

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet für Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Assemblierung und Struktur von kleinen Hitzeschockproteinen

Andreas Kastenmüller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Klaus Köhler

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff
2. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 31.08.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 18.10.2011 angenommen.

Falls Gott die Welt geschaffen hat,
war seine Hauptsorge sicher nicht,
sie so zu machen, dass wir sie verstehen können.

Albert Einstein

Mein Dank gilt

als erstes Frau Prof. Dr. Sevil Weinkauf, durch die ich die Möglichkeit erhalten habe, im Bereich der biomolekularen Elektronenmikroskopie zu arbeiten. Neben diesem Thema ermöglichte sie mir auf diversen Dienstreisen Neues zu sehen und zu erleben. Abseits der Arbeit war das familiäre Verhältnis im Arbeitskreis und die nicht endenwollenden Diskussionen und Hilfen immer eine große Bereicherung für mein Leben.

Als zweites danke ich Dr. Nathalie Braun, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit so nicht entstanden. Zudem wäre mein Arbeitsplatz ohne sie sehr einsam gewesen.

Dr. Johannes Scheuring, der immer Kaffee für mich Teetrinker übrig hatte, und sich bei meinen biochemischen Fragen immer sehr geduldete. Auch an den ruhigen/einsamen Freitagen war er immer für mich da.

Frau Dr. Marianne Hanzlik. Sie stand mir immer bei elektronenmikroskopischen Fragen bei. Durch ihre langjährige Erfahrung konnte ich mein Wissen enorm erweitern.

Dr. Yannis Georgalis, der stets versuchte, seine Lichtstreuexpertise in einfachen Worten an mich weiter zu vermitteln.

Ralf Glaubermann, ohne den unsere IT-Infrastruktur nicht funktionieren würde.

Mein Dank gilt auch allen Studentinnen und Studenten, die mir während meiner Promotion bei meinem Thema geholfen haben, namentlich: Evi Stahl, Cedrik Schöne, Christopher Stratil, Tatjana Braun, Katharina Papsdorf, Yvonne Köhler, Malvina Vogler, Martha Thellmann und Christoph Blossey.

Zudem möchte ich mich bei dem gesamten Biotechnologie Lehrstuhl für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, ohne die mein Studium und anschließende Promotion nicht möglich gewesen wären. Sie haben mich jederzeit unterstützt und mir immer den Rücken gestärkt.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro = 10^{-6}
2D	zwei-dimensional
3D	drei-dimensional
Å	Angström = 10^{-10} m
A	Amper
AS	Aminosäure
AM	Amoniummolybdat
APS	Ammoniumpersulfat
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
CCD	Charge-coupled device
CCF	Cross correlation function
CS	Citrat Synthase
CTF	Contrast transfer function
Da	Dalton = 1u = $1,660538782 \cdot 10^{-27}$ kg
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
eV	Elektronenvolt
FSC	Fourier shell correlation
FT	Fouriertransformation
g	Gramm
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
K	Kelvin
kg	Kilogramm = 10^3 g
kV	Kilovolt = 10^3 V
l	Liter
LMW	Low molecular weight marker
M	Molar (mol/l)
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm = 10^{-3} g
min	Minute

MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MRA	Multireferenz Analyse
MSA	Multivariate statistische Analyse
nm	Nanometer = 10 ⁻⁹ meter
NMR	Kernspinresonanz
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	Potentia hydrogenium
PW	Phosphorwolframsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (<i>size exclusion chromatographie</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sHsp	kleines Hitzeschockprotein(<i>small heat shock protein</i>)
S/N	Signal to noise ratio
SNR	Signal to noise ratio
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TXRF	Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TRFA) (<i>Totalreflexion X-Ray fluorescence, TXRF</i>)
UA	Uranylacetat
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Von der Lupe zum Transmissionselektronenmikroskop – Der Weg zum Nanokosmos	5
1.2. Biomolekulare Transmissionselektronenmikroskopie	10
1.3. Drei-dimensionale Strukturanalyse von Biomakromolekülen und makromolekularen Komplexen mittels Einzelpartikel-Techniken	11
1.4. Hybridmethoden	15
1.5. Kleine Hitzeschockproteine	16
2. Fragestellung	20
3. Kleine Hitzeschockproteine aus <i>Toxoplasma gondii</i>	22
3.1. Kenntnisstand	22
3.2. Elektronenmikroskopische Analyse der sHsps aus <i>T. gondii</i>	23
3.3. Zusammenfassung und Diskussion	24
4. Kleine Hitzeschockproteine aus <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
4.1. Kenntnisstand	26
4.2. Elektronenmikroskopische Analyse von Hsp16.11 und Hsp16.2	30
4.2.1. Hsp16.11	30
4.2.2. Hsp16.2	32
4.3. Elektronenmikroskopische Analyse von Hsp16.41 und Hsp16.48.....	34
4.3.1. Hsp16.41	34
4.3.2. Hsp16.48	38
4.4. Sip-1	40
4.4.1. Generelle Eigenschaften.....	40
4.4.2. Redoxabhängige Oligomerisierung von Sip-1.....	42
4.4.3. Quartärstruktur von Sip-1/Negativ Kontrastierung	46
4.4.4. Quartärstruktur von Sip-1/Kryo-Elektronenmikroskopie	50
4.4.5. Verteilung der Sip-1 Oligomere	59
4.4.6. Modellierung der Struktur des Sip-1 Oligomers.....	60
4.5. Zusammenfassung und Diskussion	64

5. Humanes αA- und αB-Kristallin	74
5.1. Kenntnisstand	74
5.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	77
5.3. Zusammenfassung und Diskussion	82
6. Materialien und Methoden	85
6.1. Materialien	85
6.1.1. Proteine	85
6.1.2. Chemikalien	85
6.1.3. Geräte	85
6.1.4. Software	86
6.2. Methoden	86
6.2.1. Biochemische Proteinanalytik	86
6.2.2. Biophysikalische Proteinanalytik.....	90
6.2.3. Transmissionselektronenmikroskopie	92
6.2.4. Bildverarbeitung und 3D-Rekonstruktion	93
6.2.5. Strukturmodellierung und Fitting.....	97
7. Zusammenfassung	98
8. Summary	102
Referenzen	106
Erklärung	118
Publikationen	119

1. Einleitung

1.1. Von der Lupe zum Transmissionselektronenmikroskop - Der Weg zum Nanokosmos

Die Suche nach einem geeigneten Hilfsmittel um Objekte vergrößert darzustellen, bzw. die Geschichte der „Mikroskopie“ beginnt sehr früh. Die erste glaubwürdige Niederschrift einer Linse zum Vergrößern von Objekten stammt aus dem ersten Jahrhundert vor Christus: Seneca, Dozent von Kaiser Nero, beschreibt den „Linseneffekt“ mit den Worten, „Briefe, klein und undeutlich, werden vergrößert und deutlicher durch eine mit Wasser gefüllte Glaskugel lesbar“. Ob Seneca den Ursprung der Vergrößerung entdecken konnte, ist der Geschichte nicht zu entnehmen. Der älteste Beweis einer vergrößernden Linse ist im zehnten Jahrhundert nach Christus zu datieren. Der arabische Gelehrte Alhazen verfasst die Arbeit „Optische Sammlungen“, in der optische Prinzipien/Phänomene, die Anatomie des Auges und der Strahlengang in der Retina behandelt werden. Er beschreibt die Vergrößerung von Objekten durch eine gewölbte Glasoberfläche, stellt hieraus Lesesteine her und gilt damit als Erfinder der Lupe (Piersing, 2009). Erst im dreizehnten Jahrhundert wird die Brille erfunden, mit der Fehlsichtigkeit durch zwei gewölbte Glaslinsen ausgeglichen wird. Die bis jetzt älteste bekannte Darstellung einer Brille findet man im Kapitelsaal der Kirche San Nicol in Trivisio nahe Venedig (Abb. 1a).

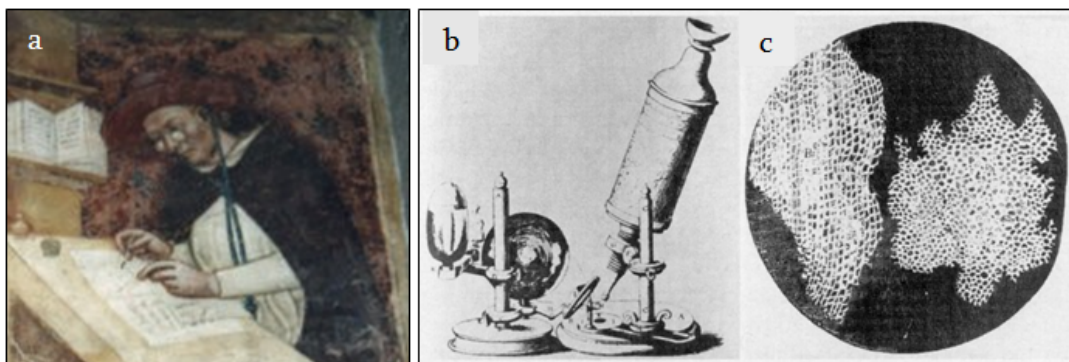


Abb. 1: a) Ausschnitt aus dem von Tomaso di Modena im Jahr 1352 angefertigte Portrait von Kardinal Hugo de Province mit seiner Nietbrille. Ein Mikroskop von Hooke (b) mit dem Bild eines betrachteten Korkstückes (c). Der Aufbau des Korks aus einzelnen Zellen ist gut zu erkennen.

Die Erfindung des ersten Mikroskops mit mehreren Linsen (Verbund-Mikroskop) wird dem niederländischen Optiker Hans Janssen und seinem Sohn Zacharias zugeschrieben (Harting & Theile, 1866). Diese bauen um 1595 in Middelburg ein 45 cm

langes Instrument aus drei in sich zusammenschiebbaren Röhren, welches je nach Auszugslänge drei- bis 9-fach vergrößert. Unabhängig von den beiden Niederländern entwickelt Galileo Galilei, ein Mitglied der „*Accademica die Lincei*“ in Rom, deren Mitglieder den Term „*microscopicum*“ geprägt haben, um 1610 ein Mikroskop, indem er sein „*tubum opticum*“, bzw. Teleskop, invertiert.

Der nächste Schritt zu höheren Vergrößerungen stellt die Einführung einer dritten Linse in das Mikroskop (Abb. 1b) durch Robert Hooke (1635-1703) dar. Hooke betrachtet dünne Korkschnitte unter dem Mikroskop (Abb. 1c) und beschreibt den Korkaufbau als ein Netzwerk von Stützgewebe, welches kleine Lufträume umschließt. Da ihn diese Struktur an sein Mönchszimmer erinnert, nennt er sie „Zelle“.

Antony van Leewenhoek (1632-1723) konstruiert relativ einfache, allerdings mit den damals besten Linsen ausgestattete Geräte, die bis zu 270-fach vergrößern können (Hannover, 1854). Zu seinen bedeutendsten Beobachtungen gehören Algen, Wimperntierchen, lebende Bakterien in der Mundflora, Muskelzellen, Einzeller, Spermien, Blutzellen, Nematoden, Geißeltierchen etc. (Leewenhoek, 1677).

Im Laufe der Zeit werden Limitierungen der Mikroskope durch die polychromatische Strahlenquelle und die Geometrie der Linsen erkannt und Methoden entwickelt, um diese zu beheben. Chester More Hall platziert um 1730 eine konkave und konvexe Linse mit unterschiedlichen Dispersionseigenschaften nahe zueinander und korrigiert somit weitgehend die chromatische Aberration. Joseph Jackson Lister erkennt in 1830, dass mehrere aneinander gereihte „schwache“ Linsen geringere sphärische Aberration bewirken, und leistet damit einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops.

Grundlegende Gesetzmäßigkeiten zur optischen Abbildung und zur beugungsbegrenzten Auflösung im Lichtmikroskop werden um 1870 von Ernst Abbe zusammengefasst. Nach der Abbe-Formel wird die Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops durch die Wellenlänge des Lichtes sowie durch den Öffnungswinkel der Sammellinse definiert:

$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \theta}$$

mit d , kleinster Abstand zweier getrennter Punkte, die getrennt beobachtet werden können (Punktauflösung); λ , Wellenlänge der Strahlung; θ , Öffnungswinkel der Sammellinse; n , Brechungsindex und $n \cdot \sin \theta$, numerische Apertur. Somit wird mit einem klassischen Lichtmikroskop bei einer λ von ca. 500 nm (sichtbares Licht) und einer numerischen Apertur von maximal 1,4 eine Auflösung von ca. 0,2 μm erreicht. Die

Formel ergibt aber auch, dass höhere Auflösungen durch die Verringerung der Wellenlänge der Strahlung erreicht werden können. Ausgehend von diesem physikalischen Zusammenhang entwickeln Ernst Ruska und Max Knoll in 1931 das erste Transmissionselektronenmikroskop (TEM) (Knoll & Ruska, 1932; Ruska, 1987), welches Elektronen als Strahlenquelle nutzt (Abb. 2).

Die Wellenlänge eines Elektrons ist von dessen Geschwindigkeit bzw. Energie abhängig und somit variabel einstellbar. Elektronen, die über eine Potentialdifferenz von 100 kV beschleunigt werden, besitzen eine Energie von 100 keV bzw. eine Wellenlänge von 0,0037 nm und ermöglichen somit eine Punktauflösung im atomaren Bereich. Bei höheren Beschleunigungsspannungen bzw. Elektronengeschwindigkeiten muss der Massenzuwachs berücksichtigt und die Masse des Elektrons relativistisch korrigiert werden.

In einem TEM (Abb. 2), dessen Aufbau dem eines Lichtmikroskops sehr ähnlich ist, werden aus einer Elektronenquelle emittierte Elektronen durch elektromagnetische Linsen auf eine Probe fokussiert und nach der Wechselwirkung mit der Probe zur Erzeugung eines Bildes herangezogen (s.u. Bildentstehung). Zur Gewährleistung einer möglichst großen freien Weglänge der Elektronen und zur Vermeidung von ungewünschten Wechselwirkungen mit Restgas-Molekülen wird das TEM im Hochvakuum betrieben (Zierold, 1995).

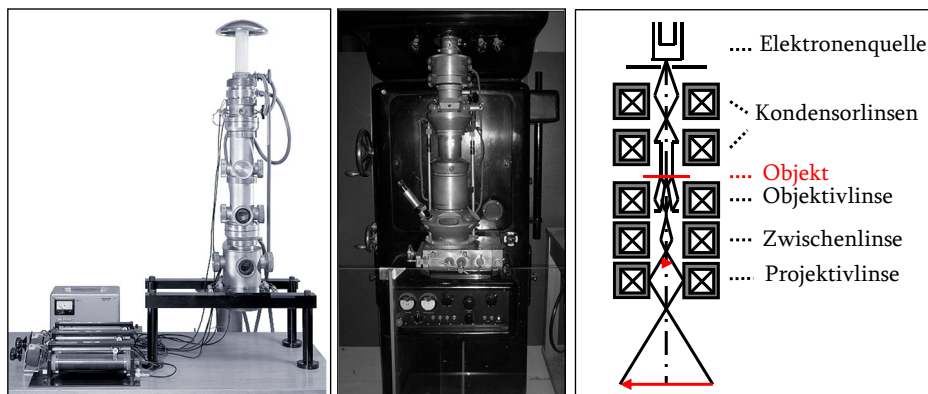


Abb. 2: Das von Ernst Ruska und Max Knoll entwickelte TEM (links) und erstes kommerzielles Gerät hergestellt von Fa. Siemens (mitte). Bild: Deutsches Museum (<http://www.deutsches-museum.de/sammlungen/ausgewaehlte-objekte/meisterwerke-v/elektronenmikroskop/>). Aufbauprinzip eines TEMs (rechts).

In konventionellen TEMs werden als Elektronenquelle meist Wolfram-Haarnadel- oder LaB₆-Kathoden eingesetzt. Bei solchen Glühkathoden werden thermisch erzeugte Elektronen von einem sogenannten „Wehnelt-Zylinder“ zum „cross-over“ ge-

bündelt (Durchmesser ca. 20-50 μm), durch die Anode anhand eines einstellbaren Potentials (meist 100 bis 400 kV) beschleunigt und durch mehrere Kondensoren auf die Probe gelenkt. In hochauflösenden TEMs werden Feldemissionskathoden (FEG) bevorzugt, die durch ihre höheren Stromdichten und Helligkeiten bzw. geringeren Strahldurchmesser und Elektronenenergiebreiten für wesentlich bessere Abbildungsbedingungen sorgen.

Beim Auftreffen der Elektronen auf das Objekt tritt ein Großteil ohne eine Wechselwirkung durch das Objekt hindurch, der andere Teil wird durch die Interaktion mit den Atomen des Objektes entweder elastisch oder unelastisch gestreut. Die gestreuten Elektronen werden durch die Objektivlinse zur Interferenz mit dem Primärstrahl gebracht. Das so erzeugte Zwischenbild wird durch folgende Projektivlinsen weiter vergrößert. Das resultierende Bild wird entweder auf einem Leuchtschirm betrachtet oder auf ein Aufzeichnungsmedium, Photoplatte oder CCD Kamera, aufgenommen.

Kontrast- und Bildentstehung:

Der Abbildung im TEM liegt die Streuung der Elektronen zu Grunde. Bei der *elastischen Streuung* werden die auftreffenden Elektronen an den positiven Atomkernen der Probe in Abhängigkeit von der Kernladungszahl und ihrer Geschwindigkeit ohne einen nennenswerten Energieverlust zu großen Raumwinkeln abgelenkt. Die Ablenkung ist umso größer, je langsamer die Elektronen sind, je näher sie den Kern passieren und je höher die Kernladungszahl ist. Durch das Objekt stark abgelenkte Elektronen werden durch die Objektivblende abgefangen und wirken kontrastverstärkend (*Streuabsorptions-* bzw. *Amplitudenkontrast*).

Bei der *unelastischen Streuung* treten die auftreffenden Elektronen mit den Hüllenelektronen der Probe in Wechselwirkung. Dabei übertragen sie einen Teil ihrer Energie auf die Hüllenelektronen und werden zu kleineren Raumwinkeln gestreut. Die aus dem Energieverlust resultierende größere Wellenlänge der transmittierten Elektronen verursacht Fehler, die den Kontrast bzw. die Auflösung verringern.

Bei der Abbildung von kleinen Bereichen dünner Proben (<20 nm) bzw. von biologischen Objekten, die nahezu ausschließlich aus leichten Elementen (C, O, H, N) bestehen und keinen Amplitudenkontrast erzeugen, kommt es bei bestimmten Abbildungsbedingungen und bei hohen Vergrößerungen zum *Phasenkontrast*. Phasenkontrast entsteht durch die Interferenz zwischen den ungestreuten und den gestreuten

bzw. phasenverschobenen Elektronen und ist abhängig vom Fokus. Außerdem trägt die sphärische Aberration der Linsen zum Phasenkontrast erheblich bei.

Die Beziehung zwischen der Wellenfunktion nach dem Durchdringen des Objekts und der resultierenden Bildintensität wird durch die *Phasenkontrasttransfertheorie* behandelt. Für schwache Phasenobjekte wird die durch die sphärische Aberration und Defokus bedingte „Bildverzerrung“ durch die *Phasenkontrasttransferfunktion* (*contrast transfer function, CTF*) beschrieben (Wade, 1992):

$$CTF(k) = \sin\left(\frac{\pi}{2}\left[C_s \lambda^3 k^4 + \frac{1}{2} \Delta z \lambda k^2\right]\right)$$

mit k , Ortsfrequenz; C_s , sphärische Aberration, λ , Wellenlänge und z , Defokus.

Während die sphärische Aberration eine Gerätekonstante ist, sind die Wellenlänge und der Defokus variabel. Da aber während einer Messung die Beschleunigungsspannung und somit die Wellenlänge nicht geändert werden, ist diese auch als konstant anzunehmen. Damit wird die CTF nur durch die Änderung der Fokuseinstellung beeinflusst, bzw. der Kontrast ist vom gewählten Defokus abhängig.

Die CTF gibt die vom Gerät übertragenen Kontraste in Abhängigkeit von der Objektgröße (Frequenzen) wieder. Aufgrund der Sinusfunktion oszilliert der Kontrast im Frequenzraum (Abb. 3). Positive Werte erscheinen hell und negative dunkel. An den Nullstellen der CTF werden keine Intensitäten übertragen und es ergibt sich bei diesen Frequenzen somit kein Kontrast. Bei größer werdendem Defokus verschiebt sich die erste Nullstelle zu immer niedrigeren Frequenzen. Nach der ersten Nullstelle ändert die CTF ihr Vorzeichen und befindet sich im negativen Bereich, hierbei wird der Kontrast im Bild invertiert. Die CTF wird durch die polychromatische Strahlung bei höheren Frequenzen gedämpft und fällt auf Null ab. Die Frequenz, bei der die CTF gegen Null geht, entspricht der Informationsgrenze. Durch Phasenumkehr der negativen Werte in Positive (*sog. „phase flipping“*) kann der Frequenzbereich auch bis über den ersten Schnittpunkt der CTF mit Null hinaus genutzt werden. Um die Nullstellen mit Information (Signal) zu füllen, werden bei der Bildverarbeitung diverse Datensätze mit unterschiedlichen Defoki und somit unterschiedlichen Nullstellen der CTF vereint. Bei biologischen Proben wird der Defokusbereich für die Aufnahmen in der Regel immer groß gewählt (0,5 bis 4 μm) da hierdurch eine Signalübertragung bei großen Frequenzen erfolgt, die entscheidend für die Lokalisation der Objekte sind.

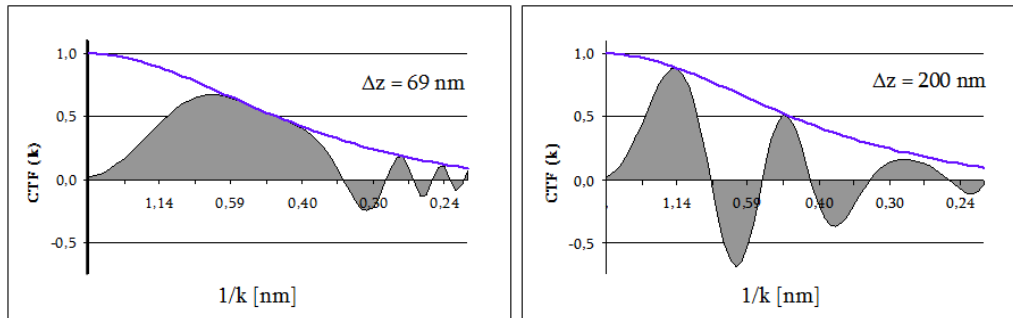


Abb. 3: Theoretisch errechnete Phasenkontrasttransferfunktionen in Abhängigkeit vom Defokus. Links: *Scherzerfokus* von 69 nm. Rechts: Defokus von 200 nm. Den Berechnungen liegen folgende Werte zugrunde: Beschleunigungsspannung 120 kV, sphärische Aberration 1,4 mm, chromatische Aberration 1,8 mm, Energieaufspreizung der Elektronenquelle 1 eV. Blaue Linie entspricht der Dämpfung der CTF.

1.2. Biomolekulare Transmissionselektronenmikroskopie

Biologische Systeme erfordern vor der elektronenmikroskopischen Untersuchung bestimmte Präparationsschritte: (i) Da sie einen hohen Wassergehalt haben, muss ihre Vakuumbeständigkeit durch vorhergehende Präparation gewährleistet werden. (ii) Sie bestehen aus Elementen mit niedriger Kernladungszahl (C, O, H, N), geben kaum Amplitudenkontrast und müssen daher kontrastiert werden. (iii) Sie erleiden durch den Elektronenstrahl Strahlenschäden (Ionisation, Bindungsbrüche, Aufladung etc.) (Glaeser, 2008). Inzwischen existieren jedoch neue Vorgehensweisen und Technologien, die es erlauben, biologische Objekte unter Erhaltung ihrer nativen Struktur mit guter Durchstrahlbarkeit, Vakuum- und Strahlenbeständigkeit sowie ausreichendem Kontrast zu präparieren, sowie diese weitgehend „zerstörungsfrei“ zu beobachten.

Probenpräparation:

Eine gebräuchliche Methode zur Erhöhung des Kontrastes von biologischen Proben ist die sogenannte „*Negativ Kontrastierung*“ (*negative staining*). Hierzu wird die auf einen Träger adsorbierte Probe in ein elektronendichtes Material, z.B. in ein Schwermetallsalz (*Stain*), eingebettet, deren Atome einen hohen Kontrast und gewissen Strahlungsschutz bieten. Die Schwermetallsalzlösung umgibt die Makromoleküle und dringt eventuell in deren Poren ein. Die Streuung des Elektronenstrahls am umgebenden Stain bedingt Bilder mit hohem Kontrast, wobei die äußere Umrandung und die inneren Hohlräume des Objekts abgebildet werden (Bremer *et al.*, 1992). Obwohl die durch Negativ Kontrastierung erreichbare Auflösung durch mehrere Faktoren

limitiert wird, wurde diese einfache und schnelle Methode häufig mit Erfolg benutzt, um 3-dimensionale Rekonstruktionen von großen makromolekularen Komplexen zu ermitteln (Kiselev *et al.*, 1990; Bremer *et al.*, 1992; Harris & Scheffler, 2002; Burgess *et al.*, 2004; Ohi *et al.*, 2004; Haslbeck *et al.*, 2008; Hudson *et al.*, 2009; Peschek *et al.*, 2009; Katayama *et al.*, 2010).

Für Untersuchungen im Hochauflösungsbereich wird *Kryo-Elektronenmikroskopie* (Kryo-EM) eingesetzt (Adrian *et al.*, 1984; van Heel *et al.*, 2000; Cheng & Walz, 2009). Hier werden biologische Objekte *vitrifiziert* (Dubochet *et al.*, 1983), d.h. dünne Flüssigkeitsfilme von Suspensionen von Makromolekülen bzw. makromolekularen Komplexen durch sehr schnelles Abkühlen (Abkühlgeschwindigkeiten von 10^6 – 10^7 K/s) in amorphem Eis fixiert und anschließend im TEM im eingefrorenen Zustand (*frozen-hydrated*) bei flüssig Stickstoff- oder flüssig Helium-Temperaturen beobachtet. Durch diese Vorgehensweise werden native Strukturen weitgehend erhalten, der physiologische Zustand nur minimal beeinträchtigt, Adsorptionsartefakte vermieden und die Strahlenschäden während der Beobachtung erheblich verringert. Zusammen mit Methoden, die eine weitgehend zerstörungsfreie Abbildung unter Verwendung von niedrigen Elektronendosen („*low-dose*“ oder „*minimal-dose*“ *Techniken*) ermöglichen, erlaubt die Kryo-EM Auflösungen im sub-molekularen Bereich.

Den Vorteilen der Kryo-EM steht der geringe Kontrast –geringer Dichteunterschied zwischen dem Protein (ca. $1,4 \text{ g/cm}^3$) und dem umgebenden Eis (ca. $0,9 \text{ g/cm}^3$)– der Aufnahmen als Nachteil gegenüber. Außerdem werden biologische Objekte wegen ihrer Strahlenempfindlichkeit bei möglichst geringen Elektronendosen abgebildet. Zusammen mit weiteren Rauschquellen wie Elektronenrauschen, Vibrationen, etc. erhält man bei der Kryo-EM Aufnahmen mit geringem *Signal/Rausch-Verhältnis* (*S/N* oder *SNR*, *signal-to-noise ratio*).

1.3. Drei-dimensionale Strukturanalyse von Biomakromolekülen und makromolekularen Komplexen mittels Einzelpartikel-Techniken

TEM-Aufnahmen von 3-dimensionalen (3D) Objekten stellen 2-dimensionale (2D) Projektionen des 3D-Objektes dar. Es ist möglich, aus unterschiedlichen Projektionsansichten aufgenommenen 2D-Projektionsbildern 3D-Strukturinformation zu extrahieren (3D-Rekonstruktion). Die dazu verwendeten Methoden unterscheiden sich in ihren Vorgehensweisen je nach Redundanz des untersuchten Objektes, ob z.B. zelluläre Strukturen (Elektronentomographie) (Bárcena & Koster, 2009), 2D-Kristalle

(Elektronenkristallographie) (Reichow & Gonen, 2009) oder einzelne Partikel (Einzelpartikel-Rekonstruktion) (Elad *et al.*, 2008; Frank, 2010) vorliegen.

Biomakromolekulare Komplexe aus zahlreichen Untereinheiten, die in der Zelle wichtige Funktionen ausüben, sind meist flexibel und heterogen. Außerdem kommen sie manchmal nur in einigen wenigen Kopien und nur kurzlebig vor. Diese Eigenschaften erschweren ihre Kristallisation bzw. die Analyse ihrer Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse erheblich. Bei solchen Objekten erweist sich die Kryo-EM kombiniert mit Einzelpartikel-Rekonstruktionstechniken immer hilfreicher, da die Methode die Strukturanalyse bei sub-molekularer Auflösung an *in vitro* reassemblierten, individuellen makromolekularen Komplexen (*Einzelpartikel*) ermöglicht.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von individuellen Biomakromolekülen enthalten verschiedene Projektionen des untersuchten Objektes, da diese auf dem Träger (Negativ Kontrastierung) aber vor allem im Eis (Kryo-EM) unterschiedlich orientiert sein können. Hinzu kommen meistens zusätzliche Heterogenitäten, die aus unterschiedlichen Konformationen des Biomakromoleküls (Mellwig & Böttcher, 2001; White *et al.*, 2004), oder gar aus unterschiedlichen Biomakromolekülen stammen können. Daher werden bei Einzelpartikel-Rekonstruktionstechniken zunächst Sortierungsalgorithmen eingesetzt, um heterogene *Gesamtpopulationen* in homogene *Subpopulationen* zu trennen (*Multivariate Statistik und Klassifizierung*). Im nächsten Schritt werden diese zur Erhöhung des SNR Mittelungsverfahren unterworfen (*Bildmittelung*). Liegen schließlich (viele) unterschiedliche Projektionen des gleichen Biomakromoleküls vor, so werden diese durch verschiedene mathematische Prozeduren zum 3D-Objekt zusammengesetzt (3D-Rekonstruktion) (Penczek *et al.*, 2006; Sanz-García *et al.*, 2010).

