere *in vitro* im P_i-Puffer ohne zusätzliches Salz die kleinste Einheit darstellen, konnte mit der analytischen Ultrazentrifuge in dieser Arbeit nochmals bestätigt werden (s. auch [56]). Für Vimentin konnte gezeigt werden, dass es auch *in vivo* als Tetramer vorliegen kann [81].
Die hier eingesetzten Methoden waren nicht in der Lage, die Existenz verschiedener Zwischenstufen während der ersten lateralen Wachstumphase nachzuweisen. Die Vorstellung, dass dieser Teil des IF-Wachstums von Tetrameren über Oktamere hin zu Hexadekameren und schließlich zu ULFs führt, ist zuerst einmal eine unbewiesene, aber plausible Annahme. Allerdings konnten neuere Messungen mit Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) zeigen, dass Oktamere beim lateralen Wachstum von Tetrameren hin zu ULFs gebildet werden [82].
Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann das IF-Wachstum wie folgt beschrieben werden (siehe auch Abb. 4.1): Während der ersten Sekunden findet ein laterales Wachstum von Tetrameren hin zu einem ULF statt. Daran angeschlossen findet das Längenwachstum statt, welches hauptsächlich durch zwei Reaktionen (s. Abbildung 4.1 **B & C**) vorangetrieben wird: Die Anlagerung eines ULF an ein Filament oder die End-zu-End Fusion längerer Filamente. Den Mechanismus der ULF-Anlagerung an ein Filament kann man teilweise auch im SFM beobachten. Allerdings werden ULFs und Filamente während dieses Vorgangs auf der verwendeten Oberfläche festgehalten, und man kann kein weiteres Zusammenwachsen feststellen. In Abbildung 4.2 **A** ist ein solches Bild aus dem SFM gezeigt. Der schwarze Pfeil markiert die Stelle an der sich eine ULF-ähnliche Struktur direkt an ein längeres Filament anlagert. Die Messung dieses ULF-ähnlichen Filamentstückes (s. Abb. 4.2 **B**) ergab eine Länge von ~77nm. Berücksichtig man die scheinbare Verbreiterung der Probe durch die SFM-Spitze (s. Abschnitt 2.4.2), deren Endradius mit ~20 nm angegeben ist, so hat dieses Filamentstück durchaus eine Länge, die im Bereich eines ULFs (~ 60 nm) liegt.
Vergleicht man die hier ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für das Wachstum der Vimentin-IFs mit den bekannten Werten für AF oder MT, so stellt man fest, dass sich diese in einem ähnlichen Bereich bewegen. So wurde für das Wachstum von AF Geschwindigkeitskonstanten zwischen $0.08\,und\,1.4\,10^{-6}M^{-1}s^{-1}$ für die erste Bildung eines Wachstumkeims errechnet. Die Verlängerung der AF geschieht dann je nach den vorherrschenden Umgebungsbedingungen mit einer Geschwindigkeitskonstante im Bereich zwischen $0.02\,und\,12 * 10^{-6}M^{-1}s^{-1}$ [50, 75]. Für MT wurden Geschwindigkeitskonstanten zwischen $4.3\,bzw.\,8.9\,10^{-6}M^{-1}s^{-1}$ für das Wachstum des Plus- und Minusende berechnet [100]. Die Ergebnisse für das Vimentinwachstum fügen sich daher trotz des andersartigen Reaktionsverlauf in das Gesamtbild der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Zytoskelettfilamente ein.

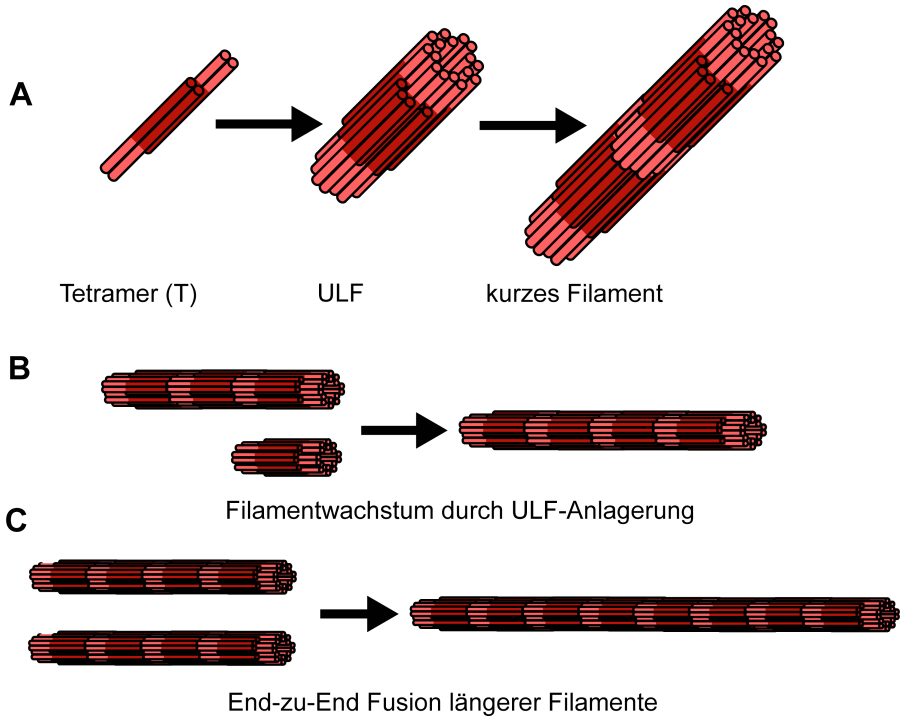

Abbildung 4.1: Die Abbildung zeigt schematisch den Verlauf des IF-Wachstums, der von den Ergebnissen dieser Arbeit gestützt wird. **A**. Das Modell besagt, dass IF-Proteine zuerst durch laterales Wachstum ein ULF bilden. **B. & C**. Das Längenwachstum wird hauptsächlich durch zwei Mechanismen vorangetrieben; ULF-Addition an Filamentenden und End-zu-End Fusion.

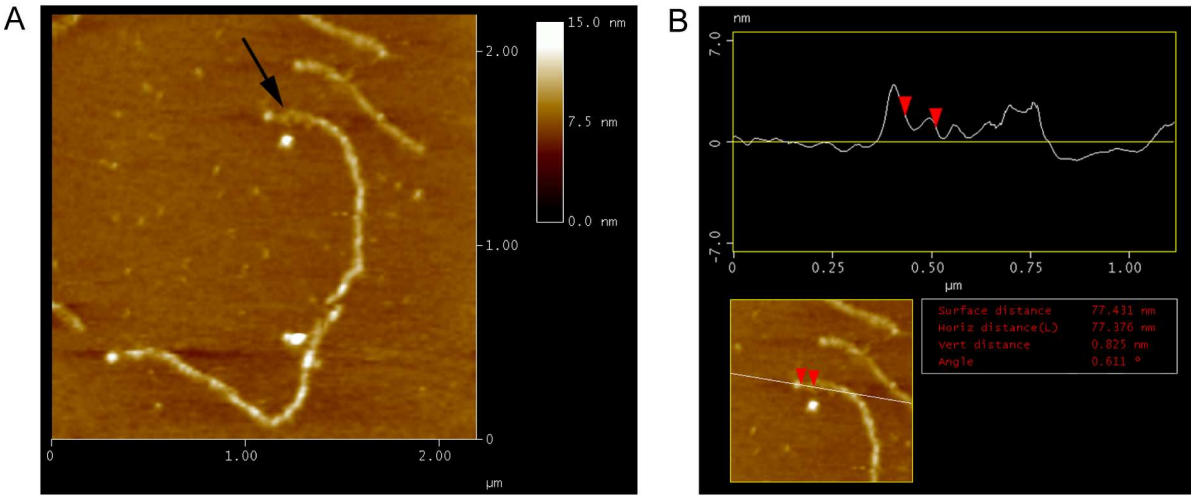

Abbildung 4.2: Diese Aufnahme erfolgte mit dem SFM und zeigt Filamente im Puffer (2 mM Phosphatpuffer + 100 mM KCl , pH 7.5) auf einer Glimmeroberfläche. Der Pfeil markiert eine Stelle, an der sich gerade ein ULF-ähnliches Filamentstück an ein längeres Filament anlagert.

4.5 Relevanz für das Wachstum von IFs in der Zelle

Die Untersuchungen zum Wachstum von MT und AF *in vitro* erbrachten sehr wertvolle Informationen und Erkenntnisse im Bezug auf ihre Dynamik sowie der molekularen Mechanismen, die für ihr Wachstum bzw. ihr Auflösen verantwortlich sind [75, 93]. Diese Arbeiten zeigten zudem die Grenzen dessen auf, was man mit *in vitro* Messungen lernen kann. In lebenden Zellen existieren weitere Faktoren, die das Zytoskelett und dessen Filamente beeinflussen. Dies sind Chaperone, assoziierte Proteine, organisierende Zentren (Zentriolen bzw. MTOC) oder posttranslationale Modifikationen. Bei Messungen *in vitro* werden diese Faktoren nicht beachtet. IFs stellen allerdings ein sehr gutes Objekt für die *in vitro* Untersuchung dar, weil sie sich sogar nachdem sie denaturiert wurden, wieder zu funktionalen Proteinen zurück falten. Diese Fähigkeit grenzt die IFs von den beiden anderen Filamentsystemen ab, die dazu nicht in der Lage sind. Zudem können IF-Proteine ohne weitere Kofaktoren zu langen Filamenten zusammenwachsen. Es wird nur eine entsprechende Ionenstärke (z. B. pH 7.5 mit 100 mM KCl in 2 mM Phosphatpuffer) benötigt.
IFs liegen *in vivo* phosphoryliert vor. Allerdings hat das Entfernen solcher Modifikationen kaum Einfluss auf das Wachstumsverhalten der IFs *in vitro* [87]. Phosphorylierungen an bestimmten Stellen im Protein lösen eher das Zerfallen der Filamente in die Untereinheiten aus. Dieser Vorgang ist *in vivo* sowie *in vitro* nachvollziehbar [67]. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass Filamente durch das Zusammenlagern ihrer Enden weiterwachsen können. Dieser Vorgang kommt in der Tat auch in Zellen vor. Bei Experimenten mit GFP-markierten Proteinen im Lichtmikroskop wurde die Beobachtung gemacht, dass das Wachstum der Vimentinfilament-Netzwerke durch das Verschmelzen von leuchtenden "Punkten" - Strukturen unterhalb des optischen Auflösungsvermögens (~ 0,2 µm) - mit deren Enden, voranschreitet. Diese wurden "Squiggles" genannt. Weiterhin wurde beobachtet, dass diese "Squiggles" weiterwachsen, während sie durch MT-assoziierte Motorproteine zur Zellperipherie transportiert werden. Dort erfolgt dann eine Integration der "Squiggles" in das vorhandene Filamentnetzwerk [39, 76].
Einen ähnlichen Vorgang kann man auch bei dem neuronalen IF-Protein Peripherin beobachten. Peripherin wächst zuerst einmal zu kurzen Filamentstücken zusammen. Diese werden entlang des Axons transportiert und dann in vorhandene lange Filamente integriert [40, 19]. Man kann daher annehmen, dass die oben erwähnten "Punkte" bzw. die kurzen Filamente mit ULFs oder ULF-ähnlichen (2 - 3 ULFs) Strukturen identisch sind. Darüber hinaus belegen diese Beobachtungen, dass neu entstandene Filamente in das bestehende Netzwerk integriert werden können. Der Mechanismus der End-zu-End Fusion muss also auch *in vivo* existieren, da diese Filamentstücke mit den Enden bestehender Filamente zusammengeführt werden.

4.6 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Die hier angeführten Ergebnisse stellen eine erste quantitative Betrachtung des IF-Wachstums am Beispiel des Proteins Vimentin dar. Für die *in vitro*-Experimente und das Modell wurde von Tetrameren ausgegangen. Dieser Ansatz ist durchaus realistisch, da Vimentin-Tetramere auch als solche in Zellen vorkommen können [81]. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktionskinetik dem von Herrmann und Aebi [41] vorgeschlagenen Modell folgt. Hierbei konnte auch gezeigt werden, das ULFs tatsächlich als Zwischenstufe benötigt werden, um die Wachstumskurven zu erklären (s. Abschnitt 3.2.2 , Abb. 3.8). Weiterhin konnte an dieser Stelle belegt werden, das eine End-zu-End Fusion längerer Filamente stattfinden muss. Dieser Mechanismus zur Verlängerung der Filamente wurde in den letzten

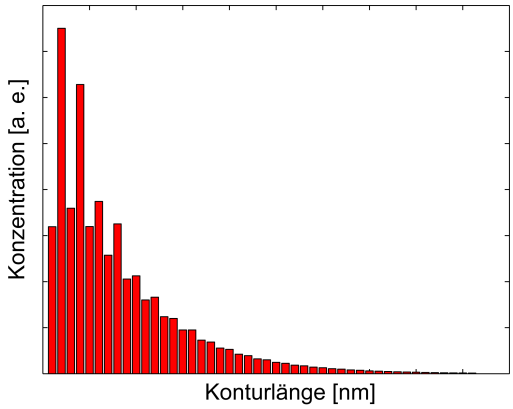

Abbildung 4.3: Die Abbildung zeigt ein beispielhaftes Ergebnis aus dem vorläufigen Verteilungsmodell für das Filamentwachstum. Das Modell zählt dabei die Anzahl der Filamente einer bestimmten Länge auf Basis ULFs die in die Filamente integriert wurden. Dargestellt ist die Verteilung angefangen von ULFs nach 70 Sekunden Wachstum. Die ungleichmäßig verteilten Spitzen im Histogramm könnten ein Anzeichen für eine End-zu-End Fusion der Filamentstücke sein.