Multivariate Statistische Analyse und Klassifizierung:

Zur Trennung von heterogenen Datensätzen sowie zur Identifizierung von gleichen/ähnlichen Projektionen des gleichen Objektes, wird die *Multivariate Statistische Analyse (MSA)* (van Heel & Frank, 1981; van Heel, 1984) eingesetzt.

Jedes Bild mit pxp Bildpunkten (p , *Pixel, picture element*) kann als ein Datenpunkt in einem pxp -dimensionalen Raum beschrieben werden, in dem die Achsen den einzelnen Bildpunkten und die Koordinaten den Grauwerten der Bildpunkte entsprechen. Ähnliche Bilder liegen in diesem Raum nahe beieinander, unterschiedliche weit voneinander entfernt. Durch die Multivariate Statistik wird ein neues Koor-

koordinatensystem erzeugt, wobei die Achsen in Richtung absteigender Varianzen zeigen. Die erste Achse zeigt in Richtung der größten Varianz und beschreibt den Hauptunterschied aller Bilder. Die zweite Achse (senkrecht zur ersten) zeigt in Richtung der verbleibenden größten Varianz. Die dritte Achse (auf die anderen beiden Achsen senkrecht) zeigt in Richtung der dritten verbleibenden größten Varianz und so weiter. Die neuen Achsen beschreiben somit die Unterschiede innerhalb eines Datensatzes, die nach ihrer Wichtigkeit geordnet sind. Aus den Achsen, bzw. aus dem neuen Koordinatensystem lassen sich *Eigenwerte*, *-vektoren* und *-bilder* ablesen. Anhand der Linearkombination der Eigenbilder kann dann jedes Bild des Datensatzes beschrieben werden, wobei dies gleichzeitig einer Datenreduktion entspricht. So werden z.B. bei 10.000 Einzelbildern mit 100x100 Bildpunkten unter der Annahme von 20 Eigenbildern nur $2 \cdot 10^5$ Bildpunkte miteinander simultan verglichen, anstatt 10^8 Bildpunkte zu berücksichtigen. In einem nächsten Schritt werden die Bilder innerhalb des neuen Koordinatensystems klassifiziert, d.h. Projektionen, die sich sehr ähnlich sind bzw. im neuen Koordinatensystem sehr nahe beieinander stehen, in einer Klasse zusammengefasst. Dabei sollen die Abstände der Bilder innerhalb einer Klasse möglichst gering, zwischen den Klassen möglichst gross sein. Damit erhält man unterschiedliche Klassen mit geringer Varianz.

Einzelpartikel-Mittelung:

Zur Erhöhung des S/N wird die Mittelung herangezogen, die die strukturelle Redundanz in den Projektionen ausnutzt. Dabei werden reproduzierbare Informationen, d.h. identische Objektdetails verstärkt, während das Rauschen, d.h. stochastisches Schwanken in den Grauwerten minimiert wird. Durch Mittelung über N identische Ansichten eines Objektes lässt sich das S/N um den Faktor \sqrt{N} erhöhen.

Bei der Berechnung eines Summenbildes werden die digitalisierten Projektionsbilder Bildpunkt für Bildpunkt aufsummiert. Ein Mittelungsbild wird erhalten, wenn das Summenbild durch die Anzahl der darin enthaltenen Einzelbilder dividiert wird. Eine Mittelung ist nur dann sinnvoll, wenn die einzelnen Projektionsbilder von dem gleichen Objekt stammen, die gleiche Ansicht des Objektes darstellen, sowie die gleiche Orientierung und Position in der Ebene haben. Sind die beiden ersten Voraussetzungen erfüllt, so werden die Translationsverschiebungen von einzelnen Projektionen mit Hilfe der *Kreuzkorrelationsfunktion* (*cross correlation function*, *CCF*), die relativen Verdrehungen anhand der *Rotationskorrelationsfunktion* (*rotational correlation function*, *RCF*) bestimmt und korrigiert (*Translations- und Rota-*

tionsalignierung). Korrelationsfunktionen werden üblicherweise auch zum Finden und Ausschneiden von elektronenmikroskopischen Partikelprojektionen herangezogen (Nicholson & Glaeser, 2001).

Wenn ein Datensatz verschiedene Ansichten eines Objektes enthält, so werden für die Alignierungen mehrere Referenzen herangezogen (*Multireferenzalignierung, MRA*) (Frank, 1996). Die Auswahl der Referenz(en) für die Alignierung spielt bei der Bildverarbeitung eine entscheidende Rolle. So können Projektionsbilder, die hohes Rauschen aber kein deutliches Motiv besitzen (geringes S/N), deutlich das Motiv der Referenz zeigen, zu der sie aligniert wurden (*model/reference bias*).

3D-Rekonstruktion:

TEM-Aufnahmen von im Eis eingebetteten Objekten stellen 2D-Dichteprojektionen von 3D-Objekten dar und enthalten Informationen über die innere Struktur des Objektes entlang der Projektionsrichtung. Während eine Dichteprojektion eines 3D-Objektes keine Rückschlüsse auf die 3D-Struktur zulässt, kann aus mehreren 2D-Dichteprojektionen unter verschiedenen Ansichten (d.h. Projektionsrichtungen) des 3D-Objektes dessen 3D-Struktur durch Rückprojektion rekonstruiert werden (RADON-Projektionstheorem) (Abb. 4) (Crowther *et al.*, 1970). Bei der Rückprojektion wird die Helligkeit in jedem Punkt des Projektionsbildes im 3D-Raum entlang der Projektionsrichtung gleichmäßig zurückprojiziert (*back projection*). Die Aufsummation ergibt ein (fehlerhaftes) 3D-Modell des ursprünglichen Objektes. Die Anzahl der notwendigen Projektionen hängt dabei z.B. von den Symmetrieeigenschaften des Objektes, den Projektionsrichtungen und der angestrebten Auflösung ab.

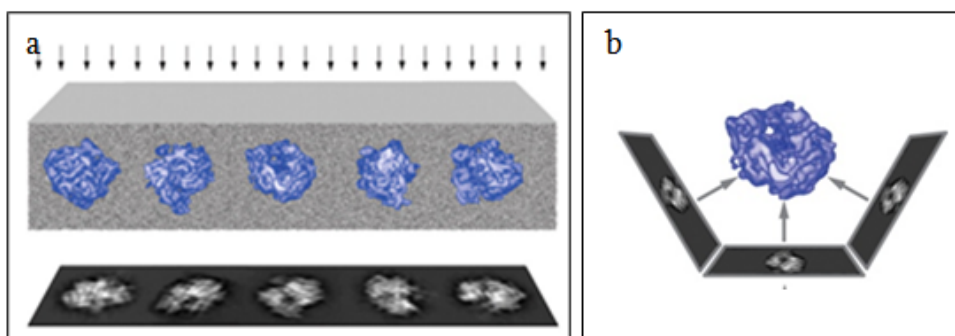


Abb. 4: Prinzip der 3D-Rekonstruktion (nach Mitra & Frank, 2006). **a)** Aufzeichnung der 2D-Projektionsbilder eines im Eis eingebetteten Objektes aus unterschiedlichen Richtungen. **b)** Rückprojektionen der 2D-Projektionsbilder zum 3D-Objekt.

Für die Berechnung eines 3D-Modells ist die Kenntnis der relativen Orientierung der einzelnen Projektionsbilder zueinander notwendig (Thuman-Commike, 2001; Zhou, 2008). Die zugehörigen Winkel (Eulerwinkel) werden z.B. mittels „*angular reconstitution*“ bestimmt (van Heel, 1987; van Heel *et al.*, 2000). Dabei wird das „*central sectioning theorem*“ genutzt (Crowther *et al.*, 1970; Gilbert, 1972), nach dem eine 2D-Fouriertransformation (FT) einer beliebigen 2D-Projektion einer 3D-Dichteverteilung einen zentralen Schnitt (durch den Mittelpunkt) durch die 3D-FT der 3D-Dichteverteilung darstellt. Demnach stellen zwei unterschiedliche Projektionen zwei unterschiedliche zentrale Schnitte der 3D-Dichteverteilung im Fourierraum dar. Das gleiche Prinzip gilt in den „*common lines*“ (van Heel *et al.*, 2000): Zwei unterschiedliche Projektionen des gleichen 3D-Objekts besitzen eine gemeinsame Linie im Fourierraum und in Analogie dazu auch eine gemeinsame Linie in der 1D-Projektion (*Sinogramm*) des 2D-Bildes. Durch die *Sinogramm-Korrelation* können die Projektionswinkel während der „*angular reconstitution*“ bestimmt werden. Zusätzlich kann über die Korrelation abgeschätzt werden, ob zwei Projektionen zu dem gleichen 3D-Objekt gehören. Nach der Erstellung eines ersten Modells werden Rückprojektionen dieses Modells mit einzelnen Projektionsbildern bzw. mit den Klassenmittelungen verglichen, wodurch die Lage der Einzelbilder in der Rekonstruktion verfeinert werden kann (*anchor-set refinement*). Nach mehreren iterativen Zyklen erhält man das verbesserte, finale 3D-Modell (Leschziner & Nogales, 2007).

1.4. Hybridmethoden

Die mittels Kryo-EM/3D-Rekonstruktion erhaltenen 3D-Modelle (Kernpotentialdichtekarten) tragen zum Verständnis der Struktur, Dynamik und Funktion von makromolekularen Komplexen bei. So werden immer häufiger „Momentaufnahmen“ von unterschiedlichen Zuständen solcher Komplexe, wie sie z.B. nach Konformationsänderungen oder Ligandenbindung auftreten, kombiniert, um das Objekt „in Aktion“ zu visualisieren und „Rückschlüsse“ auf die Funktionsmechanismen zu ziehen.

Biomolekulare Transmissionselektronenmikroskopie spielt heute neben der Röntgenkristallographie und der Kernspinresonanzspektroskopie (*NMR, nuclear magnetic resonance*) eine immer wichtigere Rolle. Diese Techniken ergänzen sich gegenseitig und werden in den sogenannten „*Hybridmethoden*“ zur Strukturanalyse von großen und/oder heterogenen Komplexen kombiniert eingesetzt. Die Röntgenkristallographie nutzt die Diffraktion von Röntgenstrahlen an geordneten Kristallen aus. Der Erhalt von hinreichend großen, geordneten Kristallen ist aber gerade bei heterogenen

makromolekularen Komplexen häufig nicht möglich. NMR kann Daten zur Struktur und Dynamik von Biomakromolekülen in Lösung liefern, sie ist jedoch in der Größe der zu untersuchenden Objekte beschränkt (bis zu 40 kDa). In Hybridmethoden werden durch die beiden Methoden ermittelte, hochaufgelöste Domänen- oder Untereinheitenstrukturen von Proteinen oder Proteinkomplexen in die durch Einzelpartikel-Kryo-EM ermittelte Gesamtstruktur bei moderater Auflösung modelliert (Stewart *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2003; Fabiola & Chapman, 2005; Lindert *et al.*, 2009). Damit werden Informationen über die Assemblierung, intramolekulare Wechselwirkungen, Funktion und Dynamik des gesamten makromolekularen Komplexes erhalten, die mit der Kenntnis der atomaren Strukturen der Einzelkomponenten nicht zugänglich sind.

Die Hybridstrategien sind nicht auf die Kombination der o.g. Methoden beschränkt. So werden inzwischen immer mehr Strukturmodelle basierend auf Homologie-Modellierung oder spektroskopischen Daten in die Kryo-EM-Dichten eingepasst.

1.5. Kleine Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (Hsps) bilden eine hoch konservierte, schnell induzierbare Familie von Proteinen, die in Prokaryoten, Eukaryoten und Pflanzen unter physiologischen, vor allem aber unter Stressbedingungen exprimiert werden (Lindquist & Craig, 1988, Walter & Buchner; 2002; Haslbeck *et al.*, 2005). Diese Stressantwort ist ein zellulärer Abwehrmechanismus gegen nicht-physiologische Bedingungen wie z.B. hohe Temperaturen, Schwermetallionen, pH-Variationen etc. (Lindquist & Craig, 1988; Schlesinger, 1990; Vierling & Kimple, 1992; Head *et al.*, 1994; Nover & Scharf, 1997; Derham & Harding; 1999; Narberhaus, 2002).

Kleine Hitzeschockproteine (*small heat shock proteins, sHsps*) bilden eine Subklasse von Hsps, die in allen Bereichen des Lebens vorkommt. Ihre Mitglieder besitzen Molekulargewichte von 12 bis 43 kDa. In vielen Organismen werden mehrere unterschiedliche sHsps gleichzeitig exprimiert, wobei die Anzahl ihrer Vertreter bei verschiedenen Spezies stark variiert. sHsps steuern *in vivo* zur Thermotoleranz bei, indem sie bei hohen Temperaturen partiell entfaltete Substratproteine ATP-unabhängig komplexieren (Narberhaus, 2002; Haslbeck, 2002; Stirling *et al.*, 2003; Haslbeck *et al.*, 2005) und diese vor Aggregation schützen (Ehrnsperger *et al.*, 1997; Stromer *et al.*, 2003; Basha *et al.*, 2004), bis sie von ATP-abhängigen Chaperonen rückgefaltet und dem Zellzyklus hinzugefügt werden (Ehrnsperger *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Mogk *et al.*, 2003; Haslbeck *et al.*, 2004; Cashikar *et al.*, 2005) (Abb. 5). Sie erhalten damit

die Proteinhomeostase aufrecht, indem sie ein Reservoir an nicht-nativen Proteinen bilden (Kim *et al.*, 1998a; Narberhaus, 2002; Haslbeck *et al.*, 2005). Viele sHsps sind unter physiologischen Bedingungen inaktiv oder nur teilweise aktiv und werden durch Stressfaktoren in ihren aktiven Zustand überführt (Abb. 5) (Haslbeck *et al.*, 1999; Franzmann *et al.*, 2005).

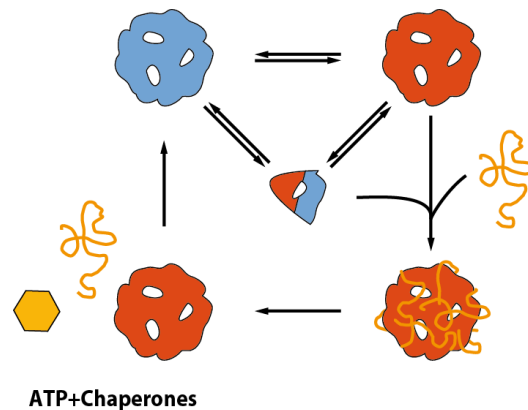


Abb. 5: Möglicher Mechanismus der sHsp-Aktivierung und Substratbindung (Richter *et al.*, 2010). Das inaktive sHsp (blau) wird durch Stressbedingungen in den aktiven Zustand (Oligomer oder Dimer) (rot) überführt. Im aktiven Zustand fängt das sHsp nicht-native Substratproteine (orange) ein und schützt sie vor Aggregation. Mit Hilfe von ATP-abhängigen Chaperonen werden die Substrate von dem sHsp gelöst und gefaltet.

SHsps zeigen eine konservierte Sequenzorganisation aus drei funktionell wichtigen Bereichen: Die N-terminale Region gefolgt von einer konservierten α -Kristallin Domäne (zentrale Erkennungseinheit aller sHsps) und einer C-terminalen Region (de Jong *et al.*, 1998; Kriehuber *et al.*, 2010). Obwohl die Aminosäuresequenz innerhalb dieser Domäne bis auf ein paar Positionen variabel ist, ist ihre Länge und Struktur in der ganzen sHsp-Familie konserviert (de Jong *et al.*, 1998; van Montfort *et al.*, 2001; Kriehuber *et al.*, 2010).

SHsps assemblieren zu großen, oligomeren, dynamischen Strukturen mit Molekulargewichten von 140 kDa bis zu 2 MDa. Laut Literatur spielt die α -Kristallin Domäne bei der Dimerisierung eine wichtige Rolle (Jehle *et al.*, 2010; Bagn ris *et al.*, 2009; Laganowsky *et al.*, 2010), wobei das Dimer als grundlegende Einheit angesehen wird. Die sowohl in der Länge als auch in der Sequenz sehr variable N-terminale Domäne (Kriehuber *et al.*, 2010) scheint die Bildung von höheren Oligomeren zu begünstigen (Haslbeck *et al.*, 2004), so können sHsp-Mutanten ohne die N-terminale Domäne in den meisten Fällen nur kleinere Oligomere bilden (Giese *et al.*, 2005). Sie ist so flexibel, dass sie in den vorhandenen Kristallstrukturen nur teilweise aufgelöst

werden konnte (Kim *et al.*, 1998; van Montfort *et al.*, 2001). Die C-terminale Region, vermutlich auch flexibel (Carver *et al.*, 1995; Lindner *et al.*, 2000; Treweek *et al.*, 2010), scheint auch Oligomere zu stabilisieren (Kim *et al.*, 1998; van Montfort *et al.*, 2001).

SHsp Oligomere besitzen charakteristische Architekturen: Sie assemblieren entweder als Hohlkugel-ähnliche Strukturen oder als gestapelte Ringe (Abb. 6). In der Literatur werden die meisten sHsps als (unterschiedlich) polydispers und flexibel beschrieben. Diese Eigenschaften erschweren deren Strukturermittlung, so dass nur wenige hochaufgelöste Strukturen von sHsp Oligomeren bekannt sind. Bisher konnten lediglich die molekularen Architekturen von solchen sHsps, die weitgehend monodisperse Populationen mit definierter Oligomerstöchiometrie bilden, aufgeklärt werden. Demnach besteht Hsp16.5 aus *Methanocaldococcus jannaschii* (MjHsp16.5) aus 24 Untereinheiten und hat eine hohle, ballähnliche Struktur (Kim *et al.*, 1998; Haley *et al.*, 2000), wohingegen Hsp16.9 aus Weizen (TaHsp16.9) aus 12 Untereinheiten aufgebaut ist und eine fassähnliche Struktur aus zwei hexameren Ringen bildet (van Montfort *et al.*, 2001). Von fünf weiteren sHsps wurden die Strukturen des dimeren Grundbausteins bei atomarer Auflösung bestimmt: Tsp36 (Stamler *et al.*, 2005), HspA (Hilario *et al.*, 2006), Hsp20 (Bagn ris *et al.*, 2009), α A- (Laganowsky *et al.*, 2010) und α B-Kristallin (Bagn ris *et al.*, 2009; Jehle *et al.*, 2010) (Abb. 6).

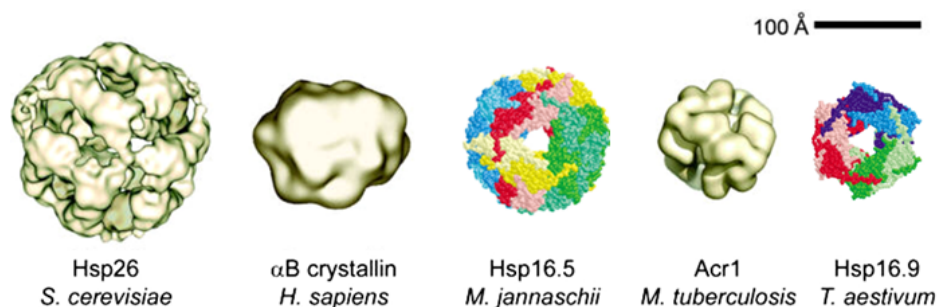


Abb. 6: SHsp Oligomerstrukturen (Abbildung nach Haslbeck *et al.*, 2005). Von links nach rechts: Hsp26 aus *S. cerevisiae*, 24 Untereinheiten, Kryo-EM (9 Å Auflösung) (White *et al.*, 2006); humanes α B-Kristallin, 32 Untereinheiten, Kryo-EM (4 nm Auflösung) (Haley *et al.*, 1998); Hsp16.5 aus *M. jannaschii*, 24 Untereinheiten, Röntgenkristallographie (Kim *et al.*, 1998), Hsp16.3 (oder Acr1) aus *M. tuberculosis*, 12 Untereinheiten, Negativ Kontrastierung (16 Å Auflösung) (Kennaway *et al.*, 2005) Hsp16.9 aus Weizen, 12 Untereinheiten, Röntgenkristallographie (van Montfort *et al.*, 2001).

Für weitere sHsps wie z.B. für Hsp26 aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScHsp26) (Haslbeck *et al.*, 1999; White *et al.*, 2006), Acr1 (Hsp16.3) aus *Mycobacterium tuberculosis* (MtHsp16.3) (Kennaway *et al.*, 2005), Hsp20.2 aus *Archaeoglobus fulgidus*

(AfHsp20.2) (Haslbeck *et al.*, 2008), oder humanes α B-Kristallin (Hs α B-Kristallin) (Peschek *et al.*, 2009) wurden die Oligomerstrukturen mit Hilfe von TEM, entweder mittels Negativ Kontrastierung oder Kryo-EM, erhalten (Abb. 6).

In den bisher bei hoher Auflösung ermittelten sHps Strukturen konnte die Lage der N-terminalen Domäne, die vermutlich in Substratbindung involviert ist, aufgrund ihrer hohen Flexibilität nicht bestimmt werden. Indirekte Rückschlüsse ergaben sich lediglich bei MjHsp16.5: Hier wurde die zusätzliche Masse im Zentrum des Oligomers, die in dem mittels Kryo-EM ermittelten 3D-Modell bei einer Auflösung von 13 Å sichtbar wurde (Haley *et al.*, 2000), den in der Röntgenstruktur fehlenden 32 Aminosäuren der N-terminalen Domäne zugeschrieben. Dies wurde später durch Messungen aus EPR (*electron paramagnetic resonance spectroscopy*) bestätigt (Koteiche *et al.*, 2005). Zudem wurde ein atomares Modell der Positionen 6-25 erstellt und in die Dichteprojektion des Oligomers eingefügt.

Die Polydispersität der sHps wird dem Austausch von Untereinheiten zugeschrieben (Aquilina *et al.*, 2005). Zwar ist die funktionelle Bedeutung dieses dynamischen Verhaltens nicht genau bekannt, es wird aber angenommen, dass verschiedene Oligomere unterschiedliche Funktionen haben könnten. Die Anzeichen verdichten sich, dass die hohe Plastizität der sHps, die sich in unterschiedlichen oligomeren Spezies widerspiegelt (Skouri-Panet, 2006; Laganowsky *et al.*, 2010; Stengel *et al.*, 2010; Eyles & Gierasch, 2010) auch entscheidend für ihre Aktivität ist und dass sich das Oligomergleichgewicht unter Stressbedingungen ändert (Burgio *et al.*, 2000). So wird bei einigen sHps eine Dissoziierung in kleinere Oligomere bei höheren Temperaturen aber auch nach Phosphorylierung beobachtet (Kato *et al.*, 1994; Mehlen *et al.*, 1994; Lavoie *et al.*, 1995). TaHsp16.9 bildet bei erhöhten Temperaturen ein Gleichgewicht aus größeren und kleineren Oligomeren (van Montfort *et al.*, 2001) während α A- und α B-Kristallin bei erhöhten Temperaturen scheinbar größere Oligomere bilden (Skouri-Panet *et al.*, 2006). Aus den Pflanzen Erbse, Weizen und *Arabidopsis thaliana* konnten jeweils zwei Klassen von sHps identifiziert werden, die sich unter Hitzeschock entgegengesetzt verhalten. Während die Klasse I Proteine unter Hitzeschock in Dimere zerfallen, konnten für die Klasse II Proteine unter Hitzeschock nur größere Oligomere identifiziert werden (Basha *et al.*, 2010). Dies deutet darauf hin, dass sHps unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung unter Stressbedingungen besitzen können.

2. Fragestellung

Obwohl die vitale Funktion der sHsps bei der Erhaltung der Proteinhomöostase unter Stressbedingungen schon länger bekannt ist, sind bezüglich der Verknüpfung ihrer Struktur mit ihrer Funktion noch sehr viele Fragen unbeantwortet. Die Assemblierung von sHsps in große, dynamische und polydisperse Oligomere stellen nahezu unüberwindbare Hürden für eine Strukturanalyse mittels klassischer Strukturmethoden wie NMR oder Röntgenkristallographie dar. Die strukturellen Grundlagen der Assemblierung sind nur für wenige Vertreter bekannt, die weitgehend monodisperse Oligomere mit definierter Stöchiometrie bilden, während die polydispersen sHsps diesbezüglich noch nicht charakterisiert sind. Fragen wie der Zusammenhang zwischen der Assemblierungsform und Aktivierungs- bzw. Funktionsmechanismus oder auch die Determinanten der Substratbindung sind noch weitgehend offen.

Phylogenetische Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Anzahl der sHsps in einem Organismus mit der Größe seines Genoms positiv korreliert und von Archaeen zu höheren Eukaryoten zunimmt (Kriehuber *et al.*, 2010) (Abb. 7). So werden in Bakterien und Archaeen pro Genom im Durchschnitt zwei, in Pilzen drei sHsps kodiert, während Metazoa (vielzellige Tiere) bis zu 8 sHsps enthalten können. In höheren Eukaryoten sind viel mehr Vertreter der sHsp-Familie vorhanden, so enthalten -nach heutigem Kenntnisstand- *Caenorhabditis elegans* 22 (davon 16 eindeutig), *Homo sapiens* 12, *A. thaliana* 22, *Oryza sativa* (Reis) 21, *Vitis vinifera* (Weinblatt) sogar bis zu 45 verschiedene potentielle sHsps, wobei die Zuordnung unvollständigerweise allein auf Grund der Sequenzhomologie vorgenommen wird. Funktionelle bzw. strukturelle Homologien werden dabei nicht in Betracht gezogen.

Zwar ist es noch nicht bekannt, ob die Expansion von sHsps von Prokaryoten zu Eukaryoten mit einer funktionellen und strukturellen Diversifizierung einhergeht, es ist aber durch den komplexeren Aufbau von Eukaryoten denkbar, dass die unterschiedlichen sHsps im Organismus differenzierte Funktionen ausüben. Wie sich die sHsps eines Organismus funktionell/strukturell ähneln/unterscheiden und in wie weit diese Ähnlichkeiten/Unterschiede zu sHsps aus anderen Organismen zeigen, ist bisher nicht genügend verstanden.

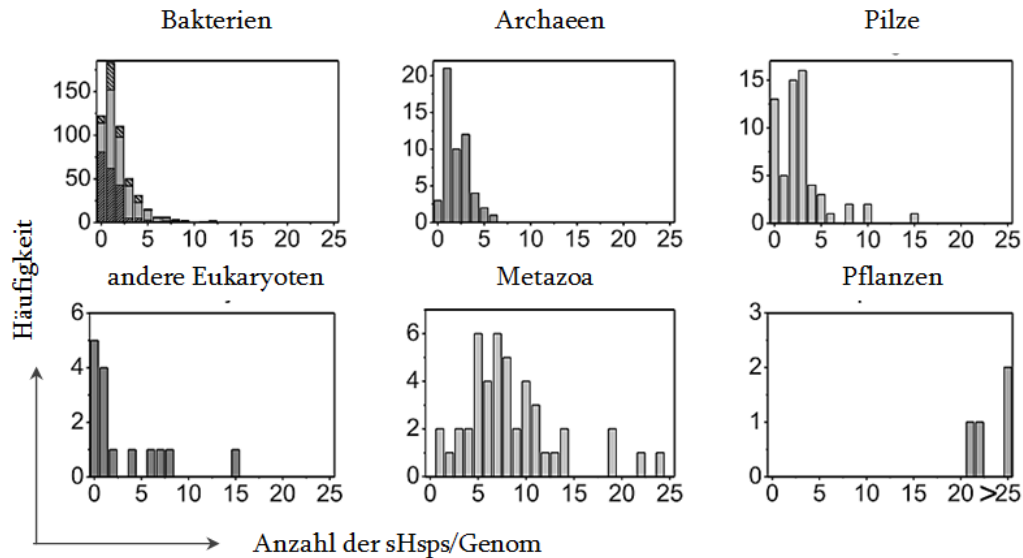


Abb. 7: Anzahl der putativen sHsps pro Genom verschiedener Organismen (Abbildung nach Kriehuber *et al.*, 2010).

Angeht diese Sachlage sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Strukturuntersuchungen an homologen sHsps innerhalb eines Organismus bzw. von sHsps aus verschiedenen Organismen durchgeführt werden, um Gemeinsamkeiten bzw. Variationen in den strukturellen Aufbauprinzipien zu identifizieren und diese mit bekannten funktionell/mechanistischen Aspekten zu korrelieren. Für die Strukturanalyse sollten Negativ Kontrastierung sowie die Kryo-EM in Kombination mit Einzelpartikel-Rekonstruktionstechniken eingesetzt werden.

In Erweiterung der im Rahmen der Diplomarbeit bearbeiteten sHsps aus hyperthermophilen Bakterien wurden hier als Untersuchungsobjekte eukaryotische sHsps ausgewählt, die auch Gegenstand von komplementären funktionellen Untersuchungen am Lehrstuhl für Biotechnologie der Technischen Universität (Prof. J. Buchner) sind. Diese sind Hsp20, Hsp21, Hsp28, Hsp29 und Hsp30 aus *Toxoplasma gondii*, Hsp16.11, Hsp16.2, Hsp16.41, Hsp16.48 und Sip-1 aus *Caenorhabditis elegans* und α A- und α B-Kristallin aus *Homo sapiens*.

3. Kleine Hitzeschockproteine aus *Toxoplasma gondii*

3.1. Kenntnisstand

Der Parasit *Toxoplasma gondii* ist eukaryotischer Einzeller, welcher Menschen als Zwischenwirt befällt und zu der Infektion *Toxoplasmose* führt (Infektionsrate weltweit bei ca. 33 %) (Elmore *et al.*, 2010). Beim Menschen verläuft die Infektion meist ohne merkbare Symptome und ruft Immunität hervor. Bei Schwangeren ohne Immunität kann jedoch der Fötus -je nach Zeitpunkt der Infektion- leichte Zellschäden bis zu allen möglichen Missbildungen davontragen.