Jahren kontrovers diskutiert. Durch die "Stopped-Flow"-Messungen konnte zudem die Geschwindigkeitskonstante für das laterale Wachstum von Vimentin Tetrameren hin zu ULFs bestimmt werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse sind zunächst einmal nur für die Beschreibung des Vimentinwachstums gültig. Es ist aber zu erwarten, dass man für andere IF-Proteine auf gleiche Weise die Reaktionskinetik quantifizieren kann. IF-Proteine des gleichen Typs (Typ III), z. B. Desmin oder Peripherin sollten relativ einfach zu charakterisieren sein. Von Desmin ist bekannt, dass es unter gleichen Bedingungen sehr viel schneller als Vimentin lange Filamente bilden kann. Auf der anderen Seite wurde für Lamine gezeigt, dass diese bevorzugt über "Head to Tail"-Wechselwirkungen zusammenwachsen [89]. Um diese Kinetik weiterzuverfolgen, müsste ein angepasstes Modell entwickelt werden.
Die nächste Herausforderung in dieser Richtung wird die genauere Beschreibung des Filamentwachstums auf Basis eines Verteilungsmodells sein. Dieses Modell ist zur Zeit in Bearbeitung und wird nach Beendigung dieser Arbeit weiter verfolgt werden. Das Ziel dieses Ansatzes soll es sein, direkt die Längenverteilung der Filamente zu verschiedenen Zeitpunkten zu simulieren. Abbildung 4.3 zeigt beispielhaft ein Ergebnis aus den ersten Versuchen mit diesem Ansatz. Dieser Ansatz könnte auf die Messung des lateralen Wachstums erweitert werden. Durch Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) kombiniert mit dem "Stopped-Flow" wäre es denkbar, auch die Verteilung von Tetrameren, ULFs und den jeweiligen Zwischenstufen innerhalb der ersten Sekunden zu bestimmen.

Aussagekräftige Modelle zur Quantifizierung der Wachstumskinetik verschiedener IFs sollten es ermöglichen, die ständig wachsende Anzahl von neu beschriebenen Mutationen an IF-Proteinen, welche die Filamentbildung beeinflussen, auf einer objektiven Basis zu charakterisieren und mit der Wildtyp-Form zu vergleichen (vgl. auch Abschnitt 1.2). Im Menschen lösen diese Mutationen langsam fortschreitende, schwerwiegende und oft unheilbare Krankheiten aus [36, 38, 66]. Neuere Studien zu Myopathien, die auf Desminmutationen zurückzuführen sind, zeigen zudem, dass die strukturelle Kenntnis des Wachstumsprozesses eine solide Basis darstellt, um überhaupt ein fundiertes Konzept des Pathomechanismus zu entwickeln [9, 10, 48]. Dazu trägt diese Arbeit in einem ersten Schritt bei.

Kapitel 5

Anhang

Eine Idee kann man niemals schlüssig beweisen, nur widerlegen

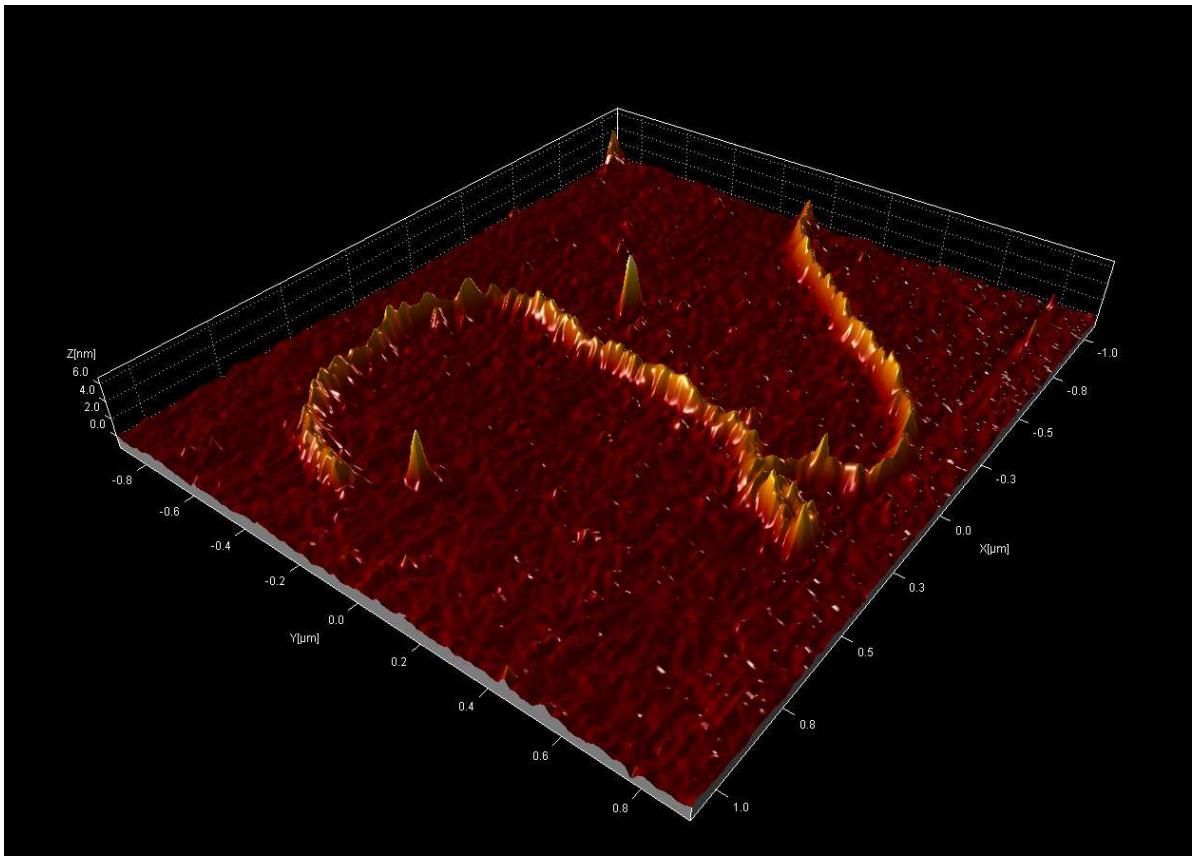

Abbildung 5.1: Gezeigt ist ein Vimentin-Filament auf einer Glasoberfläche aufgenommen in Puffer (3D-Rekonstruktion).

5.1 Kinetisches Modell, Berkerley Madonna Eingabeskript

5.1.1 Einfaches Modell

Algorithm 1 Berkeley Madonna 8.0 Eingabeskript für das "Einfache Modell". ULFs und Filamente werden hier nicht getrennt betrachtet. ";" leitet einen Kommentar ein, der Text hinter einem ";" dient dazu das eigentlich Skript zu kommentieren.

```
; Simplified assembly of IFs with "key"-intermediates
; Progressive formation of ULF by lateral annealing of different intermediates ( T -> O -> S -> U)
; Filament nucleation is annealing of two ULFs
; Longitudinal growth annealing of two ULFs or ULF and a Filament
; Intermediates
; T = 1 Tetramer
; O = 2 Tetramers
; H = 4 Tetramers
; U = 8 Tetramers (ULF)
; F = everthying >= 2 ULFs
METHOD RK4
STARTTIME = 0
STOPTIME= 1200
DT = 0.02
; Variables involved
c0 = 0.9 ; Concentration of Tetramers at t(0)
k1 = 1 ; apparent rate constant of lateral assembly (ULF-formation)
kf = 0.5 ; apparent rate constant of longitudinal growth (filament-assembly)
kt = 0 ; apparent rate constant of Tetramer addition
scale = 1000 ; conversion of mL from µm into nm
corr = -0.02 ; Correction-factor for calculation concerning the end (according to Norbert)
tpl = 180 ; tpl = Tetramers per length (according to Basel 180 Tetramers/µm)
; State Variables initial concentration of species
INIT T = c0
INIT O = 0
INIT S = 0
INIT F = 0.001
; Reactions used in the Model
RXN1 = k1 * T * T ; (1) T + T -> O
RXN2 = k1 * O * O ; (2) O + O -> S
RXN3 = k1 * S * S ; (2) S + S -> U
RXN4 = kf * F * F
RXN5 = kt * T * F
; differential equations for tracking intermediates
d/dt(T) = -2*RXN1 - RXN5
d/dt(O) = +RXN1 - 2*RXN2
d/dt(H) = +RXN2 - 2*RXN3
d/dt(F) = +RXN3 +RXN5 - 2*RXN4
; equation for calculation of mean lenght at time t
mL =( ( ( c0 - T - 2*O - 4*H ) / ( tpl * F ) ) + corr ) * scale
```