T. gondii besitzt eine bogenförmige Struktur und hat eine Länge von ca. 5 µm, wobei sich die Form und Größe je nach Entwicklungsstadium ändern (Dubey *et al.*, 1998). Der Parasit durchläuft im Endwirt (Katze) einen geschlechtlichen Zyklus und scheidet *Oozysten* aus, die sich in der Außenwelt zu infektiösen *Sporozoiten* ausbilden, welche von einem Zwischenwirt oral aufgenommen werden. Er vermehrt sich in diversen Organen/Gewebe des Zwischenwirts (z.B. zentrales Nervensystem, Muskeln) in einem ungeschlechtlichen Zyklus in Form von schnell-wachsenden *Tachyzoiten* bzw. langsam-wachsenden *Bradyzoiten* und bildet *Zysten*, die über Jahre persistieren können (Elmore *et al.*, 2010). Von seinem Wirt nimmt *T. gondii* Cholesterin auf, welches es nicht selber produzieren kann (Nishikawa *et al.*, 2005). Die Faktoren, die den Übergang zwischen *Tachyzoiten* und *Bradyzoiten* kontrollieren, sind bisher nicht bekannt. *In vitro* Studien in Zellkulturen deuten jedoch darauf hin, dass Stressfaktoren wie Temperatur, pH-Änderung etc. den Übergang induzieren können (Weiss *et al.*, 1996) wobei es zu einer erhöhten Expression von verschiedenen Hsps, darunter auch sHsps kommt (Echeverria *et al.*, 2005).

T. gondii besitzt fünf sHsps, Hsp20, Hsp21, Hsp28, Hsp29, Hsp30, die bei Hitzeschock überexprimiert werden (de Miguel *et al.*, 2005). Sie besitzen eine hohe Sequenzhomologie in ihren α -kristallinen Domänen, unterscheiden sich jedoch in der Sequenz und Länge ihrer N-terminalen Domänen (de Miguel *et al.*, 2005). Ihr Vorkommen hängt stark vom Entwicklungsstadium des Parasits ab (de Miguel *et al.*, 2005). So wird Hsp30 nur in Bradyzoiten (verlangsamte Zellteilung, besonders nachdem Abwehrmechanismen in der Wirtszelle in Kraft getreten sind) exprimiert, während Hsp28 hauptsächlich in Tachyzoiten (schnelle, ungeschlechtliche Zellteilung nach der Infektion) exprimiert wird. Die anderen drei sHsps kommen in beiden Zellarten vor. Auch unterscheiden sich die genannten sHsps in ihrer zellulären Lokalisation (de Miguel *et al.*, 2005). Hsp21 und Hsp30 befinden sich im Cytosol. Hsp29 scheint zwar

vorwiegend membrangebunden zu sein, findet sich aber auch in der gesamten Zelle wieder. Hsp28 ist in Mitochondrien zu finden, während Hsp20 mit der äußeren Oberfläche des inneren Membrankomplexes assoziiert ist (de Miguel *et al.*, 2008).

Nach neueren Untersuchungen zeigen alle sHsps des *T. gondii* *in vitro* Chaperonaktivität und bilden höhere Oligomere (de Miguel *et al.*, 2009). Laut SEC und UZ haben die Oligomere von Hsp20, Hsp21 und Hsp29 ca. 12-18 Untereinheiten, während Hsp28 und Hsp30 zu Strukturen mit Molekulargewichten zwischen 660 kDa und >1.000 kDa (24-32 Untereinheiten) assemblieren. Während alle Oligomere bei physiologischen Temperaturen relativ langsam Untereinheiten austauschen, kommt es nur zwischen Hsp21 und Hsp29 zur Bildung von hetero-Oligomeren, welche von den homo-Oligomeren der genannten Proteine funktionell nicht zu unterscheiden sind (de Miguel *et al.*, 2009).

3.2. Elektronenmikroskopische Analyse der sHsps aus *T. gondii*

Für die elektronenmikroskopische Charakterisierung der sHsps aus *T. gondii* wurden die mittels SEC aufgereinigten Proteine in drei Fraktionen aufgefangen und nur die mittlere Fraktion mit Uranylacetat kontrastiert. In negativ kontrastierten Proben erschienen alle Proteine als weitgehend globuläre Strukturen mit mehr oder minder stark ausgeprägter Heterogenität (Abb. 8).

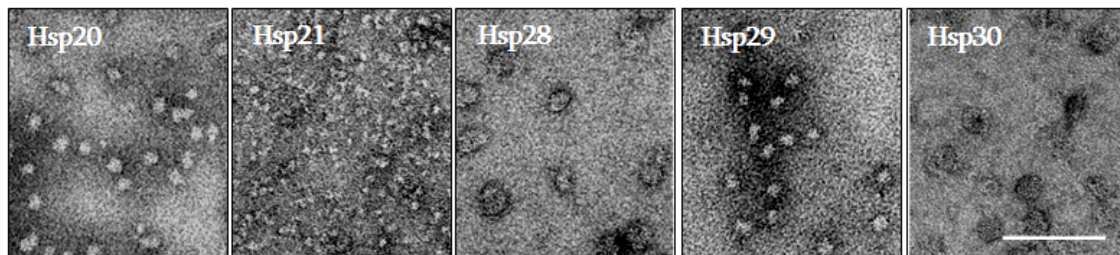


Abb. 8: SHsps aus *T. gondii*. Die Proteine (0,4 mg/ml in 50 mM TRIS/HCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) wurden mit Uranylacetat (2% (w/vol), pH 4,5) kontrastiert. Gut erkennbar sind die unterschiedlichen Oligomergrößen sowie Heterogenitäten. Balken 100 nm.

Bei allen Proben bis auf Hsp30 war eine etwas ausgeprägtere Hauptspezies zu finden. Die Durchmesser der Hsp30 Oligomere variierten von 10 bis 15 nm. Zudem existierten auch größere, aggregatähnliche Komplexe. Um strukturelle Details der Oligomere erkennen zu können, wurden alle Datensätze einer Analyse mittels MSA und Klassifizierung unterzogen. Die Klassenmittelungen zeigten runde Partikel unterschiedlicher Größe und ohne erkennbare Symmetrie oder Strukturmerkmale. Exemplarische Mittelungsbilder von Hsp20, Hsp28 und Hsp30 sind in Abbildung 9 dar-

gestellt. Die an Klassenmittlungen gemessenen mittleren Durchmesser betragen für Hsp21 9 nm, für Hsp20 11 nm, für Hsp29 12 nm, für Hsp30 ca. 13 nm und für Hsp28 18 nm.

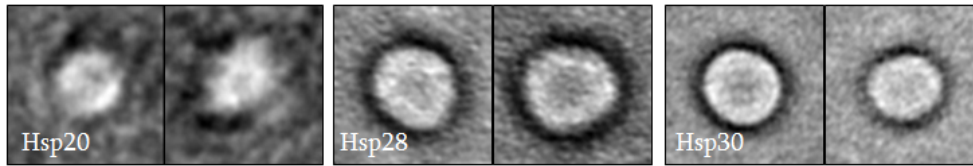


Abb. 9: Mittelungsbilder dreier sHsps aus *T. gondii*. Alle Proteine zeigen runde Strukturen unterschiedlicher Größe, jedoch ohne erkennbare Symmetrie oder Strukturmerkmale. Boxgröße 25 nm.

Wegen den fehlenden Detailinformationen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten für die sHsps von *T. gondii* keine 3D-Rekonstruktionen erstellt werden.

3.3. Zusammenfassung und Diskussion

Die beobachteten Heterogenitäten zusammen mit den Ergebnissen aus FRET-Analysen (de Miguel *et al.*, 2009) deuten auf eine variable, dynamische Struktur aller *T. gondii* sHsps: sie scheinen in einem Gleichgewicht von verschiedenen Oligomerformen zu existieren. In weiteren elektronenmikroskopischen Experimenten sollte versucht werden, die einzelnen Oligomerformen zu identifizieren bzw. deren Verteilung unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen.

Aufgrund bisheriger Versuche lassen sich die *T. gondii* sHsps nach der Größe ihrer dominantesten Spezies tentativ in folgende drei Klassen einteilen, deren Mitglieder auch in einigen anderen Eigenschaften Ähnlichkeiten zeigen (de Miguel *et al.*, 2009):

Klasse 1 (Hsp21/Hsp29): Die cytosolischen Hsp21 und Hsp29, letzteres auch membrangebunden, bilden die kleinsten Oligomere (vermutlich 12mere). Sie zeichnen sich durch eine hohe thermische Stabilität und ähnliche Chaperonaktivität in Unterdrückung der Aggregation thermisch denaturierter Citrat Synthase (CS) aus. Sie sind beide thermisch nicht aktivierbar. Während Hsp21 eine niedrige Untereinheiten-Austauschrate ($t_{1/2}$ ca. 450 s) und folglich geringe Polydispersität zeigt, tauscht Hsp29 seine Untereinheiten schneller aus ($t_{1/2}$ ca. 136 s) und zeigt eine im Vergleich zu Hsp21 höhere Polydispersität. Im Gegensatz zu anderen sHsps aus *T. gondii* bilden Hsp21 und Hsp29 untereinander hetero-Oligomere, was auf eine strukturelle Homologie bzw. Kompatibilität in ihren Assemblierungsformen hindeutet. Das Hsp21 wird

im Gegensatz zu Hsp29 durch Kälte (25°C) aktiviert. Hierzu wäre es interessant zu wissen, ob sich seine Untereinheiten-Austauschrate bzw. die Polydispersität bei tiefen Temperaturen (< 37°C) ändert.

Klasse 2 (Hsp20): Hsp20 nimmt bezüglich seiner Größe eine mittlere Stellung ein und bildet vermutlich 12-18mere. Das Protein hat eine geringe thermische Stabilität, langsame Untereinheiten-Austauschrate ($t_{1/2}$ ca. 470 s), geringe Polydispersität und bildet mit den anderen sHsps aus *T. gondii* keine hetero-Oligomere. Hsp20 unterdrückt die Aggregation von thermisch denaturierter CS um die Hälfte schon bei einem molaren Verhältnis von 1:1 (CS:Hsp20), gehört damit zu den effektivsten sHsps und wird durch Kälte (25°C) aktiviert.

Klasse 3 (Hsp28/Hsp30): Hsp28 und Hsp30 bilden die größten Oligomere (vermutlich 24-32mere), haben eine geringe thermische Stabilität und sind thermisch nicht aktivierbar. Während Hsp28 seine Untereinheiten bei einer Rate $t_{1/2}$ von ca. 580 s, also relativ langsam austauscht und geringe Polydispersität aufweist, zeigt Hsp30 die höchste Austauschrate ($t_{1/2}$ ca. 60 s) und bildet die am meisten heterogene Population. Während die Chaperonaktivität von Hsp28 mit denen von Hsp21 und Hsp29 vergleichbar ist, zeigt Hsp30 die schwächste Aktivität. Hsp28 ist durch Kälte aktivierbar.

Bei dem obigen Vergleich fällt es auf, dass diejenigen sHsps von *T. gondii*, die sich durch eine geringe Untereinheiten-Austauschrate und geringere Polydispersität auszeichnen (Hsp20, Hsp21 und Hsp28) durch Kälte aktivierbar sind, während die stark polydispersen Mitglieder konstitutiv aktiv zu sein scheinen (Hsp29 und Hsp30). Eine ähnliche Korrelation findet sich auch bei anderen sHsps: während AfHsp20.2 (Haslbeck *et al.*, 2008) und MjHsp16.5 (Haslbeck *et al.*, 2008) und ScHsp26 (Haslbeck *et al.*, 2004) relativ monodisperse Populationen bilden und thermisch aktivierbar sind, sind die polydispersen sHsps wie Hsp42 aus *S. cerevisiae* (ScHsp42) (Haslbeck *et al.*, 2004a) und humanes α B-Kristallin (Peschek *et al.*, 2009) konstitutiv aktiv.

Die Expression in verschiedenen Lebenszyklen sowie die Verteilung auf verschiedene zelluläre Kompartimente lassen vermuten, dass die sHsps des *T. gondii* unterschiedliche, spezialisierte Funktionen ausüben. Die Frage, ob diese mögliche funktionelle Diversifizierung von einer strukturellen Diversifizierung begleitet wird, kann mit den bisherigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen nicht beantwortet werden. Die erhöhte thermische Stabilität von Hsp21 und Hsp29 sowie deren Fähigkeit, hetero-Oligomere mit einer bestimmten Stöchiometrie zu bilden, lassen die Vermutung aufkommen, dass diese in ihrem Verhalten den Klasse II sHsps aus Pflanzen ähnlich sein könnten.

4. Kleine Hitzeschockproteine aus *Caenorhabditis elegans*

4.1. Kenntnisstand

Der multizelluläre Eukaryot *Caenorhabditis elegans*, ein ca. 1 mm langer Fadenwurm (Brenner, 1974), kommt in Böden gemäßigter Klimazonen vor und nährt sich von Bodenmikroben. Fast alle Würmer sind *Hermaphroditen*, die in ihrer Lebensspanne von ca. 3 Wochen bis zu 300 Eier legen und aus 959 somatischen Zellen bestehen (davon 302 neuronal) (Kosinski & Zaremba, 2007). Nur ca. 0,05 % der Würmer sind Männchen (1.031 somatische Zellen), die zur genetischen Rekombination dienen. Die kurze Lebensdauer und die Reproduktion innerhalb von drei Tagen machen den Wurm zu einem idealen Modellorganismus für das Studium höherer Eukaryoten (Brenner, 1973). Die Stämme sind einfach anzuziehen, sie können auch eingefroren und somit lange Zeit verfügbar gemacht werden. Zusätzlich ist *C. elegans* transparent, so dass es möglich ist, zelluläre Unterschiede und Entwicklungsprozesse im lebenden Organismus zu beobachten.

In *C. elegans* scheinen manche Faktoren, die Stresstoleranz vermitteln, positive Auswirkungen auf die Lebensspanne des Organismus zu haben (Wolkow, 2002; Tatar *et al.*, 2003). So scheinen z.B. die Gene, die unter der Kontrolle des entwicklungspezifischen Transkriptionsfaktors SKN-1 und des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors HSF-1 (Heat-Shock-Factor 1) stehen, u.A. auch die Gene der sHsps, Stresstoleranz zu vermitteln und gleichzeitig den Lebenszyklus zu verlängern.

Frühere genetische Analysen zeigten, dass das *C. elegans* Genom mindestens 4 homologe Gene hat, die für sHsps mit 143-145 Aminosäuren kodieren (Rusznak *et al.*, 1983). Inzwischen ist es bekannt, dass *C. elegans* über insgesamt 16 potentielle sHsps mit Molekülmassen zwischen 12 und 45 kDa und mit hohen Homologien zu den sHsps aus *Drosophila melanogaster* bzw. zu humanen α A- und α B-Kristallinen verfügt (Haslbeck *et al.*, 2005). Nach der Homologie innerhalb der konservierten α -Kristallin Domäne clustern 11 der 16 sHsps in zwei Proteinfamilien, Hsp16 und Hsp12, während die restlichen 5 (Hsp17, Hsp25, Hsp43, YSSF3BR.6/68150, ZK1128.7/91173) bisher keiner speziellen Familie zugeordnet werden konnten (Abb. 10). In der Literatur liegen kaum Informationen über die Eigenschaften bzw. Chaperonaktivität der sHsps aus *C. elegans* vor.

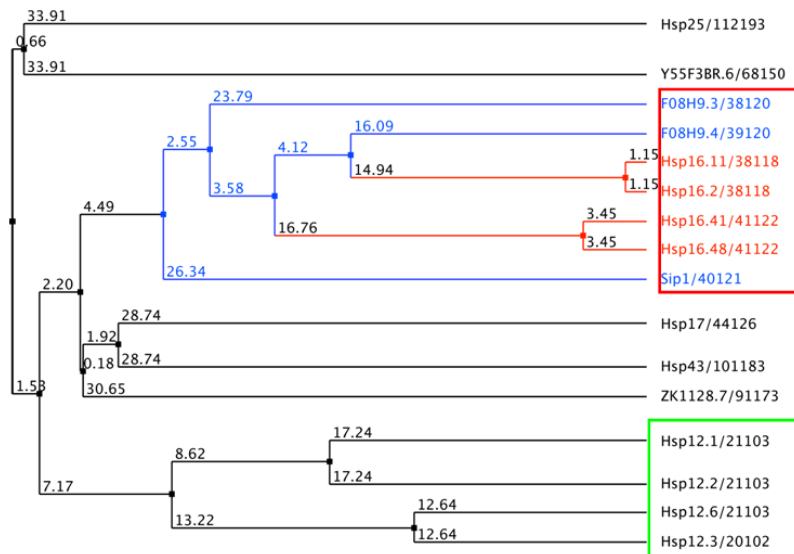


Abb. 10: Verwandtschaft der *C. elegans* sHsps auf der Basis ihrer Homologie innerhalb der konservierten α -Kristallin Domäne (Weinfurter, 2008). Rot: Proteine der Hsp16 Familie. Grün: Proteine der Hsp12 Familie.

Die Hsp12 Proteinfamilie:

Die Vertreter der Hsp12 Subfamilie, Hsp12.1, Hsp12.2, Hsp12.3 und Hsp12.6 haben eine durchschnittliche molekulare Masse von 12 kDa und stellen damit die kleinsten bisher identifizierter sHsps dar. Sie zeichnen sich durch geringe Sequenzkonservierung und an beiden Enden verkürzte α -Kristallin Domäne aus. Die Proteine der Hsp12 Familie liegen, rekombinant gereinigt oder in Wurmextrakten, als Monomere oder kleinere Oligomere vor (Dimere oder Trimere) (Leroux *et al.*, 1997a; Kokke *et al.*, 1998). Sie zeigen *in vitro* keine Chaperonaktivität (Leroux *et al.*, 1997; 1997a; Kokke *et al.*, 1998), was entweder an deren Substratspezifität oder am Fehlen von Co-faktoren und/oder posttranslationalen Modifikationen liegen kann.

Auf Grund ihrer geringen Oligomergröße sind die Mitglieder der Hsp12 Proteinfamilie für Untersuchungen mittels Einzelpartikelanalyse nicht zugänglich.

Die Hsp16 Proteinfamilie:

Der Kern der Hsp16 Proteinfamilie besteht aus 4 Vertretern, die in die Subfamilien Hsp16.11/16.2 und Hsp16.41/16.48 eingeteilt werden. Während ihre Expression während der Embryogenese vollständig unterdrückt und nicht induzierbar ist (Stringham *et al.*, 1992), ist ihre Akkumulation während den späteren Entwicklungsphasen sehr stark von Stressfaktoren wie z.B. Hitze abhängig. Zu der erweiterten Hsp16 Familie gehören noch die Proteine F08H9.3, F08H9.4 und Sip-1. F08H9.3 und F08H9.4 werden konstitutiv und gewebespezifisch expremiert und unter Hitzeschock

leicht aktiviert. Sip-1 ist das einzige entwicklungsregulierte Protein, das während der frühen Embryogenese kritische Funktionen ausübt.

Alle 7 Proteine der Hsp16-Familie haben eine ähnliche Anzahl von Aminosäuren (143 bis 159) und Molekulargewichte zwischen 16 und 18 kDa (Tabelle 1). Bis auf Sip-1 besitzen sie einen theoretischen pI zwischen 5 und 6 (Linder *et al.*, 1996).

sHsp	Molekulargewicht (kDa)	Aminosäuren	theor.pI
Hsp16.11	16,25	145	5,4
Hsp16.2	16,24	145	5,3
Hsp16.41	16,25	143	5,9
Hsp16.48	16,30	143	5,5
F08H9.3	16,75	147	4,7
F08H9.4	16,42	147	5,2
Sip-1	17,84	159	8,2

Tabelle 1: Grundlegende Charakteristika der Mitglieder der *C. elegans* Hsp16-Proteinfamilie.

Homologie der Hsp16 Proteine:

Die Proteine Hsp16.11/16.2, Hsp16.41/16.48 und Sip-1 besitzen vor allem innerhalb ihren konservierten α -Kristallin Domänen eine hohe Homologie, während ihre N- bzw. C-terminalen Domänen in ihrer Sequenz weitaus variabler sind (Abb. 11). Die Proteine einer Subfamilie sind nahezu identisch (ca. 93 % Sequenzidentität), während die Subfamilien zueinander ca. 70 % Sequenzhomologie zeigen. Dagegen betragen die Sequenzidentitäten von F08H9.3 und F08H9.4 zu den Hsp16 Proteinen durchschnittlich nur ca. 50 % (Daten nicht gezeigt).

Hsp16.11/16.2, Hsp16.41/16.48 und Sip-1 besitzen für sHsps charakteristische UV-CD Spektren mit einem ausgeprägten Minimum bei 217 nm, welches für eine β -Faltblatt Struktur spricht.

Quartärstruktur und Chaperonaktivität:

Nach SEC und AUZ weisen alle fünf sHsps der Hsp16 Proteinfamilie nach rekombinanter Reinigung einen scharfen Peak auf, der auf Oligomergrößen mit 20-30 Untereinheiten deutet (Weinfurtner, 2008). Laut Literatur liegt Hsp16.2 *in vivo* (Hockertz *et al.*, 1991) und *in vitro* (Leroux *et al.*, 1997) als größere Oligomere mit unterschiedlichen Molekulargewichten vor. Die Funktionalität der Hsp16 Proteine scheint, zumindest *in vitro*, sehr stark von der Oligomerisierung abhängig zu sein. So zeigt das

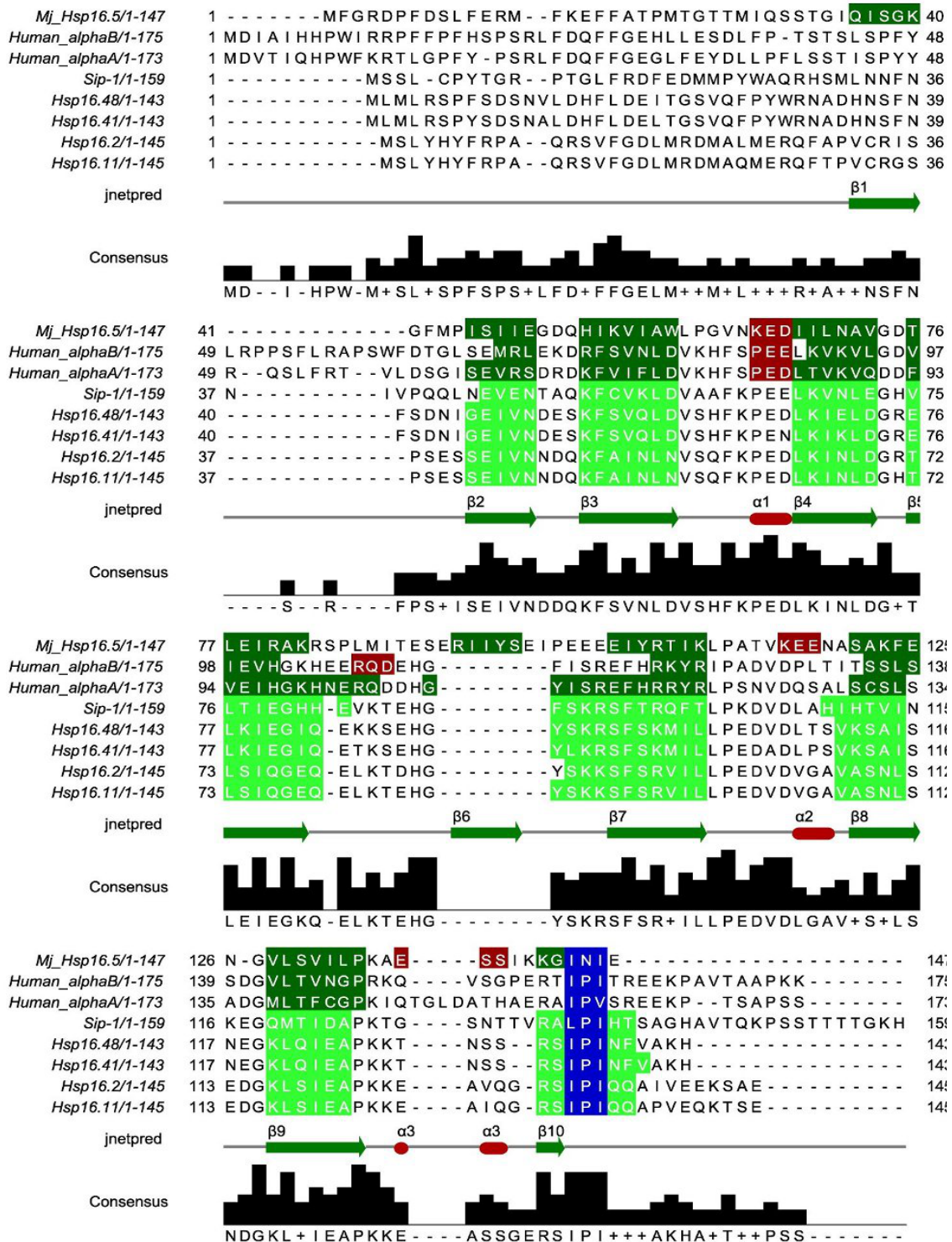


Abb. 11: Sequenzalignierung der *C. elegans* Hsp16 Proteine mit Hsp16.5 (pdb: 1SHS, Röntgenstrukturanalyse), α A-Kristallin aus Rinderauge (pdb: 3L1F, NMR) und humanem α B-Kristallin (pdb: 2KLR, Röntgenstrukturanalyse). Dunkelgrün: β -Faltblätter; rot: Loop-Strukturen; hellgrün: Sekundärstrukturvorhersage durch Jalview (β -Faltblatt) (Waterhouse *et al.*, 2009); blau: konserviertes I/L/V-X-I/L/V Motiv (I-X-I) (Poulain *et al.*, 2010). Cartoon der Sekundärstrukturelemente (jnetpred) wurde anhand von Hsp16.5, der Grafik mit Jalview erstellt. Gut zu erkennen ist die konservierte α -Kristallin Domäne (β 2- β 9).

Hsp16.2, das nach der Deletion von 44 N-terminalen AS fast ausschließlich als Monomere, in geringen Anteilen als Dimere und Trimere vorliegt, keinerlei Chaperonaktivität mehr (Leroux *et al.*, 1997). Dagegen beeinflusst die Deletion von C-terminalen 15 AS die Aktivität kaum, führt aber zu einer Zunahme der Oligomergröße.

Nach Aggregationsassays mit thermisch entfalteter CS weisen Hsp16.2/16.11 bei einem 4-fach geringeren Überschuss die gleiche Aggregationsunterdrückung auf wie Hsp16.41/16.48 (Weinfurtner, 2008). Die Ähnlichkeit von Hsp16.2/16.11 und Hsp16.41/16.48 in ihrer Sequenz und ihrem biochemischen Verhalten wirft daher die Frage auf, ob es auch strukturelle Ähnlichkeiten gibt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Mitglieder der Hsp16 Proteinfamilie eingehend auf ihre strukturellen Eigenschaften hin untersucht.

4.2. Elektronenmikroskopische Analyse von Hsp16.11/Hsp16.2

Für eine erste Charakterisierung wurden die beiden Vertreter der Hsp16-Subfamilie Hsp16.11/Hsp16.2 mittels Negativ Kontrastierung visualisiert. Die Proteine lagen in 20 mM PBS-KOH Puffer (pH 7,2) vor. Als Kontrastmittel wurden Ammoniummolybdat (2 % w/v, pH 5,5), Uranylacetat (2% (w/v, pH 4,5) oder Uranylformiat (1,5 % w/v, pH 4,5) benutzt. Die Proteinkonzentrationen betragen zwischen 0,1 und 0,7 mg/ml.

4.2.1. Hsp16.11

Hsp16.11 zeigte in negativ kontrastierten Proben heterogene Oligomere mit wenig Strukturmerkmalen (Abb. 12).

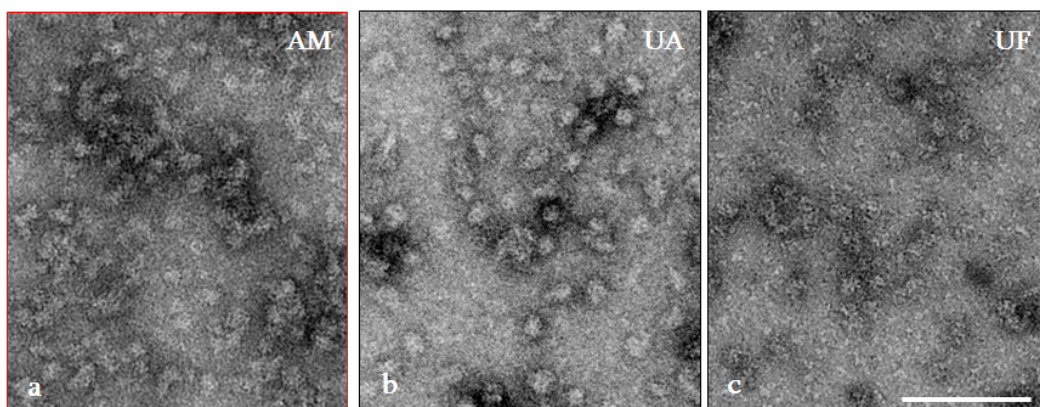


Abb. 12: Hsp16.11 (0,2 mg/ml in 20 mM PBS-KOH Puffer, pH 7,2) negativ kontrastiert mit Ammoniummolybdat (2 % w/v, pH 5,5) (a), Uranylacetat (2% (w/v, pH 4,5) (b) und Uranylformiat (1,5 % w/v, pH 4,5) (c). Balken: 100 nm.

Mit AM kontrastierte Proben erschienen am meisten strukturiert und wurden einer Bildverarbeitung unterzogen. Dazu wurden 11.777 Projektionsbilder semi-automatisch extrahiert und mittels MSA analysiert, die eine extreme Größenvarianz der Partikel zeigte (Abb. 13a). Strukturmerkmale oder Symmetrien konnten weder in den Eigen- (Abb. 13a) noch in den Klassenmittelungsbildern (Abb. 13b) erkannt werden. Die Partikelgrößen variierten zwischen 8 und 20 nm, wobei die Mehrzahl einen Durchmesser zwischen 10 und 16 nm zeigten (Abb. 13c).

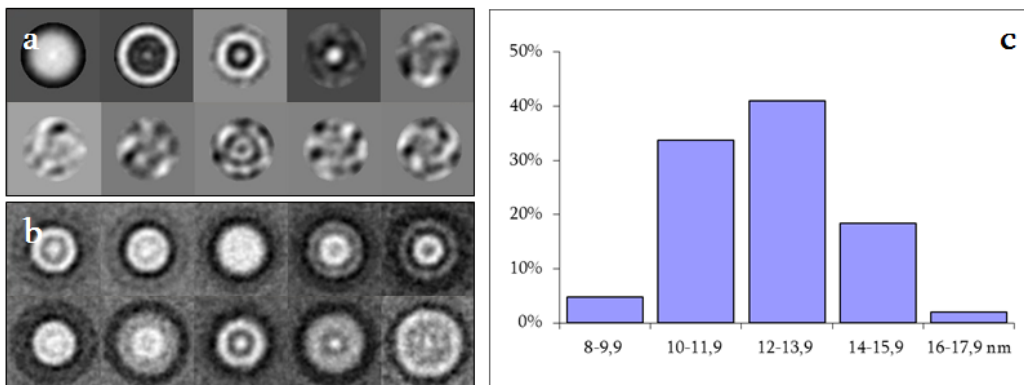


Abb. 13: **a)** Eigenbilder nach der ersten MSA des gesamten Hsp16.11 Datensatzes ohne Translations- bzw. Rotationsalignierung. Die Eigenbilder 2 und 3 deuten auf eine Größenvarianz. **b)** Typische Klassenmittelungen nach Sortierung des gesamten Datensatzes nach Partikelgrößen. **c)** Anhand der Klassenmittelungen bestimmte Partikelgrößenverteilung.

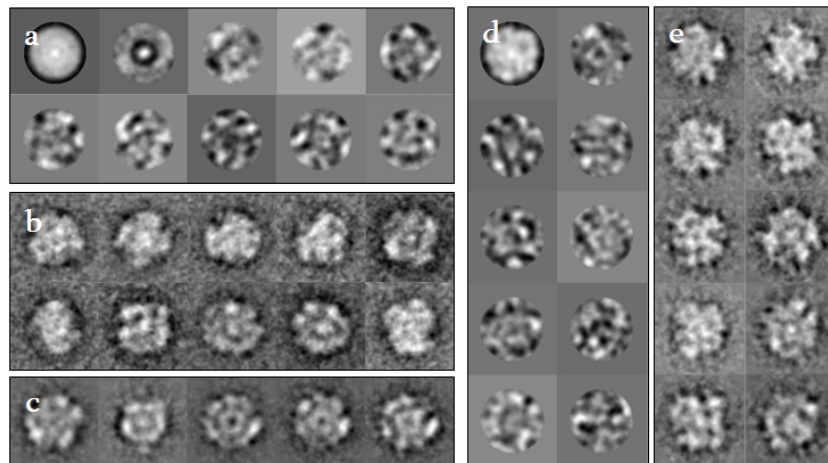


Abb. 14: Eigenbilder **(a)** und Klassenmittelungen **(b)** nach der ersten MSA der Hsp16.11 Hauptpopulation ohne Translations- bzw. Rotationsalignierung. **c)** Klassenmittelungen, die zur MRA des reduzierten Datensatzes herangezogen wurden. Eigenbilder **(d)** und Klassenmittelungen **(e)** nach MRA/MSA der Hauptpopulation. Boxgröße: 21 nm.

Im nächsten Schritt wurden nur die Partikel mit Durchmessern zwischen 13 und 15 nm berücksichtigt. MSA/Klassifizierung dieser Hauptpopulation (4.617 Partikel) ohne

Translations- bzw. Rotationsalignierung (Abb. 14a,b) bzw. nach einer MRA mit einigen ausgewählten Klassenmittlungen (Abb. 14c) führten zu immer noch sehr heterogenen Klassenmittlungen (Abb. 14e), für die eine Zuordnung der Orientierung nicht möglich war. Daher wurden keine 3D-Rekonstruktionen vorgenommen.

Um zu testen, wie sich die Zugabe von Additiven wie Sucrose oder PEG bei der Adsorption auf die Qualität bzw. Homogenität der Hsp16.11 Partikel auswirkt, wurden die Versuche in Gegenwart von Sucrose (5 bzw. 10 %), PEG (5 % PEG 1500, PEG 4000 bzw. PEG 20.000) und Vicol 70 (300 mg/ml) wiederholt. Zudem wurde das Protein vor der Negativ Kontrastierung jeweils 10 bzw. 60 Minuten bei einer Temperatur von 40 °C inkubiert, um den Hitzeschock zu simulieren. Bei allen Versuchen lag Hsp16.11 in PBS Puffer (pH 7,2) vor. Als Kontrastmittel wurde AM verwendet. Auch diese Versuche brachten keine Verbesserung der Daten. Die Mittelungsbilder zeigten eine enorme Größenvarianz ohne erkennbare Strukturen.

4.2.2. Hsp16.2

In negativ kontrastierten Proben von Hsp16.12 wurden, wie bei Hsp16.11, stark heterogene Oligomere mit wenig Strukturmerkmalen beobachtet (Abb. 15). Auch hier zeigten die mit AM kontrastierten Proben (Abb. 15a) die meisten Details und wurden weiterverarbeitet. Nach der ersten MSA von 17.181 Einzelpartikelprojektionen ohne Alignierung wurde eine extreme Größenvarianz der Partikel deutlich (Abb. 16a). Wie bei Hsp16.11, enthielten weder die Eigen- noch die Klassenmittelungsbilder irgendwelche Strukturmerkmale oder Hinweise auf Symmetrien (Abb. 16a,b).

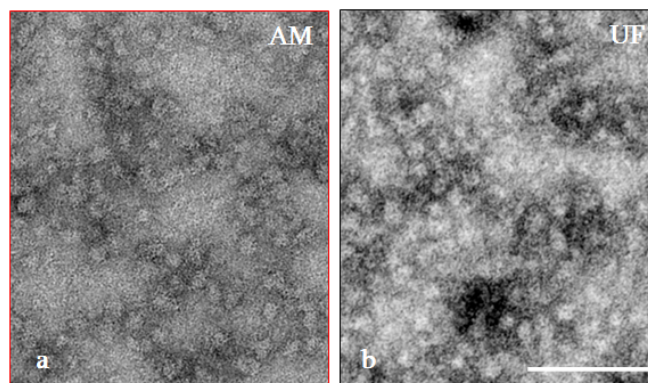


Abb. 15: Hsp16.2 (0,2 mg/ml in 20 mM PBS-KOH Puffer, pH 7,2) negativ kontrastiert mit Ammoniummolybdat (2 % w/v, pH 5,5) **(a)** und Uranylformiat (1,5 % w/v, pH 4,5) **(b)**. Balken: 100 nm.

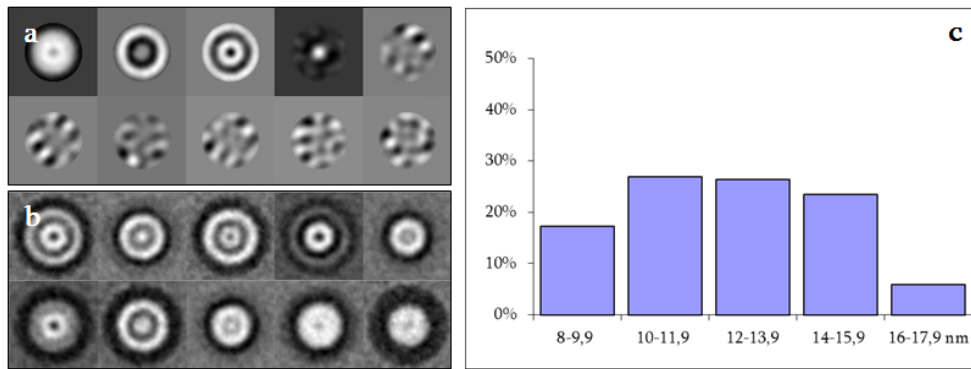


Abb. 16: **a)** Eigenbilder nach der ersten MSA des gesamten Hsp16.2 Datensatzes ohne Translations- bzw. Rotationsalignierung. Die Eigenbilder 2 und 3 deuten auf eine Größenvarianz. **b)** Typische Klassenmittelungen nach Sortierung des gesamten Datensatzes nach Partikelgrößen. Boxgröße: 21 nm. **c)** Partikelgrößenverteilung.

Die Partikelgrößen von Hsp16.2 variierten zwischen 8 und 20 nm (Abb. 16c). Obwohl keine eindeutige Hauptpopulation ausgemacht werden konnte, wurden im ersten Bildverarbeitungsschritt nur Partikel mit Durchmessern zwischen 13 und 15 nm berücksichtigt. Eine Analyse dieses reduzierten Datensatzes (4.901 Partikel) mittels MSA/Klassifizierung ohne Alignierung führten zu Eigen- (Abb. 17a) und Klassenmittelungsbildern (Abb. 17b) nahezu ohne Strukturmerkmale. Lediglich fiel eine leicht längliche Form mancher Partikel auf. Die Alignierung der Partikel durch MRA mit ausgewählten Klassenmittelungen (Abb. 17c) führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse (Abb. 17d,e). Auch hier konnten keine 3D-Rekonstruktionen berechnet werden.

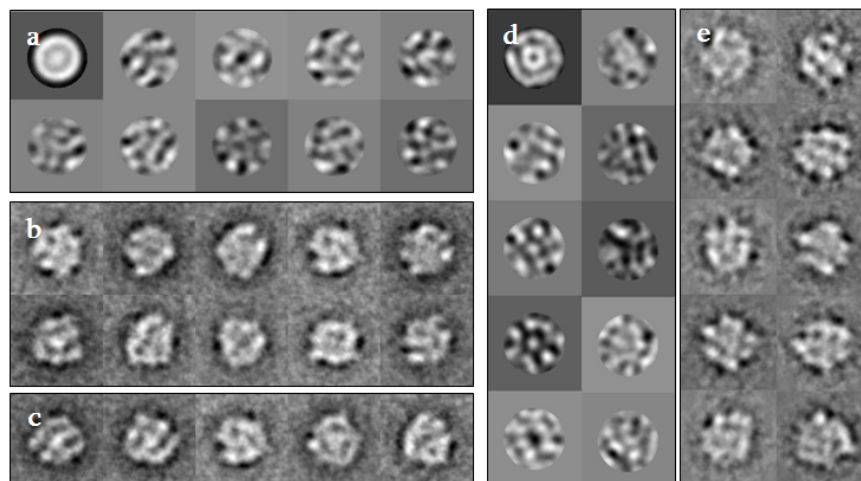


Abb. 17: Eigenbilder **(a)** und Klassenmittelungen **(b)** nach der ersten MSA des reduzierten Hsp16.2 Datensatzes ohne Translations- bzw. Rotationsalignierung. **(c)** Klassenmittelungen, die zur MRA herangezogen wurden. Eigenbilder **(d)** und Klassenmittelungen **(e)** nach MRA/MSA des reduzierten Datensatzes. Boxgröße: 21 nm.

Kontrastierungsexperimente an Hsp16.2 in Gegenwart von Additiven, wie sie bei Hsp16.11 verwendet wurden, oder auch nach Inkubation bei höheren Temperaturen führten nicht zu deutlicheren Ergebnissen.

Zusammenfassend lässt es sich sagen, dass sowohl Hsp16.11 als auch Hsp16.2 eine sehr stark ausgeprägte Heterogenität ihrer Oligomerformen zeigen. Vermutlich existieren Oligomere mit ähnlichen Größen jedoch unterschiedlichen Struktureigenschaften, die durch die hier verwendete Vorgehensweise nicht getrennt wurden.

4.3. Elektronenmikroskopische Analyse von Hsp16.41/Hsp16.48

Die beiden Vertreter der Hsp16 Subfamilie Hsp16.41 und Hsp16.48, die zu 93 % sequenzidentisch sind und zu dem oben beschriebenen Paar 70 % Homologie zeigen, wurden für eine erste Charakterisierung mittels Negativ Kontrastierung visualisiert.

4.3.1. Hsp16.41

3D-Rekonstruktion aus negativ kontrastierten Einzelpartikeln:

Im Vergleich zu Hsp16.11/16.2 zeigte Hsp16.41 in negativ kontrastierten Präparaten eine merklich geringere Heterogenität (Abb. 18a).

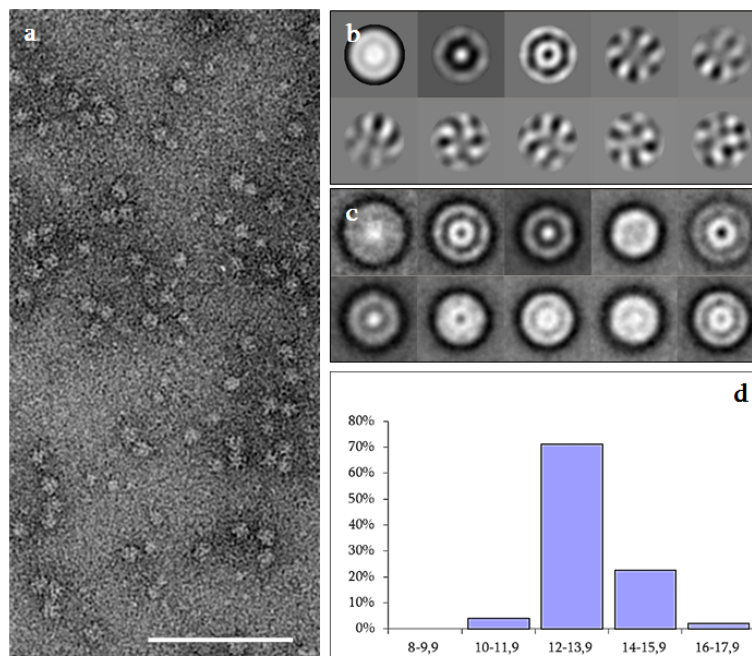


Abb. 18: a) Hsp16.41 (0,1 mg/ml in 20 mM PBS-KOH, pH 7,2) negativ kontrastiert mit Ammoniummolybdat (2 % w/v, pH 5,5). Balken: 100 nm. b) Eigenbilder nach der ersten MSA des gesamten Datensatzes ohne Alignierung. c) Klassenmittelungen nach Sortierung des gesamten Datensatzes nach Partikelgrößen. Boxgröße: 21 nm. d) Partikelgrößenverteilung.

Die Partikeldurchmesser variierten zwischen 10 und 16 nm mit einem Maximum um 13 nm (ca. 75 % der Gesamtpopulation) (Abb. 18d). Für die 3D-Rekonstruktion wurden 17.381 Projektionsbilder semi-automatisch ausgewählt und einer ersten MSA ohne Translations- bzw. Rotationsalignierung unterzogen. Die Eigenbilder (Abb. 18b), die auf eine Größenvarianz deuteten, wurden für eine erste Sortierung nach der Größe verwendet (Abb. 18c). Aus den Größenklassen wurde die Hauptpopulation um 13 nm extrahiert und gesondert weiter analysiert. Dieser homogenere Datensatz (12.688 Partikel) zeigte nach mehreren Iterationen von Rotations- und Translationsalignierungen und MSA in den Eigenbildern klar definierte Strukturvarianzen und Hinweise auf das Vorhandensein von 2- und 3-zähligen Symmetrien (Abb. 19a). Nach drei MSA/MRA/Klassifizierungs-Iterationen wurden Klassenmittelungen erhalten, die in den vorangegangenen Eigenbildern beobachteten Symmetrien bestätigten (Abb. 19b). Auf Grund dieser und mittels SEC erhaltenen Daten, die auf ein 24mer deuteten (Weinfurtner, 2008), wurde die erste 3D-Rekonstruktion unter Anwendung einer Tetraedersymmetrie durchgeführt. Das erhaltene 3D-Modell wurde iterativ verfeinert, welches zum Schluss nach 0,5 FSC-Kriterium eine Auflösung von 22 Å zeigte (Abb. 19d).

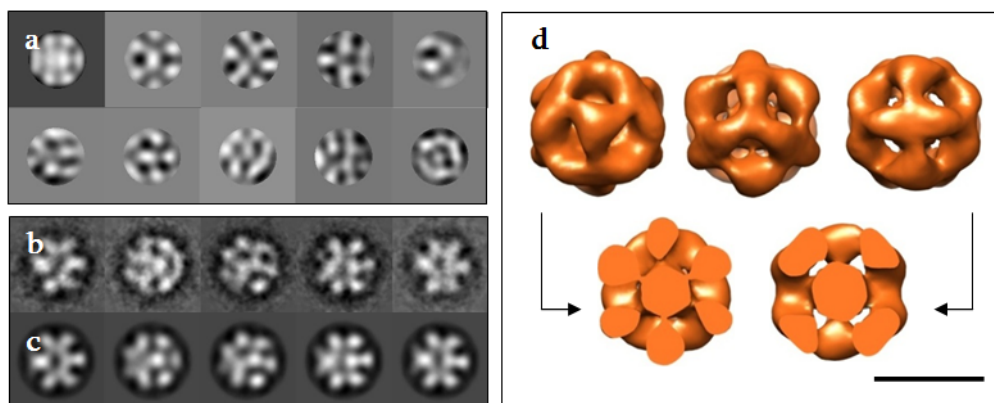


Abb. 19: 3D-Rekonstruktion von Hsp16.41 aus *C. elegans*. **a)** 10 der nach der MSA der alignierten „Hauptpopulation“ erhaltenen Eigenbilder. Das erste und das dritte Eigenbild deuten auf eine 3-, das zweite eine 2-zählige Symmetrie. **b)** Charakteristische Klassenmittelungen mit 2- bzw. 3-zähligen Symmetrien, die zur Berechnung des 3D-Modells mit Tetraedersymmetrie verwendet wurden. Boxgröße: 21 nm. **c)** Rückprojektionen des 3D-Modells in den gleichen Projektionsrichtungen wie die der Klassenmittelungen in (b). **d)** Oberflächendarstellung der finalen 3D-Rekonstruktion. Obere Reihe: Blickrichtung entlang einer 3-zähligen (links, mitte) (jeweils senkrecht auf die entgegengesetzten Durchstosspunkte der 3-zähligen Achse) und einer 2-zähligen Symmetrieachse (rechts). Untere Reihe: Dichtequerschnitte in den entsprechenden Richtungen. Balken: 10 nm.

Eine separate 3D-Rekonstruktion unter der Annahme von Oktaedersymmetrie führte in Bezug auf die Auflösung und die Übereinstimmung zwischen den Modell-Rückprojektionen und Klassenmittelungsbildern zu deutlich schlechteren Ergebnissen und wurde verworfen.

Nach der 3D-Rekonstruktion ist das Hsp16.41 24mer ein nahezu sphärisches Molekül mit einem Durchmesser von 13 nm. Die Untereinheiten sind auf der Proteinhülle, die breite Öffnungen enthält, entsprechend einer Tetraedersymmetrie angeordnet. Die Massen, die sich an entgegengesetzten Durchstossunkten einer 3-zähligen Achse befinden, unterscheiden sich in ihrer Verteilung bzw. Form. Im Inneren des Oligomers ist Masse zu erkennen, die mit der äußeren Proteinhülle durch dünne, mit den 2-zähligen Symmetrieachsen kongruente „Stege“ verbunden ist.

3D-Rekonstruktion aus eis-eingebetteten Einzelpartikeln (Kryo-EM):

Hsp16.41 erschien in Kryo-Präparaten weitgehend homogen (Abb. 20a). 29.830 Projektionsbilder wurden einer Analyse analog der Auswertung von negativ kontrastierten Einzelpartikeln unterzogen. Bereits die Eigenbilder nach einer ersten MSA ohne Rotationsalignierung zeigten neben Größenvarianzen ganz deutlich Symmetrielemente (Abb. 20b).

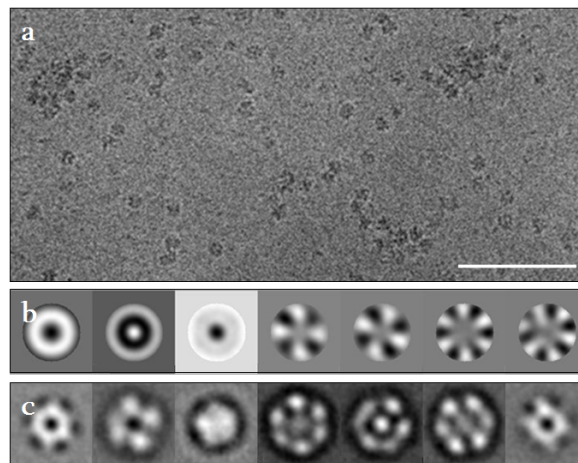


Abb. 20: **a)** Kryo-Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hsp16.41 (0,3 mg/ml in 20 mM PBS-KOH, pH 7,2). Balken: 100 nm. **b)** Die ersten 7 Eigenbilder nach einer MSA ohne Rotationsalignierung. Die ersten zwei Eigenbilder zeigen die Größenvarianz. Die Eigenbilder 4 und 5 deuten auf das Vorhandensein einer 2-zähligen, 6 und 7 einer 3-zähligen Symmetrie. **c)** Charakteristische Klassenmittelungsbilder ohne Alignierung. Deutlich sichtbar sind kleinere Partikel (Klassenmittelungen 1, 3 und 7) sowie Projektionsklassen mit 2- (Klassenmittelung 6) bzw. 3-zähliger Symmetrie (Klassenmittelung 4). Boxgröße: 21 nm.

Die Klassifizierung nach Größenvarianzen führte zu Klassenmittelungen mit Durchmessern zwischen 8 und 16 nm (Maximum um 14 nm, ca. 70 % der Gesamtpopulation). Während die Klassenmittelungen der Hauptpopulation die in den Eigenbildern beobachteten Symmetrien klar wiedergaben, waren diese in den Mittelungen der kleineren Partikel weniger deutlich zu sehen (Abb. 20c).

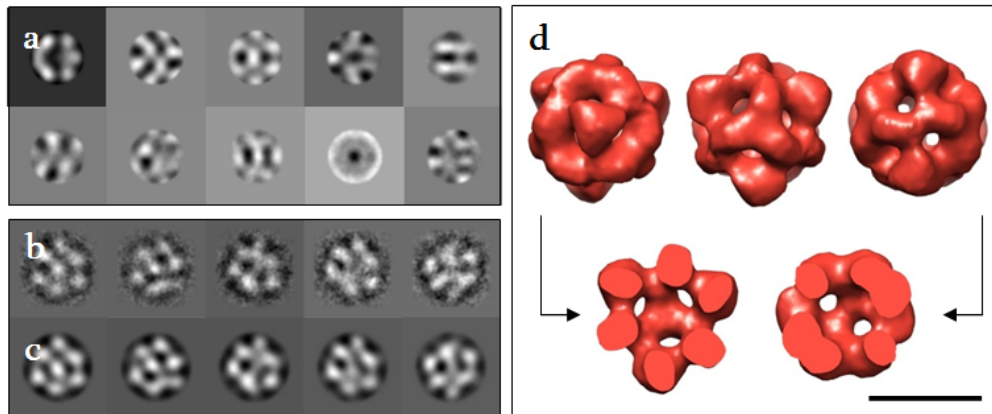


Abb. 21: **a)** 10 Eigenbilder der Hauptpopulation des Hsp16.41 Kryo-Datensatzes nach MRA und MSA. **b)** Charakteristische Klassenmittelungsbilder. Boxgröße: 21 nm. **c)** Rückprojektionen des 3D-Modells (Tetraedersymmetrie) in den gleichen Projektionsrichtungen wie in (b). **d)** Oberflächendarstellung der finalen Kryo-3D-Modells. Obere Reihe: Blickrichtung entlang einer 3-zähligen (links, mitte) und einer 2-zähligen Symmetrieachse (rechts). Untere Reihe: Dichtequerschnitte in den entsprechenden Richtungen. Balken: 10 nm.

Eine erste 3D-Rekonstruktion der Hauptpopulation mit Tetraedersymmetrie wurde in weiteren 10 Iterationen schrittweise verbessert. Dabei wurden die nicht eindeutig zugeordnete Einzelpartikel konsequent über Klassifizierungen der Hauptpopulation in bis zu 1.000 Klassen aussortiert, so dass die finale 3D-Rekonstruktion (Abb. 21d) nur noch ca. 40 % der ursprünglichen Partikel (ca. 10.900) enthielt. Es wurden nur Klassenmittelungen mit dem besten Korrelationswert nach „angular reconstitution“ verwendet.

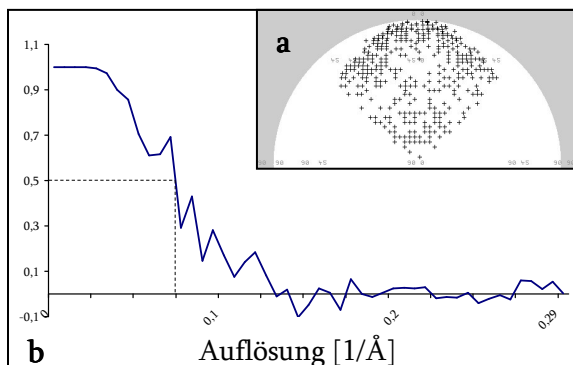


Abb. 22: **a)** Verteilung der Eulerwinkel im asymmetrischen Dreieck (Tetraedersymmetrie). Jedes Kreuz entspricht den Eulerwinkeln eines Klassenmittelungsbildes. **b)** FSC-Plot des „Kryo-Modells“ von Hsp16.41. Die Auflösung beträgt laut 0,5-FSC Kriterium 13 Å.

Die Eulerwinkel der Klassenmittelungen waren weitgehend homogen verteilt (Abb. 22a), so dass die Rekonstruktion keine größere Informationslücke aufwies. Anhand des 0,5 FSC-Kriteriums betrug die Auflösung des finalen Modells 13 Å (Abb. 22b).

Nach der 3D-Rekonstruktion bildet das Hsp16.41 24mer eine sphärische Proteinhülle mit einem Durchmesser von ca. 13 nm, in der die Untereinheiten entsprechend einer Tetraedersymmetrie angeordnet sind (Abb. 21d). Das 3D-Modell unterscheidet sich von dem aus negativ kontrastierten Einzelpartikeln in einigen Details. So sind die Öffnungen in der Proteinhülle nicht mehr so prominent, die Masse an einem der Durchstoßpunkte einer 3-zähligen Achse erscheint dagegen ausgeprägter (Abb. 21d, links). Auch sind die Konturen der Masse an der 2-zähligen Symmetrieachse wesentlich deutlicher. Der markanteste Unterschied ist jedoch, dass die im NS-Modell beobachtete Masse im Inneren des Oligomers in der Kryo-Rekonstruktion gar nicht mehr vorhanden ist. Damit stellt das Hsp16.41 eine Art Hohlkugel dar, in der die gesamte Masse in der Proteinhülle gepackt ist. Dieser zentrale Unterschied zwischen den beiden Modellen könnte dadurch bedingt sein, dass das Kontrastmittel nicht in das Innere des Oligomers hinein diffundieren konnte und damit Masse vortäuschte.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass das Hsp16.41 24mer nur eines von verschiedenen Oligomeren darstellt, die in einem Gleichgewicht co-existieren. Hinweise auf Oligomere mit anderen Stöchiometrien finden sich, wie oben erwähnt, in den Eigen- und Klassenmittelungsbildern des gesamten Datensatzes (Abb. 20b,c). Die strukturelle Plastizität des 24mers sowie die Strukturen von weiteren Oligomeren sind Fragen, die in Folgearbeiten eingehend untersucht werden müssen.

4.3.2. Hsp16.48

3D-Rekonstruktion aus negativ kontrastierten Einzelpartikeln:

Wie Hsp16.1 zeigte auch Hsp16.48 in negativ kontrastierten Präparaten eine im Vergleich zu Hsp16.11/16.2 wesentlich geringere Heterogenität (Abb. 23a). Die Partikeldurchmesser waren zwischen 10 und 16 nm mit einem Maximum um 13 nm (ca. 75 % der Gesamtpopulation) verteilt (Abb. 23d).

Für die Bildverarbeitung/3D-Rekonstruktion, die in allen Schritten analog zur Auswertung von Hsp16.41 durchgeführt wurde, wurden 14.750 Projektionsbilder zunächst hinsichtlich ihrer Größe klassifiziert. Aus den Größenklassen wurde die Hauptpopulation um 13 nm (10.761 Partikel) extrahiert und gesondert weiter analysiert (Abb. 24).

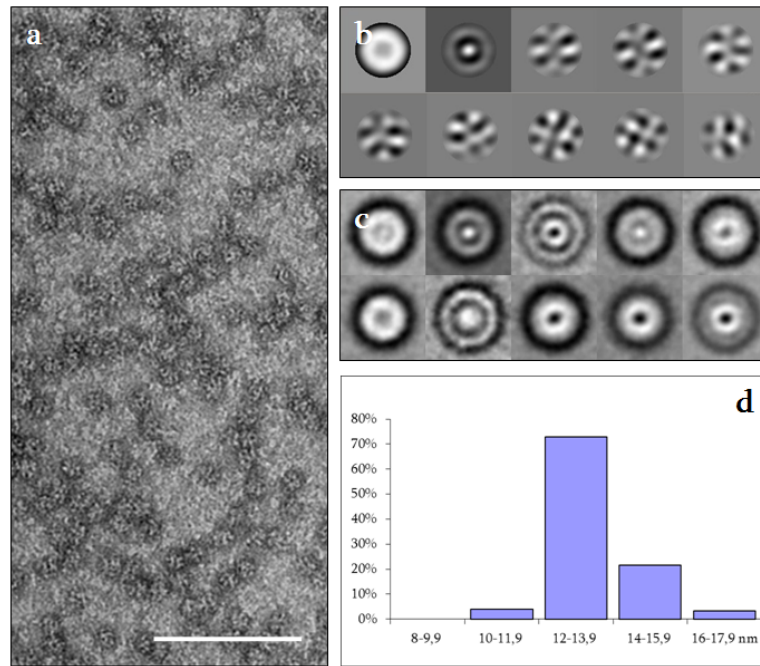


Abb. 23: **a)** Hsp16.48 (0,1 mg/ml in 20 mM PBS-KOH, pH 7,2) negativ kontrastiert mit Uranylformiat (0,75 % (w/v), pH 4,5). Balken: 100 nm. **b)** 10 Eigenbilder nach der ersten MSA des gesamten Datensatzes ohne Alignment. **c)** Klassenmittlungen nach Sortierung des gesamten Datensatzes nach Partikelgrößen. Boxgröße: 21 nm. **d)** Partikelgrößenverteilung.