5.1.2 Erweitertes Modell

Algorithm 2 Berkeley Madonna 8.0 Eingabeskript für das "Erweiterte Modell". ULFs und Filamente werden hier nun getrennt betrachtet. ";" leitet einen Kommentar ein, der Text hinter einem ";" dient dazu das eigentlich Skript zu kommentieren.

```
; Class ULF-Filament Model
; Simplified assembly of IFs with "key"-intermediates
; Progressive formation of ULF by lateral annealing of different intermediates ( T -> O -> S -> U)
; T = 1 Tetramer
; O = 2 Tetramers
; H = 4 Tetramers
; U = 8 Tetramers (ULF)
; F = everthying >= 2 ULFs
METHOD RK4
STARTTIME = 0
STOPTIME= 1200
DT = 0.02
; Variables involved
c0 = 0.9 ; Concentration of Tetramers at t(0) in µM
k1 = 20 ; apparent rate constant of lateral assembly (ULF-formation)
k2 = 0 ; apparent rate constant of two ULF joining
kt = 0 ; apparant rate constant for Tetramers adding to filaments
ku = 0 ; apparant rate constant for ULFs adding to filaments
kf = 0 ; apparant rate constant end-to-end-fusion
scale = 1000 ; conversion of mL from µm into nm
corr = -0.02 ; Correction-factor for calculation concerning the end (according to Norbert)
tpl = 184 ; tpl = Tetramers per length (according to Basel 180 Tetramers/µm)
l_ulf=0.06 ; length of an ULF
offset = 0 ; only used when calculation LS or Stopped-Flow data
; State Variables initial concentration of species
INIT T = c0
INIT O = 0
INIT H = 0
INIT U = 0
INIT F = 0
; Reactions used in the Model
RXN1 = k1 * T * T ; (1) T + T -> O
RXN2 = k1 * O * O ; (2) O + O -> H
RXN3 = k1 * H * H ; (2) H + H -> U
RXN4 = k2 * U * U ; (3) Nucleation : U + U -> F
RXN5 = ku * U * F ; (4) Elongation : U + F ->
RXN6 = kf * F * F ; concentration of free ends
RXN7 = kt * T * F ; Tetramers adding to free F-ends
; differential equations for tracking intermediates
d/dt(T) = -2 * RXN1 - RXN7
d/dt(O) = +RXN1 - 2*RXN2
d/dt(H) = +RXN2 - 2*RXN3
d/dt(U) = +RXN3 -2*RXN4 -RXN5
d/dt(F) = +RXN4 -RXN6
; Mean lenght equation taking 1 ULF as filament
MFL = IF (F <= 0 ) THEN 60 else ( ( ( c0 - T - 2*O - 4*H - 8*U + tpl*l_ulf*U ) / ( tpl * (F+U) ) ) * scale )
```

5.1.3 Erweitertes Modell für Stopped-Flow

Algorithm 3 Berkeley Madonna 8.0 Eingabeskript für das "Erweiterte Modell". Das Modell ist hier angepasst, um an die Lichtstreuungsdaten des Stopped-Flow angepasst zu werden. Das Modell betrachtet nur das Wachstum bis zu zwei ULFs, bzw. eventuellen weiteren Zwischenstufen des lateralen Wachstum. Durch Aus-/Einkommentieren der Zeilen kann das Script beiden Ansätzen Rechnung tragen ";" leitet einen Kommentar ein, der Text hinter einem ";" dient dazu das eigentlich Skript zu kommentieren.

```
METHOD RK4
STARTTIME = 0
STOPTIME=20
DT = 0.02
; ************************************
; * initial Concentration of Tetramers in µM *
; ************************************
c0 = 0.94
TetraScatter = 0.38
Offset = -0.38
; ************************************************
; * State Variables for the different Species concentrations *
; ************************************************
INIT T = c0
INIT O = 0
INIT H = 0
INIT U = 0
INIT U2 = 0
; *************************
; * Reaction Constants *
; *************************
k1 =1
k2 = k1
k3 = 1
k4 = 1
; *************************
; * Reaction Equations *
; *************************
d/dt(T) = -2*k1*T*T
d/dt(O) = k1*T*T - 2*k2*O*O
d/dt(H) = k2*O*O - 2*k3*H*H
d/dt(U) = k3*H*H - 2*k4*U*U
d/dt(U2) = k4*U*U
; *************************
; * Light Scattering Stuff *
; *************************
; Intensity of the different Species at the respective concentration [V]
; Insert Tetramer Scattering Signal for Int_T
Int_T = TetraScatter
Int_O = 2*Int_T
Int_H = 4*Int_T
Int_U = 8*Int_T
Int_U2 = 16*Int_T
; Final Intensity corrected for the concentration and proportion
IntensityT = T/c0*Int_T
IntensityO = O/(c0/2)*Int_O
IntensityH = H/(c0/4)*Int_H
IntensityU = U/(c0/8)*Int_U
IntensityU2 = U2/(c0/16)*Int_U2
; Just the Final Signal
Intensity = (IntensityT + IntensityO + IntensityH + IntensityU + IntensityU2) + Offset
```

5.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
µl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
µm	Mikrometer (10^{-6} Meter)
AF	Aktinfilamente
AS	Ascorbinsäure
AUZ	**a**nalytisch **U**ltra**z**entrifuge
BSE	**B**ovine **S**pongiforme **E**nzephalopathie oder "Mad Cow Disease"
CJD	**C**reutzfeldt **J**akop **D**isease
CM	Carboxymethyl (in der CM-Sepharose)
cm	centimeter (10^{-3} Meter)
DCIP	2,6 Dichlorophenolindophenol
DEAE	Diethylaminoethyl (in der DEAE-Sepharose)
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DTT	1,4 Dithiothreitol
EM	**E**lektronen**m**ikroskop (auch TEM)
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GFAP	**g**lial **f**ibrillar **a**cidic **p**rotein (Typ III IF)
GFP	**g**reen **f**luorescent **p**rotein
h	Stunde
IF	**I**ntermediär**f**ilament(e)
kDA	kilo Dalton
kV	kilo Volt
M	Molar
mbar	Millibar
MFL	**m**ittlere **F**ilament**l**änge
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	milli Molar
MT	Mikrotubuli
MTOC	**M**icrotubule **o**rganizing **c**enter

nm	nanometer (10^{-9} Meter)
NP-40	Nonidet-P40 (Ethylphenolpolyethylenglycolether)
pH	-log H+, negativer Logarithmus der Hydroniumkonzentration
P_i-Puffer	Phosphatpuffer (hier 2 mM Phosphat, pH 7.5)
rpm	**r**ounds **p**er **m**inute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde oder Sedimentationskoeffizient
S	Svedberg
SDS	**S**odium **d**odecyl **s**ulfate (deutsch: Natriumlaurylsulfat)
SFM	**S**canning **F**orce **M**icroscope (Rasterkraftmikroskop)
SFM-3	**S**topped-**F**low-**M**odul-3
Tetra	hier für Vimentin Tetramer
ULF	Unit-Length Filament, bestehend aus 8 Tetrameren
Vwt	Vimentin wild typ