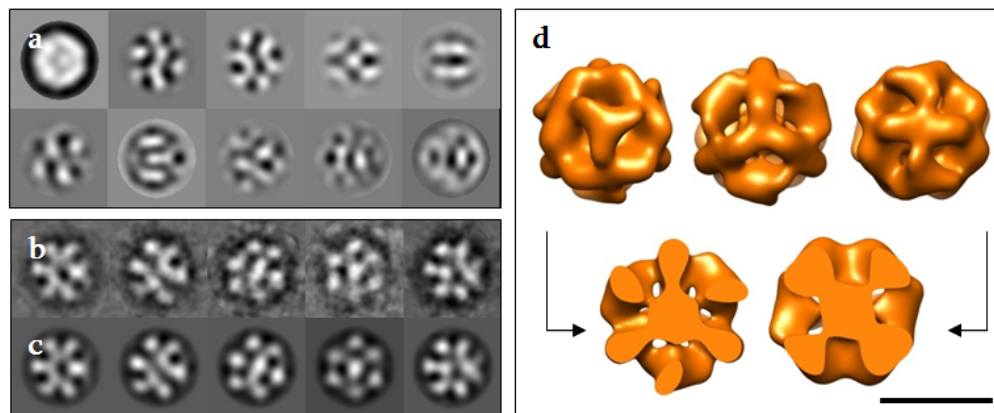


Abb. 24: 3D-Rekonstruktion von Hsp16.48 aus *C. elegans*. **a)** 10 der nach der MSA der alignierten „Hauptpopulation“ erhaltenen Eigenbilder. Die Eigenbilder 3-5 deuten auf eine 2-zählige Symmetrie. **b)** Charakteristische Klassenmittlungsbilder mit 2- bzw. 3-zähligen Symmetrien. Boxgröße: 21 nm. **c)** Rückprojektionen des ersten unter der Annahme einer Tetraedersymmetrie berechneten 3D-Modells in den gleichen Projektionsrichtungen wie in (b). **d)** Oberflächendarstellung der finalen 3D-Rekonstruktion. Oberen Reihe: Blickrichtung entlang einer 3-zähligen (links, mitte) und einer 2-zähligen Symmetrieachse (rechts). Untere Reihe: Dichtequerschnitte in den entsprechenden Richtungen. Balken: 10 nm.

Nach der 3D-Rekonstruktion (Abb. 24d) zeigt das Hsp16.48 24mer alle Strukturmerkmale, die auch bei dem Hsp16.41 24mer beobachtet wurden: es ist ein nahezu sphärisches Molekül (Durchmesser 13,5 nm) mit einer Proteinhülle, in der die Unter-

einheiten entsprechend einer Tetraedersymmetrie angeordnet sind. Die Proteinhülle enthält breite Öffnungen, die zwischen den Symmetrieachsen lokalisiert sind. Auch hier haben die Massen, die an entgegengesetzten Durchstoßpunkten der 3-zähligen Achse lokalisiert sind, unterschiedliche Formen. Im Inneren des Oligomers ist ebenfalls Masse zu erkennen, die mit der äußeren Proteinhülle durch dünne, mit den 2-zähligen Symmetrieachsen kongruente „Stege“ verbunden ist. Ob diese Masse wie bei Hsp16.41 gar nicht vorhanden ist, aber durch das Kontrastmittel vorgetäuscht wird, ist in weiteren Arbeiten mittels Kryo-EM zu klären.

4.4. Sip-1

4.4.1. Generelle Eigenschaften

Sip-1 (Stress Induced Protein 1, SEC-1, Small Embryonic Chaperon 1) nimmt innerhalb der Hsp16 Proteinfamilie eine gesonderte Stelle ein (Linder *et al.*, 1996). Das Protein wird nur während der Embryogenese expremiert, seine mRNA ist nur in Oozyten und im Embryo detektierbar, nicht aber im Larvenstadium. Werden anti-sens-Oligonukleotide zu Sip-1 in *C. elegans* Oozyten injiziert, stoppt die Entwicklung der Embryonen schon bald nach der Befruchtung (Linder *et al.*, 1996) was auf eine essentielle Funktion von Sip-1 in der frühen Embryogenese hindeutet. Die Expression von Sip-1 wird, im Gegensatz zu den anderen sHsps in *C. elegans*, nicht durch äußere Stressfaktoren wie Hitze hochreguliert (Linder *et al.*, 1996), sie steht unter der Kontrolle von Entwicklungsfaktoren wie z.B. Transkriptionsfaktoren. Dies kommt auch in der Kopplung zwischen Proteinsynthese und der Menge der expremierten Sip-1 zum Ausdruck: die Sip-1 Expression steigt zu Beginn der Embryogenese gekoppelt mit intensiver Proteinbiosynthese und Zellteilung stark an, während die zum Ende der Embryogenese abnehmende Proteinbiosynthese mit sinkender Sip-1 Expression korreliert.

Chaperonaktivität:

Bei der Expression von Sip-1 in *Escherichia coli* konnte eine deutlich gesteigerte Thermotoleranz gezeigt werden, was auf seine *in vivo* Chaperonaktivität hindeutet. Sip-1 ist *in vitro* in der Lage, die Aggregation von entfaltenen Substratproteinen zu unterdrücken, allerdings nur wenn es im großen Überschuss vorliegt (Abb. 25a) (Weinfurtner, 2008). Damit weicht es in seiner Chaperonaktivität von den anderen

Mitgliedern der Hsp16 Proteinfamilie. Zudem ist seine Chaperonaktivität sehr stark vom pH-Wert abhängig (Abb. 25b): während das Protein bei einem pH von 7,0 nicht aktiv ist und mit Substratproteinen co-aggregiert, wird bei einem pH von 6,3 eine ca. 50 %ige Aggregationsunterdrückung bei einem sechsfachen Überschuss von Sip-1 erreicht (Monomerverhältnis).

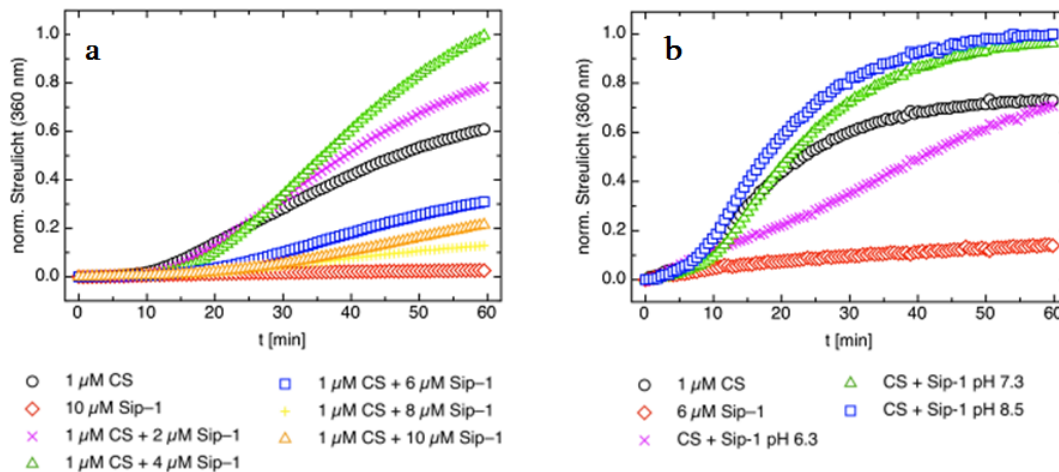


Abb. 25: a) Kinetik der Aggregation von thermisch entfalteter Citratsynthase (CS) bei unterschiedlichen Sip-1 Konzentrationen. Messungen wurden in 20 mM MOPS, pH 6,3 und bei 40 °C durchgeführt (Weinfurtner, 2008). **b)** Aggregationskinetiken von CS in Ggw. von 6 μ M Sip-1 bzw. ohne Sip-1 bei verschiedenen pH-Werten. Die Messungen bei pH 8,5 und 7,3 wurden in 20 mM HEPES, bei pH 6,3 in 20 mM MOPS durchgeführt (Weinfurtner, 2008).

Struktureigenschaften:

Sip-1 hat 159 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 17,8 kDa. Seine α -Kristallin Domäne zeigt zu der des humanen α B-Kristallins ca. 40 % Sequenzidentität. Im Gegensatz zu den anderen sHsps aus der engeren Hsp16 Proteinfamilie, sind in der Sequenz von Sip-1 zwei Cysteine an den Positionen 5 und 54 vorhanden. Es enthält 10 Histidine, so dass sein berechneter pI bei 8,2 liegt. Da der intrazelluläre pH-Wert von *C. elegans* ca. 6,3 beträgt (Wadsworth and Riddle, 1988), trägt Sip-1 *in vivo* vermutlich positive Ladungen.

Die Sekundärstruktur von Sip-1 weist alle für sHsps typischen Charakteristika auf: das ferne UV-CD Spektrum (gemessen in 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0) zeigt ein breites, ausgeprägtes Minimum bei 216 nm, welches für einen hohen Gehalt an β -Faltblatt-Struktur spricht (Weinfurtner, 2008). Innerhalb der Hsp16 Proteinfamilie zeichnet es sich durch den geringsten α -helikalen Anteil aus (Weinfurtner, 2008). Die Sekundärstruktur scheint sich bei verschiedenen pH-Werten nicht merk-

lich zu ändern. Höhere Temperaturen führen jedoch zu einer irreversiblen Konformationsänderung (Weinfurtner, 2008).

Die Quartärstruktur von Sip-1 zeigt einige Besonderheiten, die im Detail noch nicht verstanden sind. Das in *E. coli* überexprimierte Protein wird nativ in drei Schritten (Anionenaustausch/Größenausschluss/Anionenaustausch) bei pH 8,5 gereinigt, wobei die ersten beiden Chromatographie-Schritte in 50 mM TRIS-Puffer unter reduzierenden (+ DTT, + EDTA, + NaCl), der letzte Schritt dagegen in 20 mM HEPES-Puffern unter oxidierenden (- DTT, - EDTA, + NaCl) Bedingungen durchgeführt werden (Weinfurtner, 2008). Laut analytischer SEC (Messungen in 20 mM MOPS, 150 mM NaCl, pH 6,3) liegt das so gereinigte Protein homogen als ein Oligomer mit einem Molekulargewicht von 415 ± 50 kDa vor (20-26 Untereinheiten). (Weinfurtner, 2008). Messungen mittels analytischer UZ (in PBS-Puffer bei pH 7,4) deuten auf einen ähnlichen Wert von 424 kDa (Weinfurtner, 2008).

Bei der Zusammenstellung der obigen Beobachtungen fällt es auf, dass die meisten Experimente bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt wurden. So variieren Art und Zusammensetzung der verwendeten Puffer, pH-Werte, Redoxbedingungen sowie Salzkonzentrationen erheblich. Angesichts der Tatsache, dass Sip-1 in seiner Sequenz zwei Cysteine besitzt und in seinem Verhalten empfindlich vom Redoxpotential, aber auch vom pH-Wert der Umgebung beeinflusst werden kann, erlauben die Experimente keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen der Chaperonaktivität und dem Oligomerzustand des Proteins. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst versucht, das Verhalten von Sip-1 abhängig von genannten Faktoren zu bestimmen.

4.4.2. Redoxabhängige Oligomerisierung von Sip-1

Wie bereits erwähnt, besitzt Sip-1 an den Positionen 5 und 54 zwei Cysteine. Um das Vorhandensein bzw. den möglichen Einfluss von Disulfidbrücken auf das Oligomerisierungsverhalten von Sip-1 zu überprüfen, wurde das Protein unter reduzierenden, neutralen und oxidierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 26).

In 20 mM HEPES bei pH 7,0 und unter reduzierenden Bedingungen, d.h. nach Zugabe von Dithiothreitol (DTT), wanderte Sip-1 im Gel als eine Bande bei ca. 18 kDa, die einem Monomer entsprach. Zusätzlich war eine schwache Dimerbande 39 kDa zu beobachten. Bei geringen DTT Konzentrationen (1 mM) erschien zusätzlich zu Monomer- und Dimerbanden noch eine weitere Bande, die einem höheren Oligomer

entsprach. Wenn kein Reduktionsmittel vorhanden war (neutral bzw. schwach oxidierend), war die Dimerbande am prominentesten, während die Monomerbande merklich schwächer wurde. Zusätzlich wurden Banden, die tri- und tetramere Spezies andeuteten, deutlicher. Nach Zugabe des Oxidationsmittels trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithion wurden die gleichen Spezies wie unter „neutralen“ Bedingungen beobachtet.

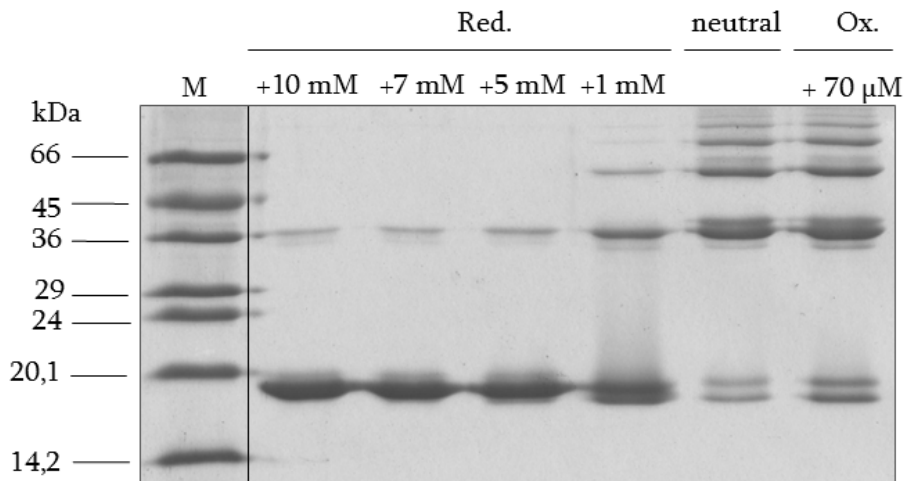


Abb. 26: Redox-Analyse von Sip-1. SDS-PAGE (Coomassie gefärbt) von Sip-1 unter reduzierenden, neutralen und oxidierenden Bedingungen. Alle Versuche wurden in 20 mM HEPES, pH 7,0 durchgeführt. M: Molekulargewicht. Linke Spur: Molekulargewichtsmarker.

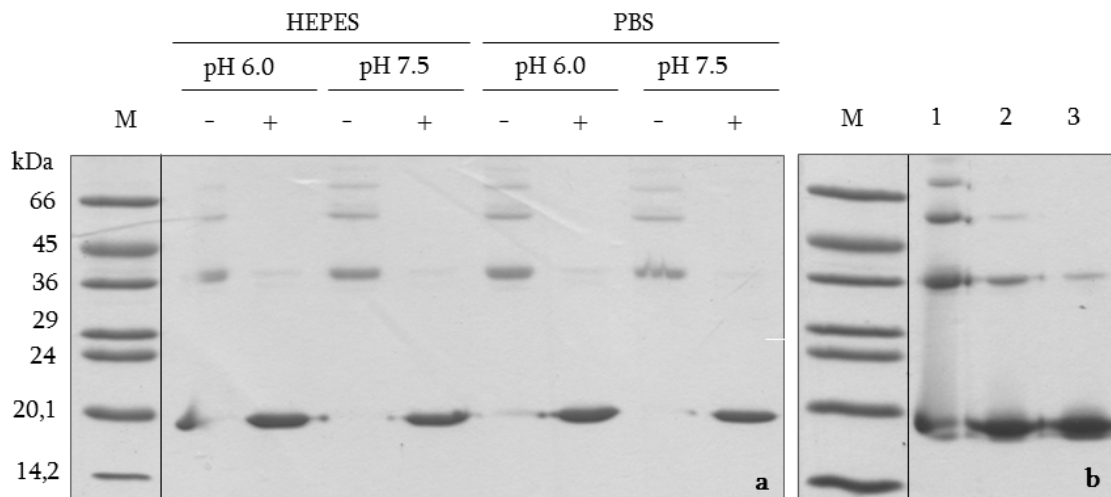


Abb. 27: a) Redox-Analyse von Sip-1 (14 µM) in 20 mM HEPES sowie in 40 mM PBS, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ bei pH-Werten von 6,0 und 7,5. (+): 5 mM DTT, (-): kein DTT. Linke Spur: Molekulargewichtsmarker. **b)** Redox-Analyse von Sip-1 in 40 mM PBS, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5 mit TCEP als Reduktionsmittel. (1) Sip-1 (14 µM), (2) Sip-1 (14 µM) + 2 mM TCEP, (3) Sip-1 (14 µM) + 20 mM TCEP.

Im HEPES Puffer bei pH-Werten 6,0 bzw. 7,5 aber auch in 40 mM PBS, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ bei pH-Werten 6,0 bzw. 7,5 lag Sip-1 unter reduzierenden Bedingungen fast ausschließlich als Monomer, unter nicht reduzierenden Bedingungen hauptsächlich als Dimer vor (Abb. 27a). Dieses Ergebnis wurde auch in Versuchen bestätigt, in denen TCEP als Reduktionsmittel benutzt wurde (Abb. 27b).

In weiteren Experimenten wurde Sip-1 zur Bestimmung seines Molekulargewichts und zur Abschätzung seiner Untereinheitenstöchiometrie mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Dazu wurden zusammen mit Alexander Bepperling (Lehrstuhl für Biotechnologie, TUM) Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente unter den in der Tabelle 2 aufgelisteten Bedingungen durchgeführt. Da diese sehr ähnliche Verläufe zeigten, sind in Abbildung 28 nur zwei Beispiele gezeigt.

Pufferzusammensetzung/pH	Molare Masse (kDa)	S
10 mM HEPES	6,0	15,2
	6,2	15,2
	6,5	15,2
20 mM PBS, 10 mM NaCl	6,0	15
	6,5	15,5
	7,0	16
	7,5	15
	8,0	15,5
10 mM HEPES, 10 mM TCEP	6,5	~18-36
		3,5

Tabelle 2: Pufferzusammensetzungen und pH-Werte für die Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente. Konzentration Sip-1: 0,5 mg/ml. S: Sedimentationskoeffizient.

Sip-1 zeigte in allen Experimenten außer unter reduzierenden Bedingungen eine definierte und stark ausgeprägte Oligomerpopulation und nur einen geringen Anteil an anderen oligomeren Spezies (Abb. 28a). Der Sedimentationskoeffizient dieser Hauptpopulation lag bei allen Experimenten um ca. 16 S, was einem Molekulargewicht von ca. 420 kDa entsprach (24 Untereinheiten) (Abb. 28a). Unter reduzierenden Bedingungen sedimentierte Sip-1 als Monomer bei 3,5 S (Abb. 28b). Für eine erste Analyse der strukturellen Charakteristika von Sip-1 Oligomeren wurde das Protein mittels Negativ Kontrastierung abgebildet (Abb. 29). Die Ergebnisse aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigten die Befunde aus SDS-PAGE und AUZ: Sip-1 bildet ohne Reduktionsmittel (Abb. 29a) sowie in Gegenwart von Oxidationsmitteln (Abb. 29c,d) Oligomere mit einem Durchmesser von ca. 14 nm. In Gegenwart von Reduktionsmitteln sind keine großen Oligomere mehr auszumachen (Abb. 29b).

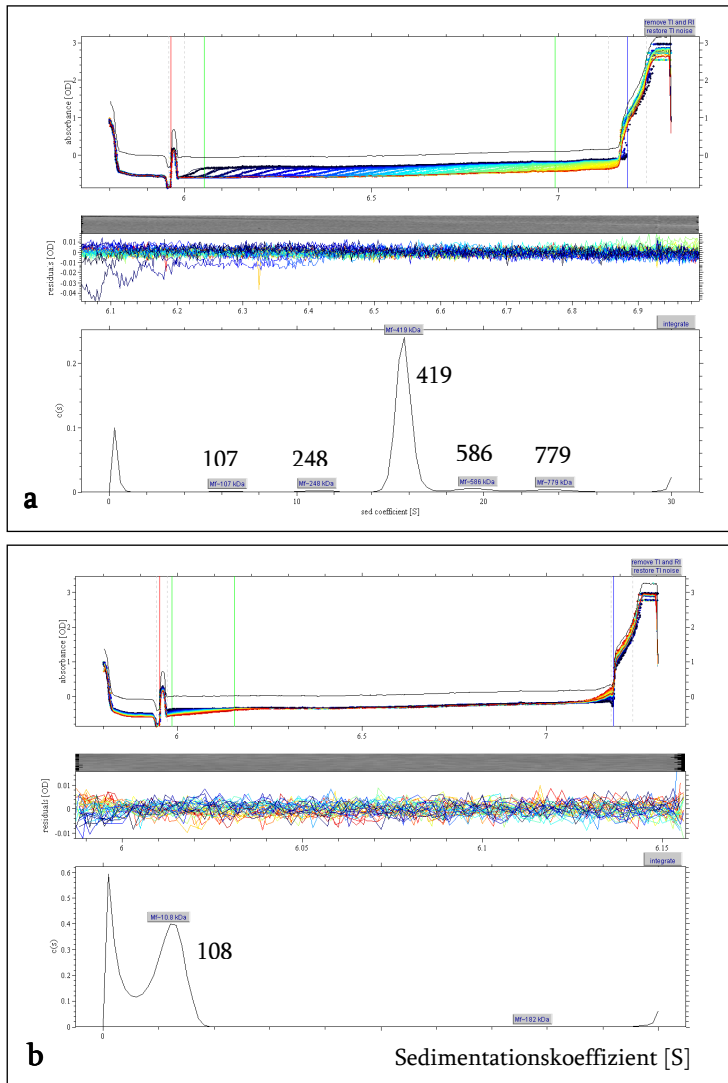


Abb. 28: a) Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment für Sip-1 (0,5 mg/ml) in 10 mM HEPES, pH 6,5. Die Sedimentation wurde bei einer Umdrehungszahl von 30.000 Upm bei 20 °C durchgeführt. Oben: Radialposition der Sedimentationsfront. Mitte: Residual-Plot der Parameterschätzung nach der Svedberg/Konzentrationsverteilungsmethode $c(S)$. Unten: Svedberg/Konzentrationsverteilung der ermittelten Spezies mit den zugeordneten molekularen Massen. **b)** Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment für Sip-1 (0,5 mg/ml) in 10 mM HEPES, 10 mM TCEP, pH 6,5.

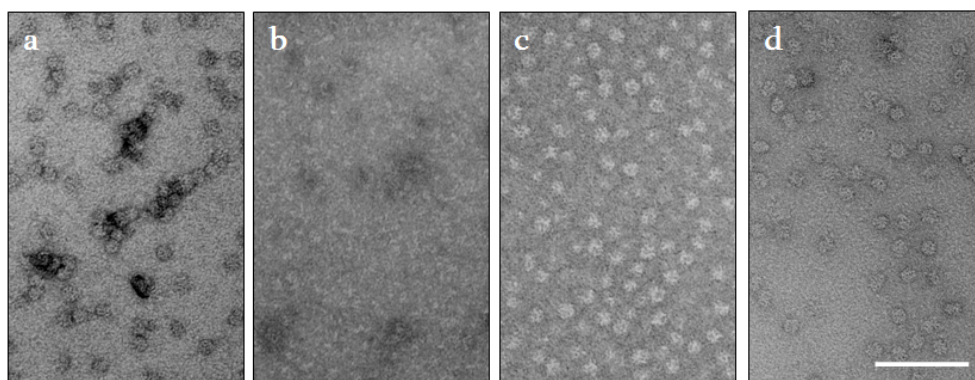


Abb. 29: Sip-1 (40 mM MOPS, 100 mM NaCl, pH 6,5) negativ kontrastiert mit Uranylacetat (2 % (w/v), pH 4,5). **a)** Sip-1 ohne Redoxmittel bzw. in Gegenwart von 10 mM DTT **(b)**, 10 mM trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithion **(c)** und 50 mM HOCl **(d)**. Balken: 100 nm.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Sip-1 *in vitro* unabhängig vom verwendeten Puffer und pH-Wert inter- und/oder intramolekulare Disulfidbrücken

bildet und diese für die Oligomerisierung eventuell entscheidend sind. In seinem Verhalten gegenüber Reduktionsmitteln ähnelt Sip-1 dem redoxaktiven Hsp33 aus *E.coli* (Graumann *et al.*, 2001, Graf *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2008). Das Hsp33, das als Zn^{2+} -gebundene Dimere vorliegt, dissoziiert unter reduzierenden Bedingungen in inaktive Monomere, die nach Inkubation mit Oxidationsmitteln über Disulfidbrücken assoziieren und dabei Zn^{2+} freisetzen. Um zu überprüfen, ob Sip-1 in Analogie zu Hsp33 auch zweiwertige Metallionen gebunden hat, wurde das Protein gegen Millipore-Wasser dialysiert und mittels TXRF analysiert (Abb. 30). Die Analyse zeigte das Vorhandensein von einer signifikant hohen Kalzium-Konzentration in Sip-1 Lösungen, die in Vergleichsproben (Wasser aus unterschiedlichen Quellen) nicht vorhanden war (Abb. 30).

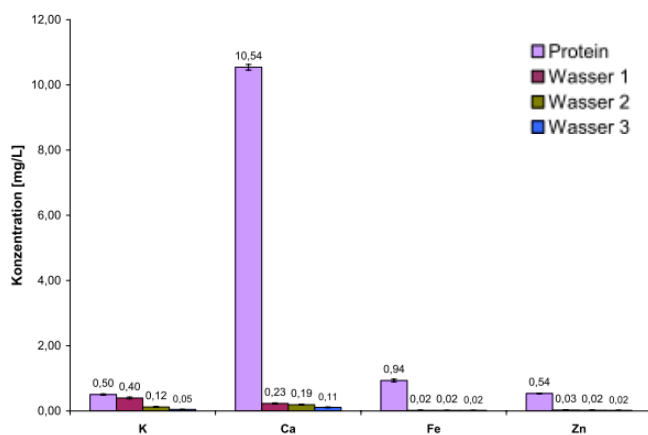


Abb. 30: TXRF Analyse von Sip-1. Das Protein wurde vor der Analyse gegen Millipore-Wasser dialysiert. Die Konzentration von 10 mg/L Ca^{2+} entspricht 250 μM . Sip-1 wurde mit einer Konzentration von 70 μM eingesetzt. Für Kalzium entspricht dies einem molaren Überschuss von 3:1.

Interessanterweise konnten in den Experimenten, in denen Sip-1 in Gegenwart von EDTA negativ kontrastiert wurde, keine ca. 14 nm großen Oligomere mehr beobachtet werden. Insgesamt scheint also wahrscheinlich, dass Sip-1 Kalzium bindet, welches vermutlich das Oligomerisierungsverhalten moduliert. Allerdings müssen zu diesem Punkt detailliertere Untersuchungen durchgeführt werden, da EDTA auch das Redoxpotential des Systems beeinflussen könnte.

4.4.3. Quartärstruktur von Sip-1/Negativ Kontrastierung

Die ersten elektronenmikroskopischen Analysen zur strukturellen Charakterisierung von Sip-1 wurden in **10 mM HEPES** bei einem pH-Wert von **8,5** durchgeführt, da das Protein beim letzten Reinigungsschritt aus der Anionenaustauschersäule mit dem genannten Puffer eluiert wird. In mit Uranylacetat kontrastierten Präparaten zeigte Sip-1 runde, strukturierte Projektionsbilder mit einem mittleren Durchmesser von ca. 14 nm (Abb. 31a). Nach einer ersten MSA ohne Translations- bzw. Rotationsalig-

nierung erhaltene Eigenbilder zeigten 7- bzw. 8-zählige Symmetrien (Abb. 31b), was darauf hindeutete, dass sich Sip-1 strukturell von den anderen sHsps aus *C. elegans* deutlich unterscheidet.

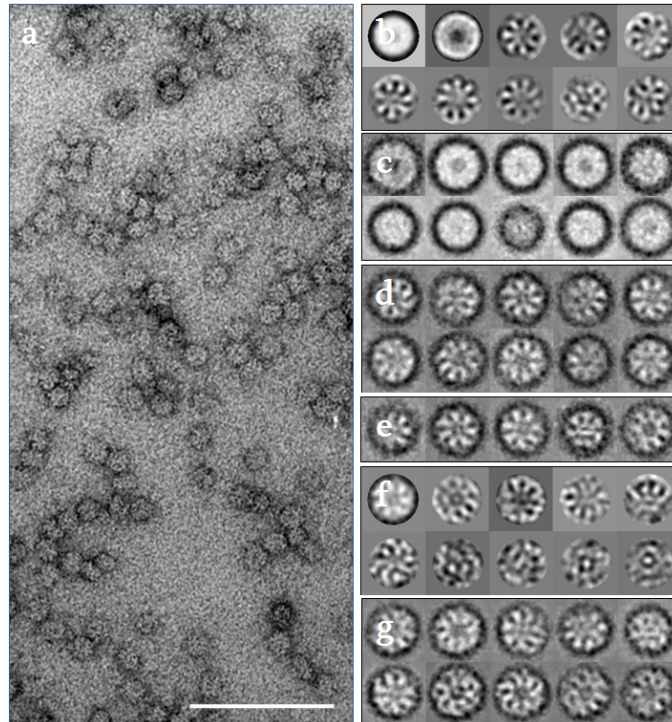


Abb. 31: **a)** Sip-1 in 10 mM HEPES, pH 8,5, negativ kontrastiert mit Uranylacetat (2% (w/vol), pH 4,5). Balken: 100 nm. **b)** 10 Eigenbilder nach der ersten MSA von 4.116 Partikeln ohne Alignierung. Eigenbilder 1 und 2 deuten auf Größenvarianzen, während die Eigenbilder 3-6 7- und/oder 8-zählige Symmetrien vermuten lassen. **c)** Einige Klassenmittlungen nach Sortierung des gesamten Datensatzes nach Größenunterschieden. **d)** Klassenmittlungen unter Berücksichtigung der ersten 10 Eigenbilder. **e)** Referenzen, die zur Alignierung des Datensatzes herangezogen wurden. **f)** 10 Eigenbilder nach der MSA von alignierten Einzelpartikel. **g)** Klassenmittlungsbilder (alignierter Datensatz) unter Berücksichtigung von 10 Eigenbildern. Boxgröße: 21 nm.