5.3 Eigene Publikationen

5.3.1 "Peer-Reviewed" Journals

Hong Jin, Esther S. Jeng, Daniel A. Heller, Prakrit V. Jena, **Robert Kirmse**, Jörg Langowski, and Michael S. Strano, Divalent Ion and Thermally Induced DNA Conformational Polymorphism on Single-walled Carbon Nanotubes, ***Macromolecules***, accepted Juni 2007

Robert Kirmse, Stephanie Portet, Norbert Mücke, Ueli Aebi, Harald Herrmann, and Jörg Langowski, A quantitative kinetic model for the in vitro assembly of intermediate filaments from tetrameric vimentin, ***J Biol Chem*** in press, published April 2, 2007 as doi:10.1074/jbc.M701063200

Mücke, N. and **Kirmse, R.** and Wedig, T. and Leterrier, J. F. and Kreplak, L., Investigation of the morphology of intermediate filaments adsorbed to different solid supports, ***J Struct Biol***, vol. 150, no. 3, pp. 268-76, 2005

Mücke, N. and Kreplak, L. and **Kirmse, R.** and Wedig, T. and Herrmann, H. and Aebi, U. and Langowski, J., Assessing the flexibility of intermediate filaments by atomic force microscopy, ***J Mol Biol***, vol. 335, no. 5, pp. 1241-50, 2004

5.3.2 Buchkapitel

Thomas Ludwig, **Robert Kirmse**, Kate Poole, Challenges and Approaches - *Probing Tumor Cell Invasion by Atomic Force Microscopy, Modern Researh and Educational Topics in Microscopy*, Number 3 (2007), Formatex Spanien.

5.3.3 Posterpräsentation auf internationalen Konferenzen

30 Jahre Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie, 16. - 19. März 2005, Heidelberg, **R. Kirmse**, N. Mücke, H. Herrmann, J. Langowski, Unravelling the self-assembly process of intermediate filaments, EJCB, vol. 84 Suppl. 55 (2005 March).
Laurent Kreplak, Norbert Mücke, **Robert Kirmse**, Tatjana Wedig, Jean-Francoise Leterrier, Harald Herrmann, Ueli Aebi, Morphology of intermediate filaments (IFs) adsorbed to solid supports, EJCB, vol. 84 Suppl. 55 (2005 March).

Seeing at the Nanoscale II, 13. - 15. Oktober 2004, Grenoble France, Europole Congress Centre, **Robert Kirmse**, Norbert Mücke, Laurent Kreplak, Harald Herrmann, Jörg Langowski, Scanning Force Microscopy of Intermediate Filaments, Abstract #84.

Veeco 10. Usermeeting, 22. - 23. September, Kirchhoff-Institut für Physik, Heidelberg, **Robert Kirmse**, Lauren Kreplak, Norbert Mücke, Tatjana Wedig, Jean-Francois Leterrier, Harald Herrmann, Ueli Aebi, Morphology of Intermediate Filaments (IFs) as seen with the Atomic Force Microscope on different supports. (**Posterpreis 2. Platz**)

Around the Cell Nucleus Workshop, 9. - 10- Februar 2004, ESRF Grenoble, M. Roessle, J. Langwoski, **R. Kirmse** & C. Riekel, Small-Angle X-Ray Scattering on Single Cell Nuclei.

5.3.4 Vortrag

Studying the reaction kinetics of in vitro intermediate filament assembly, July 30 - August 4, 2006, Gordon Research Conference for Intermediate Filaments, Salve Regina University Newport, RI, Oral Poster Presentation, Session I July 30 (http://www.grc.org/programs.aspx?year=2006&program=intermed)

Literaturverzeichnis

[1] Caroline Adelfalk, Harry Scherthan, Monica Hirsch-Kauffmann, and Manfred Schweiger. Nuclear deformation characterizes werner syndrome cells. *Cell Biol Int*, 29(12):1032–1037, Dec 2005.

[2] Anil K Agarwal, Jean-Pierre Fryns, Richard J Auchus, and Abhimanyu Garg. Zinc metalloproteinase, zmpste24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum Mol Genet*, 12(16):1995–2001, Aug 2003.

[3] Shoji Ando, Ken ichiro Nakao, Rumi Gohara, Yozo Takasaki, Kazuaki Suehiro, and Yushi Oishi. Morphological analysis of glutaraldehyde-fixed vimentin intermediate filaments and assembly-intermediates by atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1702(1):53–65, Oct 2004.

[4] M. Raffaele Di Barletta, E. Ricci, G. Galluzzi, P. Tonali, M. Mora, L. Morandi, A. Romorini, T. Voit, K. H. Orstavik, L. Merlini, C. Trevisan, V. Biancalana, I. Housmanowa-Petrusewicz, S. Bione, R. Ricotti, K. Schwartz, G. Bonne, and D. Toniolo. Different mutations in the lmna gene cause autosomal dominant and autosomal recessive emery-dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*, 66(4):1407–1412, Apr 2000.

[5] A. D. Baxevanis and C. R. Vinson. Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr Opin Genet Dev*, 3(2):278–285, Apr 1993.

[6] S. Bione, E. Maestrini, S. Rivella, M. Mancini, S. Regis, G. Romeo, and D. Toniolo. Identification of a novel x-linked gene responsible for emery-dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, 8(4):323–327, Dec 1994.

[7] G. Bonne, M. R. Di Barletta, S. Varnous, H. M. Bécane, E. H. Hammouda, L. Merlini, F. Muntoni, C. R. Greenberg, F. Gary, J. A. Urtizberea, D. Duboc, M. Fardeau, D. Toniolo, and K. Schwartz. Mutations in the gene encoding lamin a/c cause autosomal dominant emery-dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, 21(3):285–288, Mar 1999.

[8] G. A. Bowden, A. M. Paredes, and G. Georgiou. Structure and morphology of protein inclusion bodies in Escherichia coli. *Biotechnology (N Y)*, 9(8):725–730, Aug 1991.

[9] Harald Bär, Norbert Mücke, Anna Kostareva, Gunnar Sjöberg, Ueli Aebi, and Harald Herrmann. 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, Oct 2005.

[10] Harald Bär, Sergei V Strelkov, Gunnar Sjöberg, Ueli Aebi, and Harald Herrmann. The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J Struct Biol*, 148(2):137–152, Nov 2004.

[11] M. Brenner, A. B. Johnson, O. Boespflug-Tanguy, D. Rodriguez, J. E. Goldman, and A. Messing. Mutations in gfap, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with alexander disease. *Nat Genet*, 27(1):117–120, Jan 2001.

[12] R. W. Briehl, E. S. Mann, and R. Josephs. Length distributions of hemoglobin s fibers. *J Mol Biol*, 211(4):693–698, Feb 1990.

[13] G. L. Brodsky, F. Muntoni, S. Miocic, G. Sinagra, C. Sewry, and L. Mestroni. Lamin a/c gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement. *Circulation*, 101(5):473–476, Feb 2000.

[14] H. Bujard, R. Gentz, M. Lanzer, D. Stueber, M. Mueller, I. Ibrahimi, M. T. Haeuptle, and B. Dobberstein. A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol*, 155:416–433, 1987.

[15] H. Cao and R. A. Hegele. Nuclear lamin a/c r482q mutation in canadian kindreds with dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet*, 9(1):109–112, Jan 2000.

[16] Brian C Capell and Francis S Collins. Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet*, 7(12):940–952, Dec 2006.

[17] Y. Capetanaki, S. Smith, and J. P. Heath. Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation. *J Cell Biol*, 109(4 Pt 1):1653–1664, Oct 1989.

[18] F. Caux, E. Dubosclard, O. Lascols, B. Buendia, O. Chazouillères, A. Cohen, J-C. Courvalin, L. Laroche, J. Capeau, C. Vigouroux, and S. Christin-Maitre. A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins a and c with generalized lipoatrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(3):1006–1013, Mar 2003.

[19] Lynne Chang, Yaron Shav-Tal, Tatjana Trcek, Robert H Singer, and Robert D Goldman. Assembling an intermediate filament network by dynamic cotranslation. *J Cell Biol*, 172(5):747–758, Feb 2006.

[20] Paul R. Schimmel Charles R. Cantor. *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, 1980.

[21] Lishan Chen, Lin Lee, Brian A Kudlow, Heloisa G Dos Santos, Olav Sletvold, Yousef Shafeghati, Eleanor G Botha, Abhimanyu Garg, Nancy B Hanson, George M Martin, I. Saira Mian, Brian K Kennedy, and Junko Oshima. Lmna mutations in atypical werner's syndrome. *Lancet*, 362(9382):440–445, Aug 2003.

[22] J. Collinge. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, 24:519–550, 2001.

[23] E. Colucci-Guyon, M. M. Portier, I. Dunia, D. Paulin, S. Pournin, and C. Babinet. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell*, 79(4):679–694, Nov 1994.

[24] L. D. Corden and W. H. McLean. Human keratin diseases: hereditary fragility of specific epithelial tissues. *Exp Dermatol*, 5(6):297–307, Dec 1996.

[25] P. A. Coulombe, M. E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A. S. Paller, and E. Fuchs. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell*, 66(6):1301–1311, Sep 1991.

[26] A. B. Csoka, H. Cao, P. J. Sammak, D. Constantinescu, G. P. Schatten, and R. A. Hegele. Novel lamin a/c gene (lmna) mutations in atypical progeroid syndromes. *J Med Genet*, 41(4):304–308, Apr 2004.

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

[28] F. L. DeBusk. The hutchinson-gilford progeria syndrome. report of 4 cases and review of the literature. *J Pediatr*, 80(4):697–724, Apr 1972.

[29] B. Eckes, E. Colucci-Guyon, H. Smola, S. Nodder, C. Babinet, T. Krieg, and P. Martin. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci*, 113 (Pt 13):2455–2462, Jul 2000.

[30] B. Eckes, D. Dogic, E. Colucci-Guyon, N. Wang, A. Maniotis, D. Ingber, A. Merckling, F. Langa, M. Aumailley, A. Delouvée, V. Koteliansky, C. Babinet, and T. Krieg. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci*, 111 (Pt 13):1897–1907, Jul 1998.

[31] Maria Eriksson, W. Ted Brown, Leslie B Gordon, Michael W Glynn, Joel Singer, Laura Scott, Michael R Erdos, Christiane M Robbins, Tracy Y Moses, Peter Berglund, Amalia Dutra, Evgenia Pak, Sandra Durkin, Antonei B Csoka, Michael Boehnke, Thomas W Glover, and Francis S Collins. Recurrent de novo point mutations in lamin a cause hutchinson-gilford progeria syndrome. *Nature*, 423(6937):293–298, May 2003.

[32] D. Fatkin, C. MacRae, T. Sasaki, M. R. Wolff, M. Porcu, M. Frenneaux, J. Atherton, H. J. Vidaillet, S. Spudich, U. De Girolami, J. G. Seidman, C. Seidman, F. Muntoni, G. Müehle, W. Johnson, and B. McDonough. Missense mutations in the rod domain of the lamin a/c gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*, 341(23):1715–1724, Dec 1999.

[33] W. W. Franke, M. Hergt, and C. Grund. Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell*, 49(1):131–141, Apr 1987.

[34] E. Fuchs. Keratins and the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11:123–153, 1995.

[35] E. Fuchs. The cytoskeleton and disease: genetic disorders of intermediate filaments. *Annu Rev Genet*, 30:197–231, 1996.

[36] E. Fuchs and K. Weber. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63:345–382, 1994.

[37] B. K. Gillard, R. G. Harrell, and D. M. Marcus. Pathways of glycosphingolipid biosynthesis in sw13 cells in the presence and absence of vimentin intermediate filaments. *Glycobiology*, 6(1):33–42, Jan 1996.

[38] L. G. Goldfarb, P. Vicart, H. H. Goebel, and M. C. Dalakas. Desmin myopathy. *Brain*, 127(Pt 4):723–734, Apr 2004.

[39] Brian T Helfand, Lynne Chang, and Robert D Goldman. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci*, 117(Pt 2):133–141, Jan 2004.

[40] Brian T Helfand, Patty Loomis, Miri Yoon, and Robert D Goldman. Rapid transport of neural intermediate filament protein. *J Cell Sci*, 116(Pt 11):2345–2359, Jun 2003.

[41] H. Herrmann and U. Aebi. Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol*, 8(2):177–85., 1998.

[42] H. Herrmann, M. Haner, M. Brettel, N. O. Ku, and U. Aebi. Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. *J Mol Biol*, 286(5):1403–20., 1999.

[43] H. Herrmann, M. Haner, M. Brettel, S. A. Muller, K. N. Goldie, B. Fedtke, A. Lustig, W. W. Franke, and U. Aebi. Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol*, 264(5):933–53 issn: 0022–2836, 1996.

[44] Harald Herrmann and Ueli Aebi. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu Rev Biochem*, 73:749–789, 2004.

[45] Harald Herrmann, Harald Bär, Laurent Kreplak, Sergei V Strelkov, and Ueli Aebi. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7):562–573, Jul 2007.

[46] M. Hesse, T. M. Magin, and K. Weber. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci*, 114(Pt 14):2569–2575, Jul 2001.

[47] Brian P Ingalls and Herbert M Sauro. Sensitivity analysis of stoichiometric networks: an extension of metabolic control analysis to non-steady state trajectories. *J Theor Biol*, 222(1):23–36, May 2003.