Die hohe Ähnlichkeit der Mittelungsbilder, d.h. das Fehlen von verschiedenen Ansichten des Moleküls zeigte, dass Sip-1 auf der Kohleschicht mit einer Vorzugsorientierung adsorbiert. Zwar deuteten gekippte Aufnahmen Seitenansichten des Moleküls an, diese konnten nicht deutlich zugeordnet werden und wurden nicht weiter verwendet. Um die bevorzugte Adsorption von Sip-1 auf dem Substrat vermeiden zu können, wurden in weiteren Versuchen Salz-, Puffer- Proteinkonzentrationen, Pufferzusammensetzung sowie Adsorptions- bzw. Beglimmzeiten variiert.

In einer ersten Versuchsreihe wurde Sip-1 in 10 mM HEPES, 20 mM NaCl bei pH-Werten von 6,0, 7,0 und 8,0 abgebildet (Abb. 32). Zwar wurden auch in dieser Ver-

suchsreihe nur wenige Seitenansichten des Moleküls beobachtet, eine erste Klassifizierung/Größenanalyse der Einzelpartikel zeigte jedoch deutlich, dass Sip-1 in HEPES-Puffer die größte Heterogenität bei pH 6,0 besaß (Abb. 33).

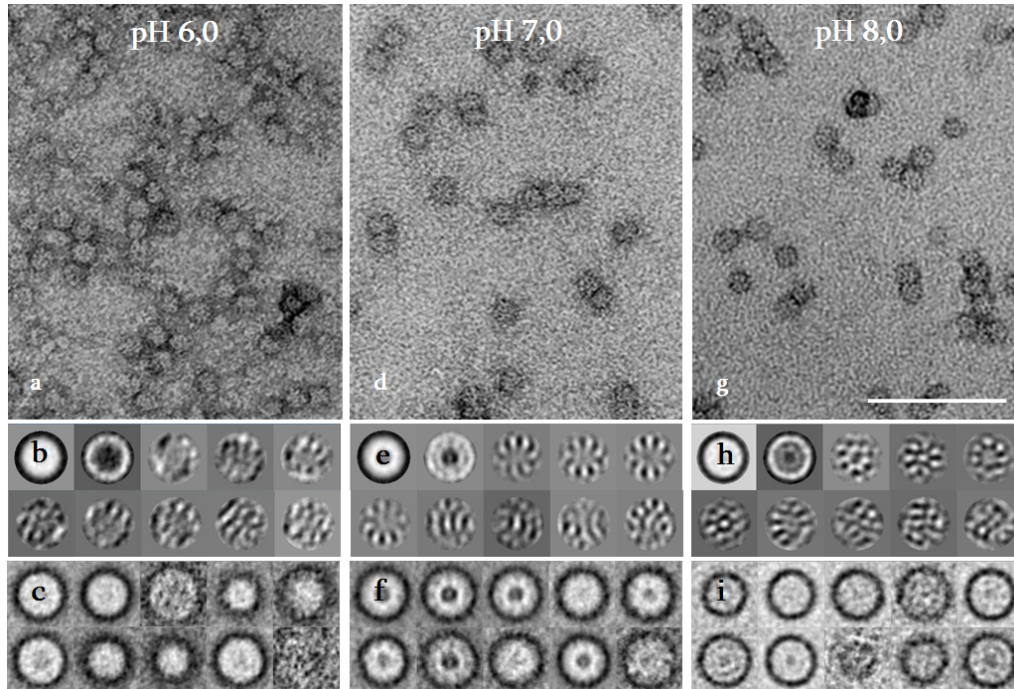


Abb. 32: Sip-1 in 10 mM HEPES, 20 mM NaCl bei einem pH Wert von 6,0 (a), 7,0 (b) und 8,0 (c) negativ kontrastiert mit Uranylacetat (2% (w/vol), pH 4,5). Balken: 100 nm. b, e, h) 10 Eigenbilder nach der ersten MSA des jeweiligen Datensatzes ohne Translations- bzw. Rotationsalignierung der Einzelpartikel. c, f, i) Klassenmittlungen nach Sortierung des jeweiligen Datensatzes nach Größenunterschieden. Boxgröße: 21 nm.

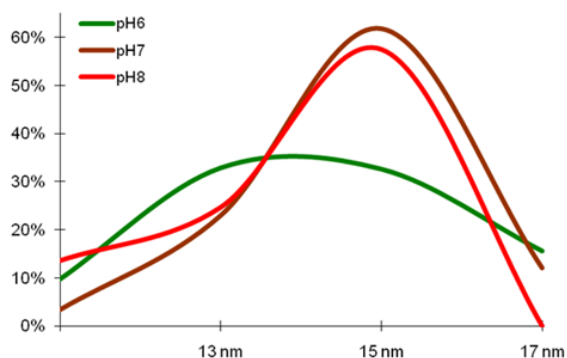


Abb. 33: Größenanalyse der Sip-1 Oligomere in 10 mM HEPES, 20 mM NaCl bei pH-Werten von 6,0, 7,0 und 8,0. Anzahl der ausgewerteten Partikel: pH 6,0: 1.637; pH 7,0: 2.069, pH 8,0: 1.247.

Auch in der Versuchsreihe, in der Sip-1 in einem Puffer der Zusammensetzung 20 mM MES/MOPS, 20 mM KCl, 5 mM CaCl₂ und bei pH-Werten von 6,3 und 8,0 bzw. in 20 mM TRIS, 20 mM KCl, 5 mM CaCl₂, pH 9,0 mittels Negativ Kontrastierung abgebildet wurde (Abb. 34), war eine bevorzugte Adsorption zu beobachten. Nach der Klassifizierung/Größenanalyse der Einzelpartikel aus den jeweiligen Versuchen

wurde deutlich (Abb. 35), dass Sip-1 auch in MES/MOPS-Puffer die größte Heterogenität bei pH 6,3 zeigte.

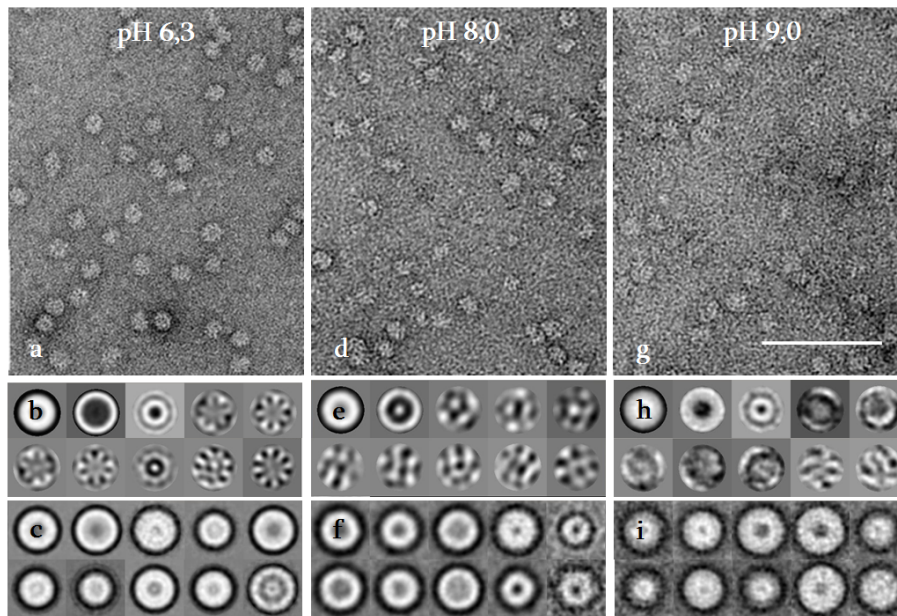


Abb. 34: Sip-1 in 20 mM MES/MOPS, 20 mM KCl, 5 mM CaCl₂ bei einem pH Wert von 6,3 (a), 8,0 (b) und 9,0 (c) negativ kontrastiert mit Uranylacetat (2% (w/vol), pH 4,5). Balken: 100 nm. b, e, h) 10 Eigenbilder nach der ersten MSA des jeweiligen Datensatzes ohne Translations- bzw. Rotationsalignierung der Einzelpartikel. c, f, i) Einige Klassenmittlungen nach Sortierung des jeweiligen Datensatzes nach Größenunterschieden. Boxgröße: 21 nm.

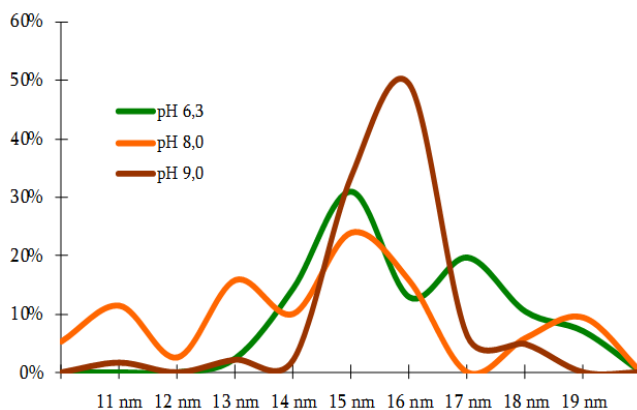


Abb. 35: Größenanalyse der Sip-1 Oligomere in 20 mM MES/MOPS, 20 mM KCl, 5 mM CaCl₂ bei pH-Werten von 6,3, 8,0 und 9,0. Anzahl der ausgewerteten Partikel: pH 6,3: 5.886; pH 8,0: 6.588, pH 9,0: 1.567.

Interessanterweise zeigten sich auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Sip-1, welches in MES/MOPS-Puffer bei pH 6,3 abgebildet wurde, einige ovale Partikel, die Seitenansichten des Moleküls entsprachen. Daher wurden die Aufnahmen einer Bildverarbeitung ohne Trennung der Partikel nach Größen unterzogen (Abb. 36). Bereits eine erste MSA des gesamten Datensatzes ohne Alignierung führte zu Klassenmittelungsbildern (Abb. 36c), die auf einen fassförmigen Aufbau des Sip-1 hindeuteten, was in weiteren Schritten bestätigt wurde (Abb. 36f).

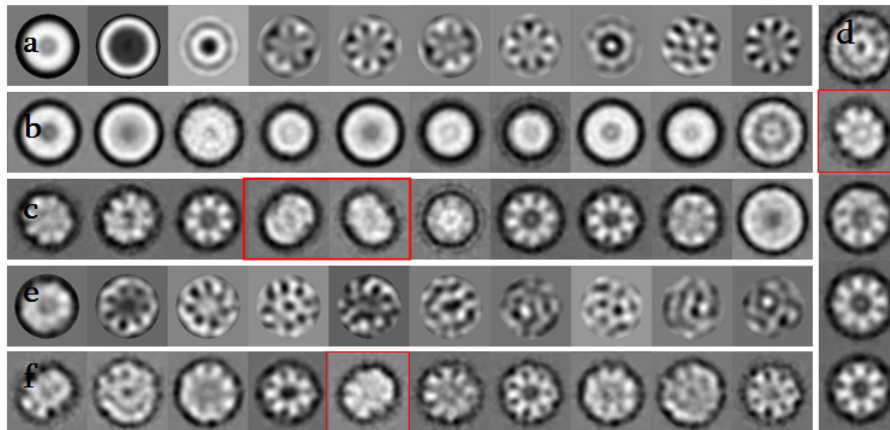


Abb. 36: MSA/Klassifizierung von Einzelpartikeln von Sip-1 in **20 mM MES/MOPS, 20 mM KCl, 5 mM CaCl₂, pH 6,3**. **a)** 10 Eigenbilder nach der ersten MSA des Datensatzes ohne Alignment der Einzelpartikel. **b)** Klassenmittlungen nach Sortierung des jeweiligen Datensatzes nach Größenunterschieden. **c)** Klassifizierung der unalignierten Einzelpartikel unter Berücksichtigung aller Eigenbilder. **d)** Referenzen zur Alignment. **e)** 10 Eigenbilder nach der MSA aller alignierten Einzelpartikel. **f)** Finale Klassenmittlungen. Beachte die ovalen Seitenansichten des Moleküls in (c) und (f). Boxgröße: 21 nm.

Insgesamt zeigten die Experimente mittels Negativ Kontrastierung deutlich, dass das Sip-1 unter allen Versuchsbedingungen als eine heterogene Mischung von in ihrer Symmetrie und Größe unterschiedlichen Oligomerformen existiert. Die Oligomere besitzen eine fassförmige Struktur und unterscheiden sich dadurch erheblich von den anderen sHsps aus *C. elegans*.

4.4.4. Quartärstruktur Sip-1/Kryo-Elektronenmikroskopie:

Sip-1 wurde zunächst in **20 mM HEPES, pH 8,5** vitrifiziert und im TEM beobachtet (Abb. 37a). Nach einer MSA von 5.510 Einzelpartikeln ohne Alignment erhaltene Eigenbilder deuteten auf Größenvarianzen und 2-, 7- und 8-zähligen Symmetrien (Abb. 37b), die in den Datensätzen aus negativ kontrastierten Partikeln vermutet wurden. Nach zwei MSA/MRA-Zyklen erhaltene Klassenmittlungen verdeutlichten Größenvarianzen (12-15 nm) sowie unterschiedliche Symmetrien (Abb. 37e). Eine nähere Analyse dieser Klassenmittlungen ergab, dass die 7-zähligen Projektionen (ca. 40 % des gesamten Datensatzes) einen Durchmesser von ca. 13 nm, die 8-zähligen (ca. 60 % des gesamten Datensatzes) dagegen einen Durchmesser von ca. 15 nm aufwiesen. Da die beobachteten Klassenmittlungsbilder nicht mit Projektionen eines einzigen 3D-Objektes erklärt werden können, wurde daraus geschlossen, dass Sip-1 unter den Versuchsbedingungen in verschiedenen Oligomerformen (mindestens zwei) existiert.

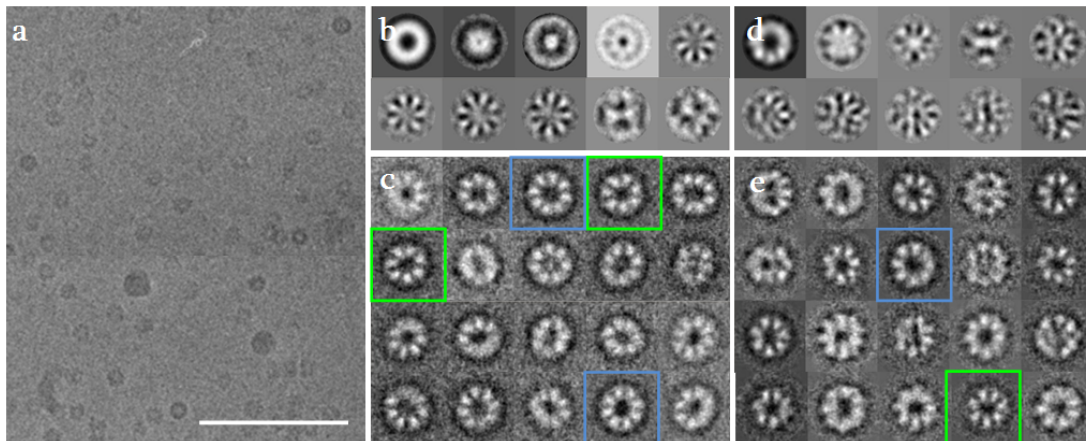


Abb. 37: **a)** Kryo-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Sip-1 (0,1 mg/ml in **20 mM HEPES, pH 8,5**). Beschleunigungsspannung 80 kV. Balken: 100 nm. **b)** 10 Eigenbilder nach der ersten MSA ohne Alignierung der Einzelpartikel. Eigenbilder 1-3 zeigen Größenvanvarianzen. Eigenbilder 5-8 deuten auf 7- und 8-zählige, 9 und 10 auf eine 2-zählige Symmetrie hin. **c)** Charakteristische Klassenmittelungen nach Sortierung des gesamten Datensatzes unter Berücksichtigung von 10 Eigenbildern. Klassenmittelungen mit 7-zähliger Symmetrie sind grün, mit 8-zähliger Symmetrie blau umrandet. **d)** 10 Eigenbilder nach der MSA von translations- und rotationsalignierten Partikeln. **e)** Charakteristische Klassenmittelungen nach Sortierung des alignierten Datensatzes unter Berücksichtigung von 10 Eigenbildern. Boxgröße: 21 nm.

Für weitere Überlegungen zur Oligomerarchitektur von Sip-1 wurde die Struktur des Hsp16.9 aus Weizen zugrunde gelegt (van Montfort *et al.*, 2001). Hsp16.9 besitzt eine Drehachse mit einer Zähligkeit größer als 3 und bildet einen dodekameren Doppelring, der einer Tonne ähnelt. In Analogie könnte Sip-1 aus einem Doppel- bzw. oder Einfachring mit einer 7- oder 8-fachen Drehachse mit einem Dimeren als die kleinste Einheit aufgebaut sein. Damit würden sich folgende Stöchiometrien und (theoretische) Molekulargewichte ergeben:

Symmetrie	Zahl der UE/MW – ein Ring	Zahl der UE/MW– zwei Ringe
8-zählig	16 (285 kDa)	32 (570 kDa)
7-zählig	14 (249 kDa)	28 (498 kDa)
6-zählig	12 (213 kDa)	24 (426 kDa)

Tabelle 3: Mögliche Symmetrien, Untereinheiten-Stöchiometrien und Molekulargewichte von Sip-1 Oligomeren.

Eine Mischsymmetrie, die durch die Zusammenlagerung eines 7- und eines 8-zähligen Ringes entstehen kann, wurde ausgeschlossen, da ein solches Objekt in der Projektion durch Überlagerung von Massen keine symmetrischen Mittelungsbilder erzeugen würde, was durch die Auswertung eines Testobjektes bestätigt wurde. Die

Klassenmittlungen von Sip-1 enthielten keine Hinweise auf Überlagerung von Massen in der Projektion und deuteten auf ein symmetrisches Objekt hin.

Da unter den Klassenmittlungen nicht alle Orientierungen gefunden wurden, was auf eine partielle Vorzugsorientierung der Partikel an der Wasser/Luft-Phasengrenzfläche hindeutete, konnte aus den Daten keine 3D-Rekonstruktion berechnet werden. Auch war es nicht möglich, eindeutig festzustellen, ob die beobachteten Strukturen Doppel- oder Einfachringe darstellen. Zwar würden Doppelringe mit 24 Untereinheiten (theoretisches Molekulargewicht 426 kDa) am besten mit den Daten aus AUZ im Einklang stehen (Tabelle 3), diese müssten aber eine 6-zählige Drehachse besitzen, welche aber weder in den Eigen- noch in den Klassenmittlungsbildern sichtbar war. Würde man allerdings ca. 10 % Messungenuigkeit bei der Molekulargewichtsbestimmung mittels AUZ annehmen, so würde die Masse von Sip-1 bei ca. 470 kDa liegen, was mit einer Doppelring-Struktur mit 28 Untereinheiten zu vereinbaren wäre (Tabelle 3).

In weiteren Experimenten wurde Sip-1 mittels Kryo-EM in den in der Tabelle 4 aufgelisteten Puffersystemen untersucht. In allen Experimenten lag Sip-1 als Oligomere vor, die hauptsächlich ringförmig und –nach visueller Beurteilung– nur geringfügig heterogen erschienen. In keinem der verwendeten Puffersystemen wurden andere markante Strukturen oder wesentlich kleinere Oligomere beobachtet.

Puffer	pH	Proteinkonzentration [mg/ml]
10 mM HEPES	6,2	0,18
10 mM HEPES	6,5	0,25
10 mM HEPES	8,5	0,25
40 mM PBS, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂	6,5	0,2
40 mM PBS, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂	7,5	0,2
10 mM MES, 10 mM MOPS, 20 mM CaCl ₂	6,3	0,15
10 mM MES, 10 mM MOPS, 5 mM CaCl ₂ , 20 mM KCl	6,3	0,15

Tabelle 4: Puffersysteme, die für die Kryo-EM Untersuchungen an Sip-1 verwendet wurden. Ausgewertete Versuche wurden grau unterlegt.

Sip-1 Datensatz aus 10 mM HEPES, pH 8,5:

Die Auswertung der Sip-1 Einzelpartikel, die in 10 mM HEPES-Puffer bei einem pH-Wert von 6,5 mittels Kryo-EM visualisiert wurden, ist in Abbildung 38 zusammengefasst. Für die Bildverarbeitung wurden 12.075 Einzelpartikel ausgewählt. Die Eigenbilder (Abb. 38b) sowie die Klassenmittlungen (Abb. 38c) nach der ersten MSA ohne

Alignierung zeigten neben einer Größenvarianz auch 2-, 7- und 8-zählige Symmetrien. Nach vier Iterationen von Translations- und Rotationsalignierung des Datensatzes erhaltene Eigenbilder (Abb. 38f) verdeutlichten die Symmetrieelemente.

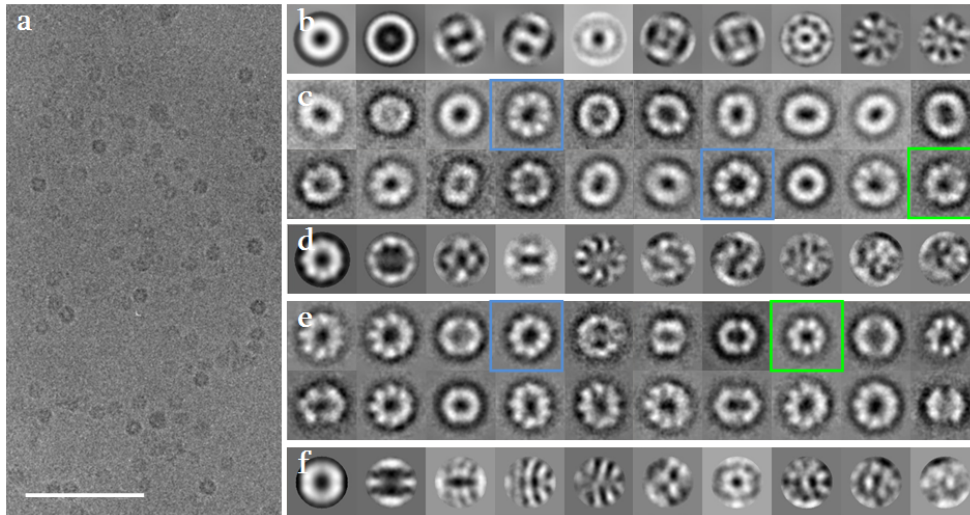


Abb. 38: a) Kryo-Elektronenmikroskopische Aufnahme von Sip-1 (0,25 mg/ml in 10 mM HEPES, pH 8,5). Balken: 100 nm. b) 10 Eigenbilder nach der ersten MSA von 12.075 Partikeln ohne Alignierung. c) Charakteristische Klassenmittelungen des gesamten Datensatzes. d) Eigenbilder nach der Alignierung der Partikel in Bezug auf Klassenmittelungen in (c) mit den entsprechenden Klassenmittelungen (e). f) Eigenbilder nach vier Alignierungszyklen. Boxgröße: 21 nm.

Auf Grund der beobachteten Symmetrien wurden zunächst mit den ersten Klassenmittelungen zwei (vorläufige) 3D-Rekonstruktionen mit C7 bzw. C8 Symmetrien berechnet, die anschliessend mit D7 bzw. D8 Symmetrien verfeinert wurden. In einem nächsten Schritt wurde der gesamte Datensatz durch Korrelation der Klassenmittelungen mit den Rückprojektionen beider Modelle in zwei Subpopulationen getrennt, die sich in ihren Symmetrien und Größen unterschieden. Beide Subpopulationen wurden unabhängig voneinander zur Berechnung von 3D-Rekonstruktionen herangezogen, die in mehreren MRA/MSA Schritten verfeinert wurden. Danach wurden die Teildatensätze wieder vereint und die beiden finalen 3D-Modelle aus den Teilpopulationen als Referenzen zur Alignierung des kompletten Datensatzes herangezogen. Aus dem alignierten Datensatz wurden wiederum zwei 3D-Rekonstruktionen berechnet, die in weiteren MRA/MSA Iterationen innerhalb des gesamten Datensatzes verfeinert wurden (Abb. 39). Für die Rekonstruktion der Modelle mit der D7 bzw. D8 Symmetrie wurden 4.857 bzw. 5.650 Einzelpartikelprojektionen verwendet. Die Auflösung beider Modelle liegt bei ca. 16 Å. In beiden Fällen stimmen die Modell-Rückprojektionen mit den Klassenmittelungen sehr gut überein.

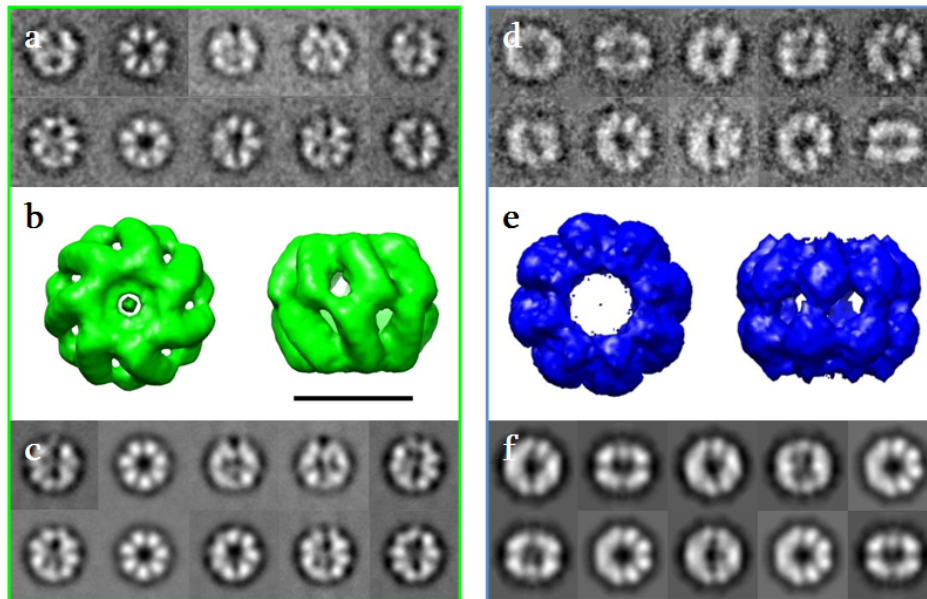


Abb. 39: Klassenmittelungen, die zur 3D-Rekonstruktion des Modells mit der D7- (a) bzw. D8 Symmetrie (d) herangezogen wurden. Finale 3D-Rekonstruktionen der Subpopulationen von Sip-1 mit D7 (b) bzw. D8 Symmetrie (e) (Balken: 10 nm) mit den entsprechenden Rückprojektionen (c, f). Boxgröße: 21 nm.

Beide Modelle zeigen eine fassähnliche Struktur aus zwei Ringen mit einem hohlen Innenraum, wobei diese Kavität im D8 Modell ausgeprägter ist. Während das D7 Modell einen Durchmesser von ca. 13 nm und eine Höhe von 12 nm besitzt, ist das D8 Modell größer (Durchmesser ca. 14,5 nm, Höhe ca. 12,5 nm). Beide Modelle sind aus kleinen „Stäben“ aufgebaut, die Dimeren entsprechen könnten. Die „Stäbe“ sind in beiden Modellen etwas unterschiedlich angeordnet. Im D7 Modell kontaktieren sich die Stäbe innerhalb eines Ringes nicht, was zur Bildung von seitlich gelegenen, kleinen Öffnungen innerhalb eines Ringes führt. Die Stäbe von den unterschiedlichen Ringen sind gegeneinander versetzt. Im D8 Modell dagegen sind die Stäbe innerhalb eines Ringes in Kontakt, während die Stäbe beider Ringe sich äquatorial in einem engen „Steg“ treffen, was zur Bildung von äquatorialen, kleinen „Fenstern“ führt. Die Stäbe sind in beiden Modellen gegenüber der Hauptdrehachse ca. um 15° gekippt, allerdings in entgegengesetzten Richtungen, was bei beiden Modellen in gegenläufigen Händigkeiten resultiert.

Sip-1 Datensatz aus 10 mM HEPES, pH 6,5:

Da der pH-Wert von 8,5 weder dem physiologischen pH von *C. elegans*, noch dem pH-Wert, bei dem die Chaperonaktivität von Sip-1 maximal ist, entspricht, wurden weitere Kryo-Experimente bei einem pH-Wert von 6,5 durchgeführt (Abb. 40). Hier-

bei war die Symmetrie des Moleküls in einigen Fällen bereits direkt auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen. Zudem waren auch viele Seitenansichten auszumachen, was auf eine zufällige Orientierung der Proteine im Eis schließen liess (Abb. 40).

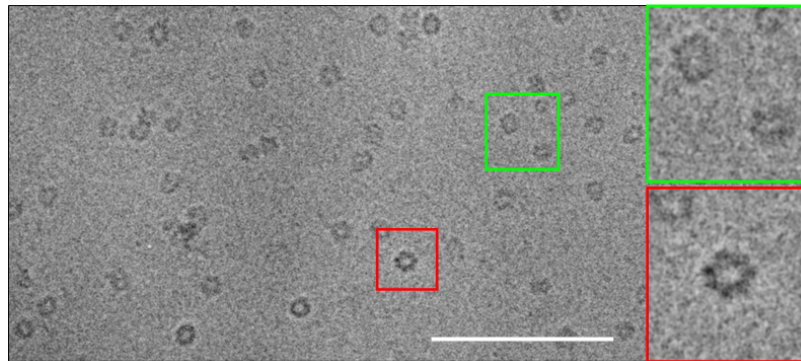


Abb. 40: Kryo-Elektronenmikroskopische Aufnahme von Sip-1 in **10 mM HEPES (pH 6,5)** mit vergrößerten Top- (rot umrandet) und Seitenansichten (grün umrandet). Balken: 100 nm.

Für die 3D-Rekonstruktion wurden 12.075 Partikel semi-automatisch ausgewählt und einer Bildverarbeitung unterzogen (Abb. 41).