[48] Anna Kaminska, Sergei V Strelkov, Bertrand Goudeau, Montse Olivé, Ayush Dagvadorj, Anna Fidzianska, Monique Simon-Casteras, Alexey Shatunov, Marinos C Dalakas, Isidro Ferrer, Hubert Kwiecinski, Patrick Vicart, and Lev G Goldfarb. Small deletions disturb desmin architecture leading to breakdown of muscle cells and development of skeletal or cardioskeletal myopathy. *Hum Genet*, 114(3):306–313, Feb 2004.

[49] Robert Kirmse, Stephanie Portet, Norbert Mücke, Ueli Aebi, Harald Herrmann, and Jörg Langowski. A quantitative kinetic model for the in vitro assembly of intermediate filaments from tetrameric vimentin. *J Biol Chem*, 282(25):18563–18572, Jun 2007.

[50] A. A. Lal, E. D. Korn, and S. L. Brenner. Rate constants for actin polymerization in atp determined using cross-linked actin trimers as nuclei. *J Biol Chem*, 259(14):8794–8800, Jul 1984.

[51] E. Lazarides. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, 283(5744):249–256, Jan 1980.

[52] J. G. Lieber and R. M. Evans. Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3t3-l1 cells inhibits lipid droplet accumulation. *J Cell Sci*, 109 (Pt 13):3047–3058, Dec 1996.

[53] S. Manilal, D. Recan, C. A. Sewry, M. Hoeltzenbein, S. Llense, F. Leturcq, N. Deburgrave, J. Barbot, N. Man, F. Muntoni, M. Wehnert, J. Kaplan, and G. E. Morris. Mutations in emery-dreifuss muscular dystrophy and their effects on emerin protein expression. *Hum Mol Genet*, 7(5):855–864, May 1998.

[54] K. Matrougui, J. Maclouf, B. I. Lévy, and D. Henrion. Impaired nitric oxide- and prostaglandin-mediated responses to flow in resistance arteries of hypertensive rats. *Hypertension*, 30(4):942–947, Oct 1997.

[55] N. Mücke, L. Kreplak, R. Kirmse, T. Wedig, H. Herrmann, U. Aebi, and J. Langowski. Assessing the flexibility of intermediate filaments by atomic force microscopy. *J Mol Biol*, 335(5):1241–50, 2004. 0022-2836 (Print) Journal Article.

[56] N. Mücke, T. Wedig, A. Burer, L. N. Marekov, P. M. Steinert, J. Langowski, U. Aebi, and H. Herrmann. Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin. *J Mol Biol*, 340(1):97–114, 2004. 0022-2836 (Print) Journal Article.

[57] Roland Meier-Bornheim. *Untersuchungen zur Funktion des Intermediarfilamentproteins Vimentin in vivo*. PhD thesis, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2006.

[58] Sunanda J. Ram Michael D. Abràmoff, Paulo J. Magalhaes. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, July:36–41, 2004.

[59] Casey L Moulson, Gloriosa Go, Jennifer M Gardner, Allard C van der Wal, J. Henk Sillevis Smitt, Johanna M van Hagen, and Jeffrey H Miner. Homozygous and compound heterozygous mutations in zmpste24 cause the laminopathy restrictive dermopathy. *J Invest Dermatol*, 125(5):913–919, Nov 2005.

[60] A. Muchir, G. Bonne, A. J. van der Kooi, M. van Meegen, F. Baas, P. A. Bolhuis, M. de Visser, and K. Schwartz. Identification of mutations in the gene encoding lamins a/c in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (lgmd1b). *Hum Mol Genet*, 9(9):1453–1459, May 2000.

[61] K. Nagai and H. C. Thøgersen. Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in Escherichia coli. *Methods Enzymol*, 153:461–481, 1987.

[62] Claire L Navarro, Juan Cadiñanos, Annachiara De Sandre-Giovannoli, Rafaëlle Bernard, Sébastien Courrier, Irène Boccaccio, Amandine Boyer, Wim J Kleijer, Anja Wagner, Fabienne Giuliano, Frits A Beemer, Jose M Freije, Pierre Cau, Raoul C M Hennekam, Carlos López-Otín, Catherine Badens, and Nicolas Lévy. Loss of zmpste24 (face-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of lamin a precursors. *Hum Mol Genet*, 14(11):1503–1513, Jun 2005.

[63] Claire L Navarro, Annachiara De Sandre-Giovannoli, Rafaëlle Bernard, Irène Boccaccio, Amandine Boyer, David Geneviève, Smail Hadj-Rabia, Caroline Gaudy-Marqueste, Henk Sillevis Smitt, Pierre Vabres, Laurence Faivre, Alain Verloes, Ton Van Essen, Elisabeth Flori, Raoul Hennekam, Frits A Beemer, Nicole Laurent, Martine Le Merrer, Pierre Cau, and Nicolas Lévy. Lamin a and zmpste24 (face-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet*, 13(20):2493–2503, Oct 2004.

[64] I. D. Nicholl and R. A. Quinlan. Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *EMBO J*, 13(4):945–953, Feb 1994.

[65] Giuseppe Novelli, Antoine Muchir, Federica Sangiuolo, Anne Helbling-Leclerc, Maria Rosaria D'Apice, Catherine Massart, Francesca Capon, Paolo Sbraccia, Massimo Federici, Renato Lauro, Cosimo Tudisco, Rosanna Pallotta, Gioacchino Scarano, Bruno Dallapiccola, Luciano Merlini, and Gisèle Bonne. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in lmna-encoding lamin a/c. *Am J Hum Genet*, 71(2):426–431, Aug 2002.

[66] M. Bishr Omary, Pierre A Coulombe, and W. H Irwin McLean. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med*, 351(20):2087–2100, Nov 2004.

[67] M. Bishr Omary, Nam-On Ku, Guo-Zhong Tao, Diana M Toivola, and Jian Liao. "heads and tailsöf intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci*, 31(7):383–394, Jul 2006.

[68] F. Oosawa. The loose coupling mechanism in molecular machines of living cells. *Genes Cells*, 5(1):9–16, Jan 2000.

[69] F. Oosawa and S. Asakura. *Thermodynamics of the polymerisation of protein*. Academic Press, 1975.

[70] F. OOSAWA and M. KASAI. A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *J Mol Biol*, 4:10–21, Jan 1962.

[71] M. Pekny. Astrocytic intermediate filaments: lessons from gfap and vimentin knock-out mice. *Prog Brain Res*, 132:23–30, 2001.

[72] M. D. Perng, L. Cairns, P. van den IJssel, A. Prescott, A. M. Hutcheson, and R. A. Quinlan. Intermediate filament interactions can be altered by hsp27 and alphab-crystallin. *J Cell Sci*, 112 (Pt 13):2099–2112, Jul 1999.

[73] J. S. Philo. An improved function for fitting sedimentation velocity data for low-molecular-weight solutes. *Biophys J*, 72(1):435–444, Jan 1997.

[74] J. S. Philo. A method for directly fitting the time derivative of sedimentation velocity data and an alternative algorithm for calculating sedimentation coefficient distribution functions. *Anal Biochem*, 279(2):151–163, Mar 2000.

[75] T. D. Pollard and J. A. Cooper. Actin and actin-binding proteins. a critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem*, 55:987–1035, 1986.

[76] V. Prahlad, M. Yoon, R. D. Moir, R. D. Vale, and R. D. Goldman. Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. *J Cell Biol*, 143(1):159–170, Oct 1998.

[77] Elizabeth L Rugg and Irene M Leigh. The keratins and their disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 131C(1):4–11, Nov 2004.

[78] Annachiara De Sandre-Giovannoli, Rafaëlle Bernard, Pierre Cau, Claire Navarro, Jeanne Amiel, Irène Boccaccio, Stanislas Lyonnet, Colin L Stewart, Arnold Munnich, Martine Le Merrer, and Nicolas Lévy. Lamin a truncation in hutchinson-gilford progeria. *Science*, 300(5628):2055, Jun 2003.

[79] Annachiara De Sandre-Giovannoli, Malika Chaouch, Serguei Kozlov, Jean-Michel Vallat, Meriem Tazir, Nadia Kassouri, Pierre Szepetowski, Tarik Hammadouche, Antoon Vandenberghe, Colin L Stewart, Djamel Grid, and Nicolas Lévy. Homozygous defects in lmna, encoding lamin a/c nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (charcot-marie-tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet*, 70(3):726–736, Mar 2002.

[80] S. Shackleton, D. J. Lloyd, S. N. Jackson, R. Evans, M. F. Niermeijer, B. M. Singh, H. Schmidt, G. Brabant, S. Kumar, P. N. Durrington, S. Gregory, S. O'Rahilly, and R. C. Trembath. Lmna, encoding lamin a/c, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet*, 24(2):153–156, Feb 2000.

[81] P. Soellner, R. A. Quinlan, and W. W. Franke. Identification of a distinct soluble subunit of an intermediate filament protein: tetrameric vimentin from living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(23):7929–7933, Dec 1985.

[82] Anna V Sokolova, Laurent Kreplak, Tatjana Wedig, Norbert Mücke, Dmitri I Svergun, Harald Herrmann, Ueli Aebi, and Sergei V Strelkov. 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, Oct 2006.

[83] R. A. Speckman, A. Garg, F. Du, L. Bennett, R. Veile, E. Arioglu, S. I. Taylor, M. Lovett, and A. M. Bowcock. Mutational and haplotype analyses of families with familial partial lipodystrophy (dunnigan variety) reveal recurrent missense mutations in the globular c-terminal domain of lamin a/c. *Am J Hum Genet*, 66(4):1192–1198, Apr 2000.

[84] Stafford. Sedimentation velocity spins a new weave for an old fabric. *Curr Opin Biotechnol*, 8(1):14–24, Feb 1997.

[85] W. F. Stafford. Boundary analysis in sedimentation transport experiments: a procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile. *Anal Biochem*, 203(2):295–301, Jun 1992.

[86] P. M. Steinert, L. N. Marekov, and D. A. Parry. Diversity of intermediate filament structure. evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments. *J Biol Chem*, 268(33):24916–24925, Nov 1993.

[87] P. M. Steinert, M. L. Wantz, and W. W. Idler. O-phosphoserine content of intermediate filament subunits. *Biochemistry*, 21(1):177–183, Jan 1982.

[88] Sergei V Strelkov and Peter Burkhard. Analysis of alpha-helical coiled coils with the program twister reveals a structural mechanism for stutter compensation. *J Struct Biol*, 137(1-2):54–64, 2002.

[89] N. Stuurman, S. Heins, and U. Aebi. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol*, 122(1-2):42–66, 1998.

[90] M. Tazir, H. Azzedine, S. Assami, P. Sindou, S. Nouioua, R. Zemmouri, T. Hamadouche, M. Chaouch, J. Feingold, J. M. Vallat, E. Leguern, and D. Grid. Phenotypic variability in autosomal recessive axonal charcot-marie-tooth disease due to the r298c mutation in lamin a/c. *Brain*, 127(Pt 1):154–163, Jan 2004.

[91] F. Terzi, D. Henrion, E. Colucci-Guyon, P. Federici, C. Babinet, B. I. Levy, P. Briand, and G. Friedlander. Reduction of renal mass is lethal in mice lacking vimentin. role of endothelin-nitric oxide imbalance. *J Clin Invest*, 100(6):1520–1528, Sep 1997.

[92] F. Terzi, R. Maunoury, E. Colucci-Guyon, C. Babinet, P. Federici, P. Briand, and G. Friedlander. Normal tubular regeneration and differentiation of the post-ischemic kidney in mice lacking vimentin. *Am J Pathol*, 150(4):1361–1371, Apr 1997.

[93] S. N. Timasheff and L. M. Grisham. In vitro assembly of cytoplasmic microtubules. *Annu Rev Biochem*, 49:565–591, 1980.

[94] A. Todorova, B. Halliger-Keller, M. C. Walter, M-C. Dabauvalle, H. Lochmüller, and C. R. Müller. A synonymous codon change in the lmna gene alters mrna splicing and causes limb girdle muscular dystrophy type 1b. *J Med Genet*, 40(10):e115, Oct 2003.

[95] Diana M Toivola, Guo-Zhong Tao, Aida Habtezion, Jian Liao, and M. Bishr Omary. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol*, 15(11):608–617, Nov 2005.

[96] B. Tonomura, H. Nakatani, M. Ohnishi, J. Yamaguchi-Ito, and K. Hiromi. Test reactions for a stopped-flow apparatus. reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol and potassium ferricyanide by l-ascorbic acid. *Anal Biochem*, 84(2):370–383, Feb 1978.

[97] M. J. van Hemert, H. Y. Steensma, and G. P. van Heusden. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays*, 23(10):936–946, Oct 2001.

[98] Kensal E. van Holde W. Curtis Johnson P. Shing Ho. *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey 07458, 1998.

[99] W. A. Voter and H. P. Erickson. The kinetics of microtubule assembly. evidence for a two-stage nucleation mechanism. *J Biol Chem*, 259(16):10430–10438, Aug 1984.

[100] R. A. Walker, E. T. O'Brien, N. K. Pryer, M. F. Soboeiro, W. A. Voter, H. P. Erickson, and E. D. Salmon. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol*, 107(4):1437–1448, Oct 1988.

[101] K. Weber, U. Plessmann, and W. Ulrich. Cytoplasmic intermediate filament proteins of invertebrates are closer to nuclear lamins than are vertebrate intermediate filament proteins; sequence characterization of two muscle proteins of a nematode. *EMBO J*, 8(11):3221–3227, Nov 1989.

[102] A. Wegner. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*, 108(1):139–150, Nov 1976.

[103] Albrecht Wegner and Juergen Engel. Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophysical Chemistry*, 3:215–225, 1975.

[104] F. Wilcoxon. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics*, 1:80–83, 1945.

[105] K. C. Wu, J. T. Bryan, M. I. Morasso, S. I. Jang, J. H. Lee, J. M. Yang, L. N. Marekov, D. A. Parry, and P. M. Steinert. Coiled-coil trigger motifs in the 1b and 2b rod domain segments are required for the stability of keratin intermediate filaments. *Mol Biol Cell*, 11(10):3539–3558, Oct 2000.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Heidelberg, Juli 2007

Robert Kirmse