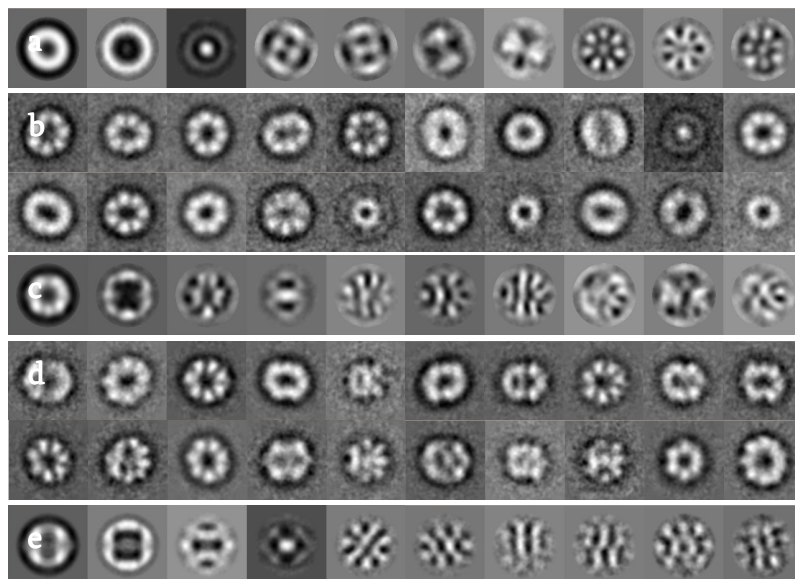


Abb. 41: Einzelpartikelanalyse von Sip-1 in **10 mM HEPES, pH 6,5**. **a)** 10 Eigenbilder nach der ersten MSA von 12.075 Partikeln ohne Alignierung. **b)** Klassenmittlungen des gesamten Datensatzes. Eigenbilder **(c)** bzw. Klassenmittlungen **(d)** nach einer ersten Alignierung der Einzelpartikel. **e)** Finale Eigenbilder nach drei Alignierungszyklen. Das Eigenbild 2 deutet auf Größenvarianzen, die Eigenbilder 5 und 6 auf 7-Zähligkeit, während das Eigenbild 3 eine 2- und 9 eine 8-Zähligkeit zeigen. Boxgröße: 21 nm.

Die nach drei MRA/MSA Zyklen erhaltenen Eigenbilder (Abb. 41e) zeigten alle Charakteristika, die bei dem Experiment bei pH 8,5 beobachtet wurden, nämlich 2-, 7- und 8-zählige Symmetrien sowie Größenvarianzen, wobei die 7-Zähligkeit sich bereits in den Klassenmittlungen ohne eine Alignierung der Einzelpartikel sehr deutlich zeigte. Mit den Klassenmittlungen nach drei MRA/MSA Zyklen, die denen nach einer ersten Alignierung (Abb. 41d) ähnlich waren, wurden zunächst zwei (vorläufige) 3D-Rekonstruktionen mit D7 bzw. D8 Symmetrien erstellt. Parallel dazu wurde der Datensatz mit den Projektionen der Modelle aus dem Experiment bei 8,5 aligniert (Referenzen) und daraus zwei weitere 3D-Rekonstruktionen berechnet. Im Verlauf der Rekonstruktionen stellte es sich heraus, dass die unabhängig berechneten Modelle so gut wie identisch zu denen waren, die mit den schon vorhandenen Modellen als Referenzen berechnet wurden. Daher wurden in weiteren Schritten die zwei Modelle aus dem Experiment bei 8,5 als Referenzen eingesetzt. Hierbei wurde der Datensatz in einem ersten Schritt nach den beiden Referenzmodellen getrennt und unabhängig voneinander in mehreren MRA/MSA Zyklen verfeinert. Anschließend wurden Projektionen der daraus resultierenden Modelle eingesetzt, um den gesamten Datensatz zu alignieren. Nach 7 MRA/MSA Iterationen des gesamten Datensatzes wurden die finalen 3D-Modelle mit D7 und D8 Symmetrien erhalten (Abb. 42). Während den Iterationen fielen Mittelungsbilder mit einem Durchmesser von ca. 12 nm auf, die kleiner als die Projektionen des Modells mit der D7 Symmetrie waren. Zudem deutete sich in diesen Mittelungsbildern eine 6-zählige Symmetrie an. Beide Fakten, die auf das Vorhandensein von einer Subpopulation mit 24 Untereinheiten hinwiesen, wurden bei der weiteren Bildverarbeitung berücksichtigt, so dass nach mehreren Iterationsschritten auch ein 3D-Modell mit D6 Symmetrie berechnet werden konnte (Abb. 42). Nach 0,5-FSC-Kriterium beträgt die Auflösung des D6 Modells 13 Å, des **D7 Modells 9 Å** und des D8 Modells 15 Å (Abb. 43). Die Verteilung der Eulerwinkel im asymmetrischen Dreieck ist für alle drei Rekonstruktionen ähnlich gut. Somit gibt es bei allen drei Modellen keine größere Informationslücke.

Nach den 3D-Rekonstruktionen besitzen alle drei Oligomere eine fassähnliche Struktur mit einem hohlen Innenraum, wobei dieser bei dem 24meren (D6) am kleinsten ist (Abb. 42). Das 24mere (D6) besitzt einen Durchmesser von ca. 12 nm und eine Höhe von 12 nm, das 28mere (D7) einen Durchmesser von ca. 13 nm und eine Höhe von 12 nm, während das 32mere (D8) einen Durchmesser von ca. 14 nm und eine Höhe von 12,5 nm besitzt.

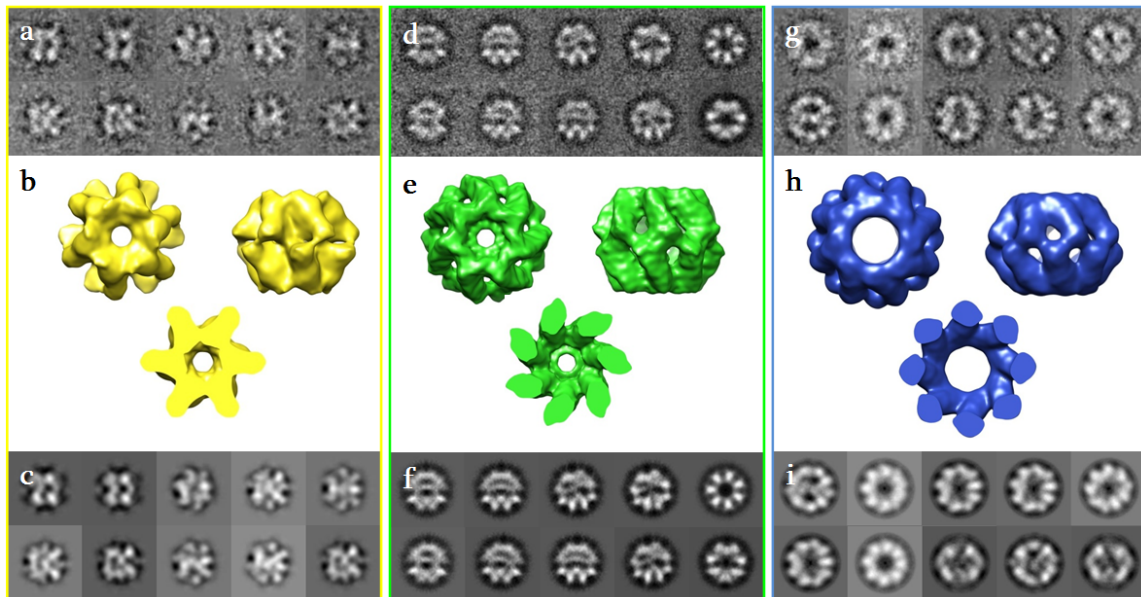


Abb. 42: Finale 3D-Rekonstruktionen der Subpopulationen von Sip-1 mit D6 (**b**), D7 (**e**) bzw. D8 Symmetrie (**h**) mit den jeweiligen, für die 3D-Rekonstruktion verwendeten Klassenmittlungen (**a**, **d**, **g**) sowie Rückprojektionen (**c**, **f**, **i**). Anzahl der Partikel, die für die 3D-Rekonstruktion verwendet wurden: 1.760 (D6), 4.080 (D7), 1.870 (D8). Boxgröße: 21 nm.

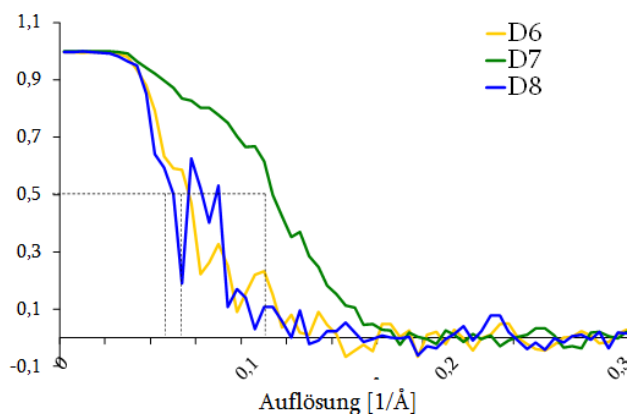


Abb. 43: FSC-Plots der 3D-Rekonstruktionen von Sip-1 Subpopulationen.

Alle drei Oligomere sind, wie bei den vorherigen Rekonstruktionen auch beobachtet, aus kleinen „Stäben“ aufgebaut, die vermutlich Dimeren entsprechen (Abb. 42). Die Anordnung der Stäbe ist in allen drei Oligomeren nahezu identisch. Sie sind innerhalb eines Ringes gegenüber der Hauptdrehachse ca. um 15° gekippt und so angeordnet, dass sich innerhalb eines Ringes seitlich gelegene, kleine Öffnungen bilden. Die Stäbe von den unterschiedlichen Ringen sind gegeneinander versetzt.

Sip-1 Datensätze aus 40 mM PBS, pH 7,5 bzw. 6,5:

Um festzustellen, ob es sich bei der beobachteten Heterogenität von Sip-1 um eine allgemeine Eigenschaft des Proteins unabhängig vom verwendeten Puffersystem und Ionenstärke handelt, wurden zusätzliche Kryo-Experimente in **40 mM PBS, 50 mM**

NaCl, 10 mM MgCl₂ bei **pH 7,5** und bei **pH 6,5** durchgeführt. In beiden Experimenten erschien Sip-1 mit ähnlicher Heterogenität. Nach der ersten MSA/Klassifizierung ohne Alignierung der Einzelpartikel erhaltene Eigenbilder bzw. Klassenmittlungen enthielten wenig Strukturdetails und waren nicht aussagekräftig (Abb. 44, 45). Zwar zeigten die nach einer ersten Alignierung der Datensätze erhaltenen Klassenmittlungen die charakteristischen Symmetrien, allerdings enthielten beide Datensätze nicht genug Partikel, so dass auf eine weitere Bildauswertung verzichtet wurde.

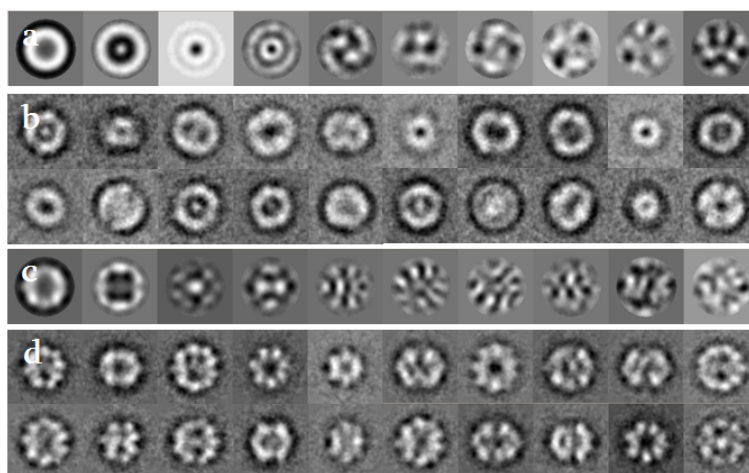


Abb. 44: Einzelpartikelanalyse von Sip-1 in **40 mM PBS, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂** bei **pH 7,5**. **a)** 10 Eigenbilder nach der ersten MSA von 14.267 Partikeln ohne Alignierung. **b)** Klassenmittlungen des gesamten Datensatzes ohne Alignierung. **c)** Eigenbilder bzw. **d)** Klassenmittlungen nach einer ersten Alignierung der Einzelpartikel. Boxgröße: 21 nm.

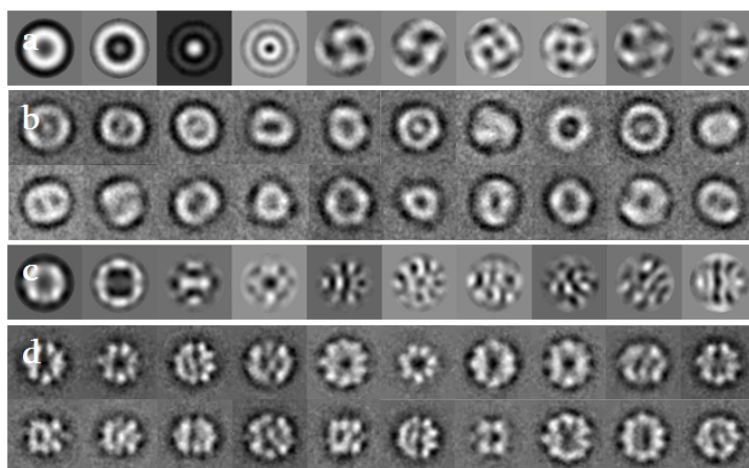


Abb. 45: Einzelpartikelanalyse von Sip-1 in **40 mM PBS, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂** bei **pH 6,5**. **a)** 10 Eigenbilder nach der ersten MSA von 24.475 Partikeln ohne Alignierung. **b)** Klassenmittlungen des gesamten Datensatzes (ohne Alignierung). **c)** Eigenbilder bzw. **d)** charakteristische Klassenmittlungen nach einer ersten Alignierung der Einzelpartikel. Boxgröße: 21 nm.

Sip-1 Datensatz aus MES/MOPS, pH 6,3:

In 10 mM MES, 10 mM MOPS, 5 mM CaCl₂, 20 mM KCl bei pH 6,3 zeigte Sip-1 die gleichen Merkmale wie in anderen Puffersystemen (Abb. 46). Da jedoch das SNR des Datensatzes nicht gut war, wurde auf eine weitere Auswertung verzichtet.

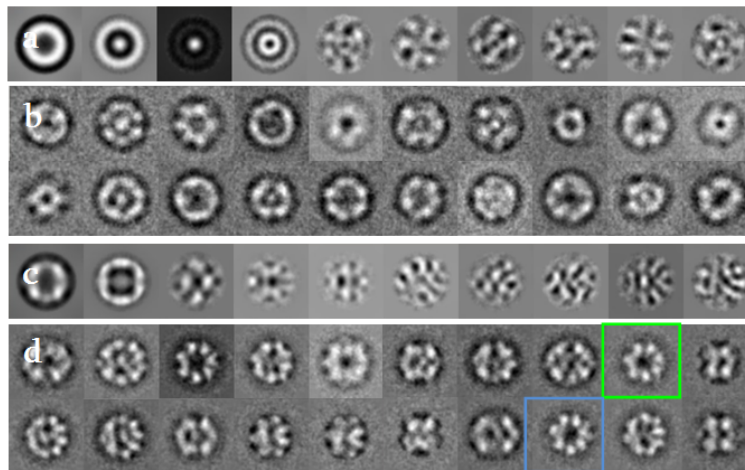


Abb. 46: Einzelpartikelanalyse von Sip-1 in 10 mM MES, 10 mM MOPS, 5 mM CaCl₂, 20 mM KCl bei pH 6,3. **a)** 10 Eigenbilder nach der MSA von 12.075 Partikeln ohne Alignierung. **b)** Klassenmittlungen des gesamten Datensatzes (ohne Alignierung). **c)** Eigenbilder bzw. **d)** Klassenmittlungen nach der ersten Alignierung der Einzelpartikel. Boxgröße: 21 nm.

4.4.5. Verteilung der Sip-1 Oligomere

Kryo-EM Experimente belegten deutlich, dass die Koexistenz von unterschiedlichen Sip-1 Oligomeren nicht auf ein bestimmtes Puffer-System zurückzuführen ist. In allen Experimenten waren 28- und 36mere beachtlich, 24mere dagegen nur geringfügig populiert. Um der Frage nachzugehen, ob die Verteilung der Oligomere sich in verschiedenen Puffern bzw. pH-Werten ändert, wurden alle Datensätze einer simultanen Analyse unterzogen. Dabei wurden 24mere wegen ihres geringen Anteils nicht berücksichtigt. Für die Analyse wurden die Klassenmittlungen bzw. Einzelpartikel aller Datensätze mit den Reprojektionen der D7 und D8 Modelle aus dem Experiment in 10 mM HEPES, pH 6,5 (Abb. 42) simultan verglichen, um die Einzelpartikel zu einer der beiden Oligomerformen zuordnen zu können. Interessanterweise zeigte die Analyse (Abb. 47), dass die Verteilung der beiden berücksichtigten Oligomere unabhängig vom Puffersystem, aber abhängig vom pH-Wert war. So dominierten bei pH-Werten unterhalb von 6 28mere, bei pH 8,5 dagegen 36mere, während bei einem pH-Wert von 7,5 beide Oligomerformen nahezu gleich populiert waren.

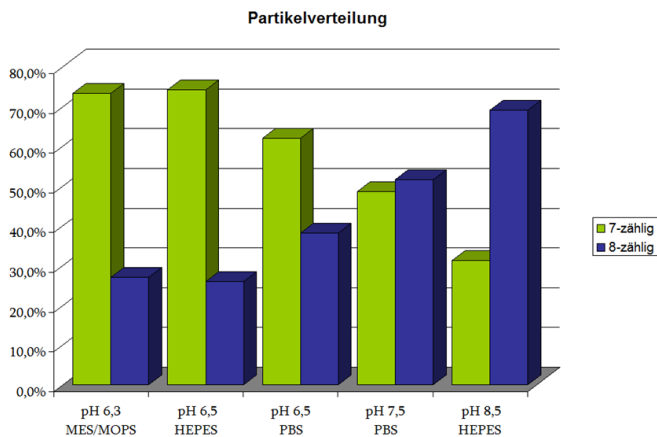


Abb. 47: Verteilung der Sip-1 Partikel zwischen den beiden Oligomerformen. Anzahl der berücksichtigten Partikel: MES/MOPS, pH 6,3: 29.351; HEPES, pH 6,5: 12.075; PBS, pH 6,5: 24.475; PBS, pH 7,5: 14.267; HEPES, pH 8,5: 15.613.

Um zu testen, ob unabhängige Methoden zu ähnlichen Ergebnissen wie die Kryo-EM führen, wurden Sip-1 Lösungen mittels DLS untersucht (Abb. 48). Die DLS zeigte zum einen eine lineare Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Proteinkonzentration und zum anderen, dass bei pH 8,0 der hydrodynamische Radius mit 8,8 nm ca. 1 nm größer ist als bei pH 6,5. Dies reflektiert möglicherweise die im EM beobachtete Änderung der Oligomerverteilung.

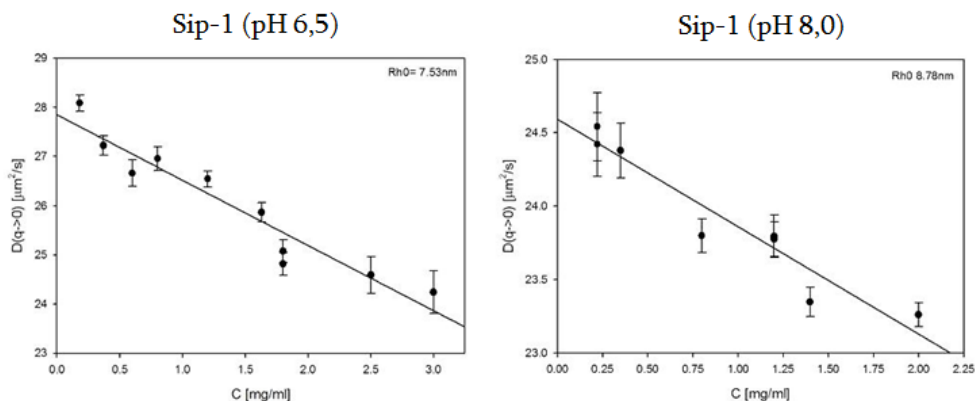


Abb. 48: Konzentrationsabhängigkeit des hydrodynamischen Radius von Sip-1 (in 10 mM HEPES) bei pH-Werten 6,5 und 8,0.

4.4.6. Modellierung der Struktur des Sip-1 Oligomers

Die hohe Auflösung der Kryo-EM Rekonstruktion des Sip-1 Oligomers mit 28 Untereinheiten erlaubte den Versuch, in einer Hybrid-Vorgehensweise seine pseudoatomare Struktur zu modellieren und in die EM-Dichte anzudocken.

Zunächst wurde die Struktur der α -Kristallin Domäne von Sip-1 (AS 45-114) mit Hilfe von Webservern PHYRE (Kelley and Sternberg, 2009), SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009) und I-TASSER (Roy *et al.*, 2010) modelliert. Die C- und N-terminalen Domänen wurden ausgeschlossen, da diese keine Sequenzhomo-

logien zu strukturell bekannten sHsps aufweisen. Für die Homologie-Modellierung der α -Kristallin Domäne von Sip-1 verwendeten die Webserver MjHsp16.5 und humanes α B-Kristallin als Templatstrukturen. Zwischen den α -Kristallin Domänen von Sip-1 und MjHsp16.5 beträgt die Sequenzidentität 40 %, von Sip-1 und humanem α B-Kristallin 41 % (Abb. 49).

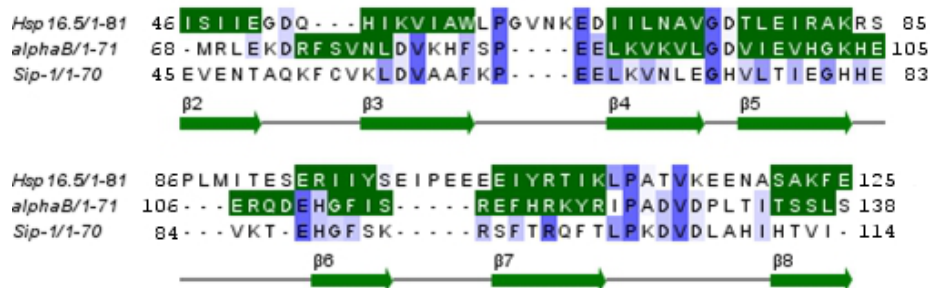


Abb. 49: Sequenzalignierung der α -Kristallin Domänen (β 2- β 8) von MjHsp16.5 (pdb id: 1SHS), humanem α B-Kristallin (pdb id: 2KLR) und CeSip-1. Dunkelgrün: Aminosäuren der β -Faltblätter. Dunkelblau: Sequenzidentität aller drei sHsps. Hellblau: Sequenzidentität zweier sHsps. Cartoon der Sekundärstrukturelemente wurde anhand von MjHsp16.5 mit Jalview erstellt.

In beiden Strukturvorhersagen wurde die α -Kristallin Domäne bis auf Unterschiede in der Länge der β 5-, β 6- und β 7-Faltblattstränge ähnlich modelliert (Abb. 50). Während in Phyre ein großer Teil der AS im Bereich des β 6-Strangs (81-94) unstrukturiert dargestellt wurde (Abb. 50b), zeigte die Vorhersage aus I-Tasser eine ausgedehnte β -Faltblatt-Struktur mit einem kombinierten β 6+7-Strang (Abb. 50a). Die Faltblatt-Stränge β 2, β 3 und β 8 wurden in keiner der beiden Modelle vorhergesagt. Das Phyre-Modell zeigte die bessere Übereinstimmung mit dem Templat.

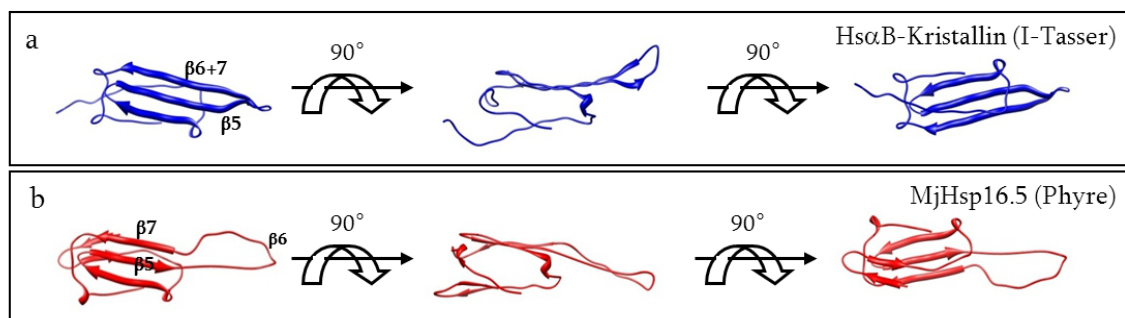


Abb. 50: Homologie-Modellierung der α -Kristallin-Domäne von Sip-1 (Monomer) basierend auf der Struktur von (a) der α -Kristallin Domäne von humanem α B-Kristallin (I-Tasser) und (b) MjHsp16.5 (Phyre).

Da bei sHsps Dimere vermutlich die kleinsten Bausteine der Oligomere darstellen, wurden im nächsten Schritt Modelle für die Sip-1 α -Kristallin Domäne in dimerer Form berechnet. Den Berechnungen wurden als Templatstrukturen die dimere Form der α -Kristallin Domäne von humanem α B-Kristallin (Abb. 51a, obere Reihe) bzw. von MjHsp16.5 (Abb. 51b, obere Reihe) zugrunde gelegt.

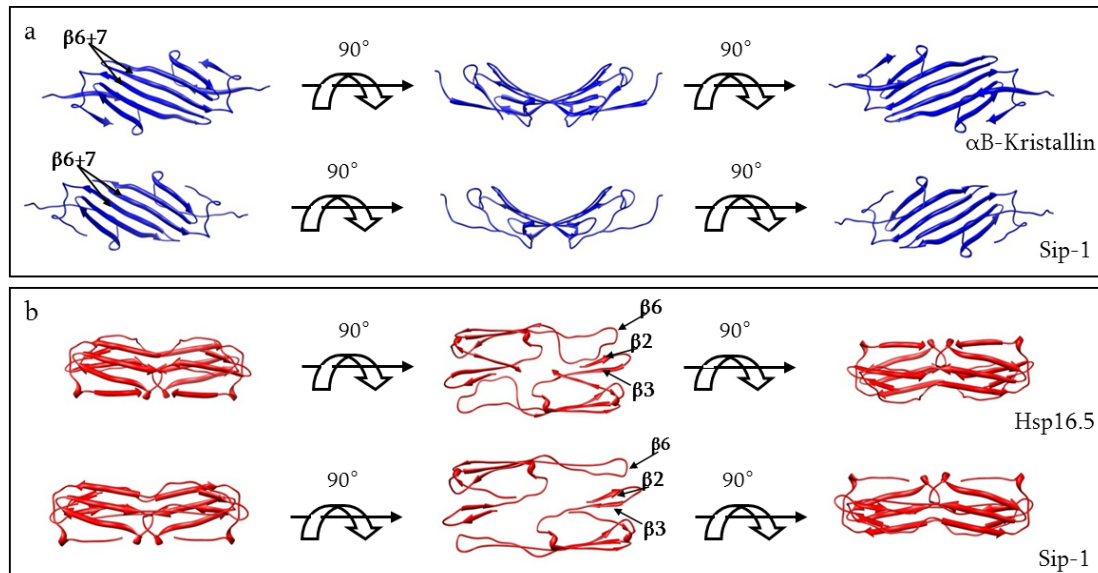


Abb. 51: a) Struktur der dimeren α -Kristallin Domäne von humanem α B-Kristallin (NMR) (obere Reihe) (Templat) im Vergleich zu der Homologie-modellierten Struktur der dimeren α -Kristallin Domäne von Sip-1 (untere Reihe). **b)** Struktur der dimeren α -Kristallin Domäne von MjHsp16.5 (obere Reihe) (Templat) im Vergleich zu der Homologie-modellierten Struktur der dimeren α -Kristallin Domäne von Sip-1 (untere Reihe).

Die beiden Templatstrukturen unterscheiden sich in der Organisation der Monomere zu einem Dimer erheblich: während im α -Kristallin-Domänen-Dimer von humanem α B-Kristallin die beiden Monomere über die $\beta 6+7$ Faltblatt-Stränge assoziieren, finden die Wechselwirkungen im α -Kristallin-Domänen-Dimer von MjHsp16.5 zwischen dem $\beta 6$ - (AS 82-93) und den $\beta 2+3$ -Strängen benachbarter Monomere statt. Beide modellierten Dimerstrukturen zeigten, bis auf die fehlenden β -Faltblatt-Stränge, große Übereinstimmung mit den jeweiligen Templatstrukturen (Abb. 51a und b, jeweils untere Reihe).

Im Folgenden wurden beide Dimermodelle in die Kryo-EM Dichtekarte des Sip-1 28mers andockt. Dazu wurde zunächst ein Dimer interaktiv mittels „Fit in Map“-Option von Chimera in das Volumen eines der „Stäbe“ eingepasst. Anschließend wurde von dem eingepassten Dimer eine identische Kopie erstellt und diese durch eine Drehung um $51,429^\circ$ entlang der Hauptdrehachse in den benachbarten „Stab“

platziert. Diese Prozedur wurde für jeden der beiden Ringe des Sip-1 7x wiederholt, bis das 28mer Modell alle 14 Dimere enthielt. Die Übereinstimmung des eingepassten (pseudoatomaren) Modells mit dem Kryo-EM Volumen wurde nach Filterung des (pseudoatomaren) Modells auf 10 Å durch Kreuzkorrelation berechnet.

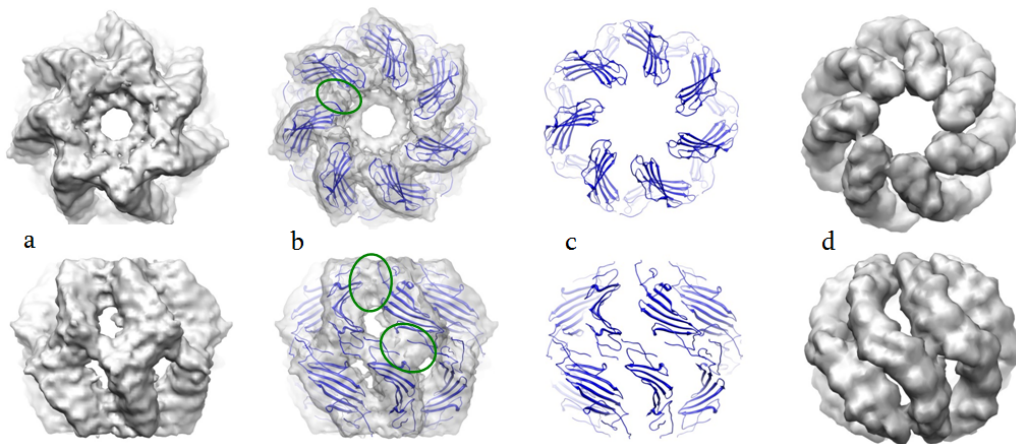


Abb. 52: **a)** Oberflächendarstellung der Kryo-EM 3D-Rekonstruktion des Sip-1. Top- (oben) und Seitenansichten (unten). **b)** Kryo-EM Volumen mit den andockten (Homologie-modellierten) α -Kristallin-Domänen-Dimeren von Sip-1 (**Templat: humanes α B-Kristallin**) (Ribbon Diagramm). Freie Volumina sind grün umrandet. **c)** Anordnung der α -Kristallin-Domänen-Dimere im Sip-1 Oligomer. **d)** Auf 10 Å gefiltertes Modell von (c).

Das auf 10 Å gefilterte pseudoatomare Modell, das auf der Basis der α -Kristallin-Domäne von humanem α B-Kristallin berechnet wurde (Abb. 52d), zeigt mit der Kryo-EM Dichtekarte eine recht gute Übereinstimmung (CCC = 0,884). Die einzelnen Dimere passen jeweils gut in die „Stäbe“ der 3D-Rekonstruktion. Zwischen den Dimeren befinden sich freie Volumina (Abb. 52b), die ca. 40 % des gesamten Kryo-EM Volumens ausmachen und damit freien Raum für die fehlenden N- und C-terminalen AS bieten (ca. 40 % der Gesamtsequenz). Vermutlich sind beide Termini an der Assemblierung der Monomere zum 28mer beteiligt.

Bei dem auf der Basis der Struktur von MjHsp16.5 berechneten Hybridmodell ergibt sich ein vergleichbares Bild (Abb. 53). Der Kreuzkorrelationskoeffizient zwischen dem auf 10 Å gefilterten (pseudoatomaren) Modell und dem Kryo-EM Volumen beträgt 0,761. Auch hier passen die Dimere gut in die „Stäbe“ der 3D-Rekonstruktion. Ca. 33 % des Kryo-EM Volumens ist nicht gefüllt und bietet ebenfalls freien Raum für die fehlenden N- und C-terminalen AS.

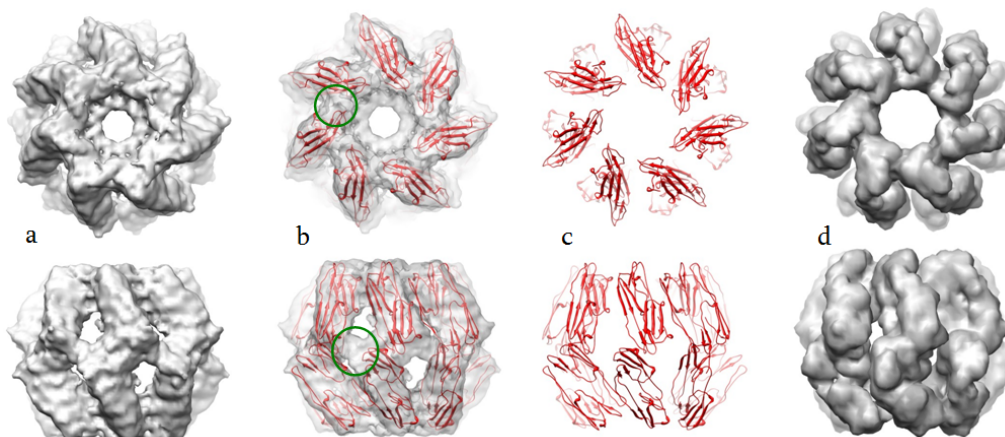


Abb. 53: Oberflächendarstellung der Kryo-EM 3D-Rekonstruktion des Sip-1. Top- (oben) und Seitenansichten (unten). **b)** Kryo-EM Volumen mit den angedockten (Homologie-modellierten) α -Kristallin-Domänen-Dimeren von Sip-1 (**Templat: MjHsp16.5**) (Ribbon Diagramm). Freie Volumina sind grün umrandet. **c)** Anordnung der α -Kristallin-Domänen-Dimere im Sip-1 Oligomer. **d)** Auf 10 Å gefiltertes Modell von (c).

Obwohl beide Hybridmodelle in ihrer Güte vergleichbar sind, fällt bei einer näheren Betrachtung Folgendes auf: bei dem auf der Struktur der α -Kristallin Domäne des humanen α B-Kristallins basierenden Modell, das eine höhere Übereinstimmung mit dem Kryo-EM Volumen zeigt (CCC=0,884), steht vor allem für die fehlenden N-terminalen AS weniger Raum zur Verfügung als bei dem auf der Struktur des Hsp16.5 basierenden Modell. Betrachtet man nur dieses Kriterium, scheint eine der 3D-Struktur des MjHsp16.5 ähnliche Assemblierung des Sip-1 28mers wahrscheinlicher.

4.5. Zusammenfassung und Diskussion

Wie bereits erwähnt, clustern 11 der 16 sHsps von *C. elegans* in zwei Proteinfamilien, Hsp16 und Hsp12. Die Vertreter der Hsp12 Subfamilie, Hsp12.1, Hsp12.2, Hsp12.3 und Hsp12.6, alle ohne die klassische Chaperonaktivität, liegen als Monomere oder kleinere Oligomere vor und sind daher für elektronenmikroskopische Untersuchungen mittels Einzelpartikelanalyse nicht zugänglich. Hsp16.11/Hsp16.2 und Hsp16.41/Hsp16.48 bilden die Kernkomponenten der Hsp16 Subfamilie, welche in ihrer erweiterten Form auch die Proteine F08H9.3, F08H9.4 und Sip-1 enthält. Während Hsp16.11/Hsp16.2 und Hsp16.41/Hsp16.48 sich in vielen Hinsichten ähnlich verhalten, zeigt Sip-1 sowohl strukturell als auch funktionell einige Besonderheiten.

Strukturelle Ähnlichkeiten von Hsp16.11 und Hsp16.2:

Laut Literatur bilden alle Hsp16 Proteine, darunter auch Hsp16.11 und Hsp16.2 sowohl *in vitro* (Leroux *et al.*, 1997) als auch *in vivo* (Hockertz *et al.*, 1991) höhere Oligomere mit Molekulargewichten zwischen 400 und 500 kDa. Arbeiten mittels analytischer HPLC-Gelfiltration implizierten homogene Oligomerpopsulationen (Weinfurtner, 2008): so eluierten sowohl Hsp16.11 als auch Hsp16.2 in HPLC-SEC-Experimenten als einzelne Peaks mit einer errechneten Masse von etwa 500 kDa (30 Untereinheiten). Experimente mittels AUZ ergaben dagegen für Hsp16.2 eine Masse von 361 kDa (22 Untereinheiten). Die hier durchgeführten elektronenmikroskopischen Analysen belegten dagegen deutlich, dass sowohl Hsp16.11 und Hsp16.2 in nahezu sphärischen, aber sehr heterogenen oligomeren Strukturen mit Durchmessern zwischen 8 und 20 nm assemblieren. Die Ergebnisse sind damit besser im Einklang mit einer früheren Studie (Leroux *et al.*, 1997), in der auf eine polydisperse Assoziation von Hsp16.2 zu Oligomeren mit Molekulargewichten von 239 kDa (14-15mer) und 394 kDa (24-25mer) hingewiesen wurde.

Für beide Proteine zeigte die elektronenmikroskopische Analyse an negativ kontrastierten Einzelpartikeln nach der Trennung der jeweiligen Datensätze anhand der Partikelgrößen eine nahezu Gleichverteilung der Oligomere. Die entsprechenden Klassenmittelungen enthielten keinerlei markante Strukturelemente, so dass ihre Orientierung nicht bestimmt werden konnte. Der Ansatz, bei der Bildverarbeitung nur Projektionen im Größenbereich 13-15 nm zu berücksichtigen, war genauso wenig erfolgreich und führte auch zu keiner 3D-Rekonstruktion.

Die sehr stark ausgeprägte Heterogenität der Projektionsbilder von Hsp16.11 und Hsp16.2 legt die Vermutung nahe, dass beide Proteine in einem Gleichgewicht von verschiedenen Oligomerformen mit unterschiedlichen Stöchiometrien existieren, was wiederum einen Austausch von Untereinheiten impliziert. In der Tat tauschen laut FRET (Weinfurtner, 2008) sowohl Hsp16.11 als auch Hsp16.2 in Lösung ihre Untereinheiten kontinuierlich und mit ähnlichen Kinetiken aus. Beide Proteine besitzen bei 25°C und unter reduzierenden Bedingungen (in Ggw. von DTT) $t_{1/2}$ -Werte unterhalb von 100 s und gehören damit zu sHsps mit hohen Austauschraten und hohen Polydispersitäten wie z.B. Hsp30 aus *T. gondii* ($t_{1/2}$ ca. 60 s) (de Miguel *et al.*, 2009). Bei Hsp16.2 wird die Austauschkinetik unter oxidierenden Bedingungen durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den N-terminalen Cysteinen auf etwa die Hälfte bzw. ein Drittel verlangsamt (Weinfurtner, 2008).

Der Untereinheiten-Austausch von Hsp16.11 und Hsp16.2 wird in Gegenwart von sogenannten „Molecular crowding“ Agentien wie Sucrose, PEG oder Vicol, die dem System Wasser entziehen und dadurch cytosolische Bedingungen simulieren, verlangsamt bzw. vollständig unterdrückt (Weinfurtner, 2008). Um zu testen, ob dies die Heterogenität von Hsp16.11 und Hsp16.2 beeinflusst, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Experimente in Gegenwart von den genannten Substanzen als Additive durchgeführt. Auch hier zeigten die Projektionsbilder enorme Größen- bzw. Strukturvarianzen.

Angesichts der oben genannten Tatsachen bleibt die „*in silico*“ Reinigung/Trennung der heterogenen Hsp16.11 und Hsp16.2 Datensätze mittels Bildverarbeitung die einzige Möglichkeit für eine Strukturanalyse. Durch die hier verwendete Vorgehensweise konnten Oligomere mit ähnlichen Stöchiometrien und folglich ähnlichen Größen, allerdings mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften nicht getrennt werden, was zu „unstrukturierten“ Mittelungsbildern führte. In zukünftigen Arbeiten soll die strukturelle Heterogenität von den nach der Größe sortierten Subpopulationen detaillierter analysiert werden.

Die in elektronenmikroskopischen Untersuchungen festgestellte Ähnlichkeit von Hsp16.11 und Hsp16.2 hinsichtlich der Oligomer-Heterogenität sowie deren hohe Sequenzidentität (93 %) lassen vermuten, dass beide Proteine auch strukturell ähnlich sein könnten. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass beide Proteine auch untereinander Untereinheiten austauschen ($t_{1/2}$ -Werte unterhalb von 100 s) und Mischoligomere bilden (Weinfurtner, 2008). Da laut FRET-Mesungen die energetischen Barrieren für die Bildung von Homo- und Misch-Oligomeren sehr ähnlich sind (Weinfurtner, 2008), ist es wahrscheinlich, dass in beiden Proteinen ähnliche strukturelle Determinanten eine Assoziation zu höheren Oligomeren vermitteln.

Oligomerstrukturen von Hsp16.41 und Hsp16.48:

Hsp16.41 und Hsp16.48 assoziieren, wie die meisten sHsps, zu großen Oligomeren. In früheren Arbeiten mittels AUZ wurden für Hsp16.41 homogene Oligomerpopulationen mit einem Molekulargewicht von ca. 360 kDa (22 Untereinheiten), für Hsp16.48 von ca. 325 kDa (20 kDa) vorausgesagt (Weinfurtner, 2008). Aus der SEC-Analyse berechnete apparente Oligomer-Molekulargewichte betragen für Hsp16.41 400 ± 50 kDa (22-27 Untereinheiten), für Hsp16.48 415 ± 50 kDa (23-29 Untereinheiten) (Weinfurtner, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Proteine zum ersten Mal einer elektronenmikroskopischen Strukturanalyse mittels Negativ Kontrastierung bzw. Kryo-EM unterzogen. In bei RT negativ kontrastierten Präparaten zeigten sich sowohl Hsp16.41 als auch Hsp16.48 als nahezu sphärische, allerdings recht heterogene Oligomere, wobei die Durchmesser der Projektionsbilder bei beiden Proteinen zwischen 10 nm und 16 nm variierten. Im Gegensatz zum Hsp16.11/Hsp16.2-Paar wiesen sie allerdings deutliche und in sich strukturell weitgehend homogene Hauptpopulationen aus 24meren auf, so dass aus diesen Populationen 3D-Rekonstruktionen bei ca. 23 Å Auflösung berechnet werden konnten (Abb. 54). Danach bilden beide 24mere nahezu sphärische Proteinhüllen ähnlicher Größe (Hsp16.41 ca. 13 nm, Hsp16.48 ca. 13,5 nm), in denen die Untereinheiten entsprechend einer Tetraedersymmetrie angeordnet sind. Beide Proteinhüllen enthalten breite Öffnungen und zusätzliche Masse im Inneren des Oligomers und sind bis auf einige geringfügige Unterschiede in der Verteilung der Massen an Positionen der Symmetrieachsen (vgl. Abb. 54) nahezu identisch. Damit zeigen beide Proteine eine Oligomerarchitektur, die vielen anderen sHsps gemeinsam ist. Auffallend ist die große strukturelle Ähnlichkeit zu AfHsp20.2 bzw. zu MjHsp16.5 (Haslbeck *et al.*, 2008), die ebenfalls 24mere bilden.

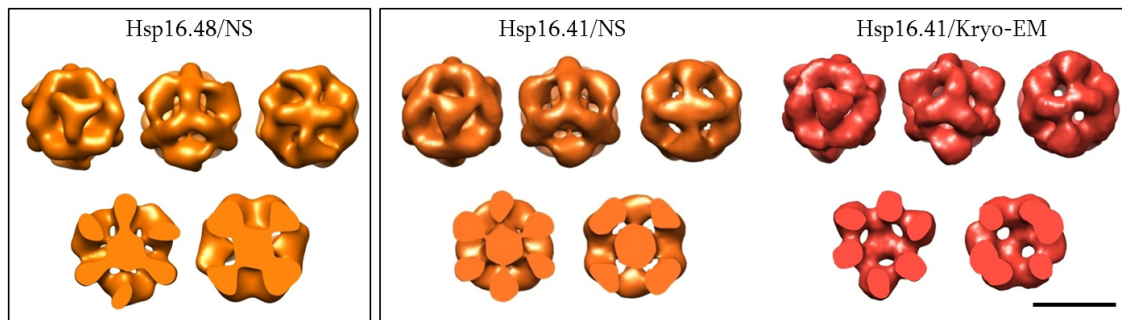


Abb. 54: Oligomerstrukturen von Hsp16.48 (links) und Hsp16.41 (rechts).

Die 3D-Rekonstruktion von Hsp16.41 aus in Eis-eingebetteten Einzelpartikeln (Kryo-EM) (13 Å Auflösung) ist in der Architektur der Proteinhülle der Rekonstruktion aus negativ kontrastierten Einzelpartikeln sehr ähnlich, sie enthält jedoch keine zentrale Masse. Eine wahrscheinliche Erklärung für diesen Unterschied wäre, dass bei der Negativ Kontrastierung das Kontrastmittel nicht in das Innere des Oligomers diffundieren konnte und damit Masse vorgetäuscht wurde. Andererseits könnte hier auch eine Situation wie sie bei den archealen Hsp20.2 bzw. Hsp16.5 und bei Hsp26 aus *S. cerevisiae* zu finden ist, vorliegen. Wie Experimente mittels Negativ Kontrastierung zeigten, existiert AfHsp20.2 in zwei 24mer Populationen, die sich in ihrer Größe und

Verteilung der zentralen Masse unterscheiden (Haslbeck *et al.*, 2008). Während die kompakte Molekülpopulation Masse im Zentrum des Oligomers besitzt, nimmt diese in dem expandierten 24mer die Form einer zweiten, inneren Hülle an, die mit der äußeren Proteinhülle durch Stege verbunden ist. Das gleiche Verhalten wurde für ScHsp26 mittels Kryo-EM nachgewiesen (White *et al.*, 2006). In Analogie könnte auch Hsp16.41 (eventuell auch Hsp16.48) in verschiedenen 24mer-Populationen existieren und die beiden Rekonstruktionen könnten unterschiedliche 24mer Zustände reflektieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die 3D-Rekonstruktion des Hsp16.41 24mers aus negativ kontrastierten bzw. Eis-eingebetteten Partikeln jeweils die „Hauptpopulationen“ um 13 nm (Negativ Kontrastierung) bzw. um 14 nm (Kryo-EM) berücksichtigt. Innerhalb diesen Populationen wurden keinerlei Größenvarianzen in den Mittelungsbildern gleicher Ansichten gefunden, so dass aus den Daten jeweils nur ein einziges 3D-Modell berechnet wurde. Neuere Analysen unter Berücksichtigung aller Partikel des Kryo-EM Datensatzes zeigen jedoch, dass Projektionen vorhanden sind, die gleichen Ansichten von strukturell sehr ähnlichen, jedoch in der Größe variablen Objekten entsprechen (Abb. 55), was wiederum eine Indiz dafür ist, dass es mindestens eine weitere 24mer Population und/oder Populationen mit weniger Untereinheiten gibt.

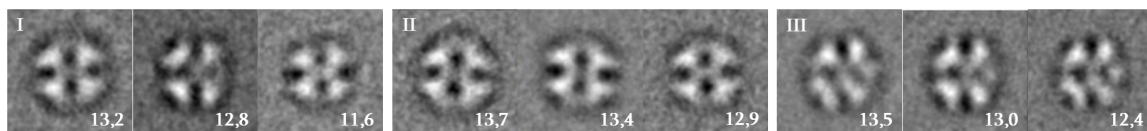


Abb. 55: Klassenmittlungen von drei unterschiedlichen Projektionen (I-III) von Hsp16.41 24mer (Kryo-EM). Die Zahlen entsprechen den Durchmessern. Beachte die Größenvarianz der Mittelungen innerhalb einer Ansicht.

Angesichts der Größenheterogenität der Partikelprojektionen, die sowohl bei Hsp16.41 als auch bei Hsp16.48 beobachtet wurden, sind bei beiden Proteinen neben der Plastizität der Oligomere auch das Vorhandensein von Oligomeren mit unterschiedlichen Stöchiometrien zu erwarten. Im Vergleich zu Hsp16.11/ Hsp16.2, bei denen die Partikelgrößen nahezu gleichverteilt sind, scheinen jedoch hier bestimmte Oligomere stärker populiert zu sein.

Sip-1: Ein „klassisches“ kleines Hitzeschockprotein?

Sip-1 weist viele Charakteristika von sHsps wie z.B. den hohen Anteil an β -Faltblatt-Struktur, die konservierte α -Kristallin Domäne, Oligomerisierung und Chaperonaktivität auf (Linder *et al.*, 1996). Allerdings zeigt es einige Besonderheiten:

- Sip-1 wird nur während der frühen embryonalen Phase von *C. elegans* und als einziges sHsp expremiert (Linder *et al.*, 1996). Seine Expression wird nicht durch Hitzeschock induziert, sein mRNA-Level nimmt unter Hitzeschock sogar ab.
- Während alle Hsp16 Proteine unter Standardbedingungen (20 mM HEPES, pH 7) im klassischen *in vitro* Chaperonassay die thermische Aggregation von CS unterdrücken, zeigt Sip-1 unter diesen Bedingungen und bei basischeren pH-Werten keinerlei Aktivität und co-aggregiert sogar mit CS. Eine vollständige Unterdrückung der Aggregation von thermisch entfalteter CS wird erst bei einem pH-Wert von 6,3 (pH-Wert in *C. elegans* (Wadsworth & Riddle, 1988)) und bei einem 10-fachen Überschuss von Sip-1 erreicht. Damit ist Sip-1 bisher das erste sHsp, für das eine pH-abhängige Chaperonaktivität beschrieben wurde.
- Sip-1 hat manche strukturelle Eigenschaften, die sich von den Eigenschaften anderer *C. elegans* sHsps, aber auch im allgemeinen anderer sHsps erheblich unterscheiden. So zeigen seine N- und C-terminalen Domänen keine Homologie zu anderen Proteinen. Während die anderen Mitglieder der Hsp16 Subfamilie pI-Werte in einem Bereich von 5 bis 6 haben, ist Sip-1 ein basisches Protein mit 10 Histidinen (pI=8,2) und trägt *in vivo* vermutlich positive Ladungen. Diese Besonderheiten machen es wahrscheinlich, dass Sip-1 andere Assoziationsflächen als die Hsp16 Proteine kreieren und andere Oligomerformen bilden kann, wie es in der Tat der Fall ist und in dieser Arbeit gezeigt wurde (siehe unten).

Oligomerstrukturen von Sip-1:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Quartärstruktur von Sip-1 mittels Negativ Kontrastierung ermittelt und durch Kryo-EM bestätigt und verfeinert. Demnach bildet das rekombinant gereinigte Sip-1 hauptsächlich drei co-existierende Populationen von Oligomeren mit 24, 28 und 32 Untereinheiten, die D6, D7 und D8 Symmetrien aufweisen. Die Oligomere zeigen eine Architektur, die dem Aufbau von fassförmigen Hsp16.9 aus Weizen (*Triticum aestivum*) (TaHsp16.9) (van Montfort *et al.*, 2001) sehr ähnlich ist (Abb. 56) und unterscheiden sich dadurch sowohl von *C.*

elegans Hsp16 Proteinen als auch von den meisten sHsps mit einer hohlen, ballähnlichen Struktur.

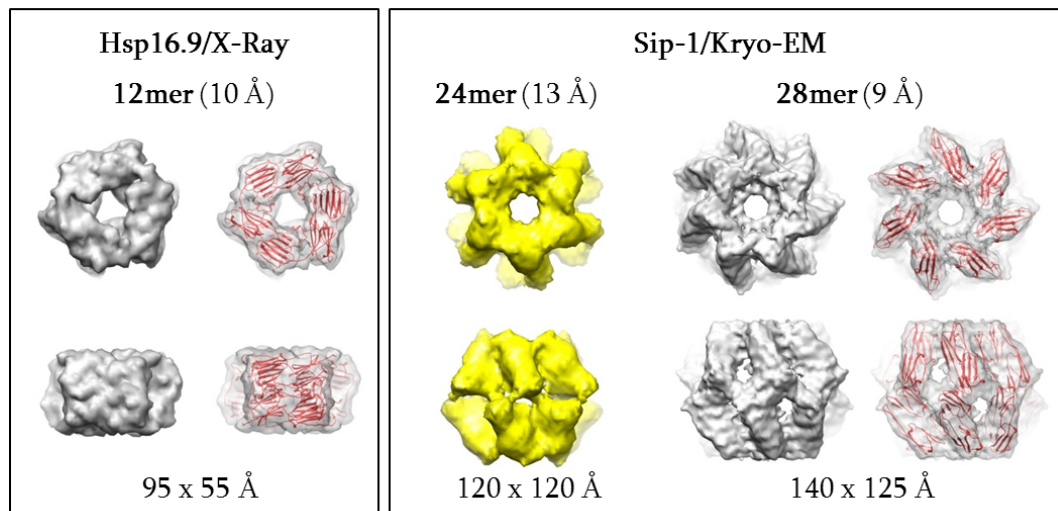


Abb. 56: Oligomerstrukturen von TaHsp16.9 und CeSip-1 aus mit den entsprechenden Auflösungen bzw. Dimensionen (Breite x Höhe) der dargestellten Modelle.

TaHsp16.9 ist aus 12 Untereinheiten aufgebaut, die in einem Doppelring zu je drei Dimeren angeordnet sind. Das Oligomer besitzt einen Durchmesser von 95 Å, eine Höhe von 55 Å und eine 25 Å breite innere Kavität (van Montfort *et al.*, 2001). Sip-1 Oligomere sind ebenfalls aus einem Doppelring aufgebaut und besitzen einen inneren Hohlraum, welcher in der Mitte des Oligomers seine größte Ausdehnung besitzt. Die Durchmesser der Sip-1 Oligomere liegen zwischen 12 und 14 nm, ihre zugehörigen Höhen zwischen 12 und 12,5 nm. Während in TaHsp16.9 die Dimere in den gegenüberliegenden Ringen flach angeordnet sind, stehen sie in Sip-1 fast senkrecht zueinander, was zu einer fast doppelt so großen Höhe des Sip-1 Doppelringes führt. Durch die Anordnung der Dimere in Sip-1 werden außerdem Öffnungen in Richtung der 2-zähligen Achse erzeugt, die insbesondere bei 28- und 32meren gut ausgeprägt sind.

3D-Rekonstruktionen aus Einzelpartikeln in verschiedensten Puffern (HEPES, PBS, MES/MOPS) zeigen, dass die Struktur von Sip-1 in allen Puffersystemen die gleichen Merkmale aufweist. Interessanterweise ändert sich jedoch die Verteilung der drei Oligomere in Abhängigkeit vom pH-Wert des verwendeten Puffers. Während (in MES/MOPS) bei einem pH-Wert von 8,5 32mere deutlich stärker populiert sind, überwiegen bei pH 6,5 28mere. 24mere sind bei pH 8,5 zu einem verschwindend geringen Anteil vorhanden, während sie bei pH 6,5 bis zu 15 % der Gesamtpopulation ausmachen. Bei pH 7,5 scheinen 32- und 28mere gleich populiert zu sein. Die pH-abhängige Variation der Oligomerverteilung konnte in unabhängigen Experimenten

mittels DLS über die Änderung des mittleren hydrodynamischen Radius ebenfalls erfasst werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die unterschiedlichen Sip-1 Oligomere in einem pH-abhängigen dynamischen Gleichgewicht befinden. Die beobachteten Tendenzen lassen vermuten, dass die kleineren Oligomere zumindest *in vitro* die aktiveren Spezies darstellen könnten. Spekulativ ist es auch denkbar, dass niedrige pH-Werte die Dissoziation von größeren Oligomeren in kleinere Einheiten mit bindungsaktiven, hydrophoben Flächen (Monomere, Dimere) triggern. Diese werden dann durch die Substratbindung dem Oligomergleichgewicht entzogen, was zur Dissoziation und vermehrten Bildung von kleineren Oligomeren führt. Diese Situation ist insofern nicht unwahrscheinlich, weil von vielen sHsps bekannt ist, dass die Zunahme der Chaperonaktivität mit einer durch eine strukturelle Änderung bedingten Zunahme der Hydrophobizität und Dissoziation in kleinere Oligomere einhergeht. Überlegungen über den Zustand des Sip-1 *in vivo* sind derzeit nicht möglich, da nicht bekannt ist, ob es im (vermutlich) reduzierenden cytosolischen Milieu des *C. elegans* Embryos überhaupt als Oligomer vorliegt (siehe unten).

Sip-1: Ein „Redox-reguliertes“ Chaperon?

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen deutlich, dass Sip-1 unter reduzierenden Bedingungen nicht mehr als höheres Oligomer vorliegt. In Übereinstimmung werden in SDS-PAGE in Gegenwart eines Reduktionsmittels (DTT oder TCEP) nur eine Monomerbande bei ca. 18 kDa, unter neutralen und oxidierenden Bedingungen dagegen eine Dimerbande (ca. 36 kDa) und Banden, die höheren Oligomeren entsprechen, beobachtet. Auch in AUZ werden in Gegenwart von Reduktionsmitteln nur Monomere und Dimere detektiert. Die Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Sip-1, das in seiner Sequenz zwei Cysteine besitzt (Cys5 und Cys54), unter neutralen und oxidierenden Bedingungen inter- und eventuell auch intramolekulare Disulfidbrücken bildet. Welches der beiden Cysteine daran beteiligt ist, kann im Moment nur tentativ aus den auf der Basis der α -Kristallin Domäne des humanen α B-Kristallins bzw. des MjHsp16.5 berechneten Hybridmodellen des Sip-1 abgeschätzt werden (Abb. 57).

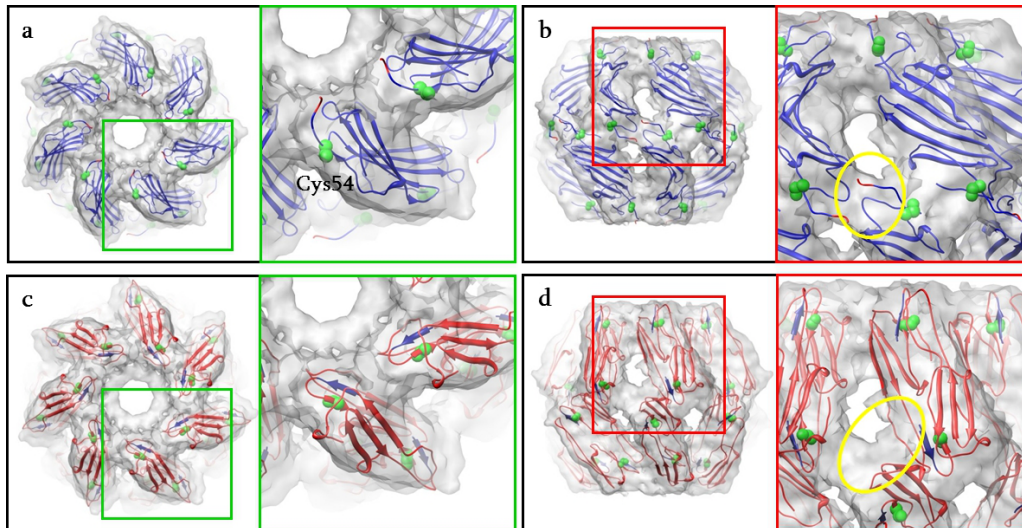


Abb. 57: Hybridmodelle des Sip-1 28mers. a) Top- (a) bzw. Seitenansicht (b) des Kryo-EM Volumens mit dem angedockten Sip-1 Homologie-Modell basierend auf der Struktur der α -Kristallin Domäne des humanen α B-Kristallins. Die eingerahmten Bereiche in den Bildern links sind jeweils rechts vergrößert dargestellt. Die Positionen von Cys54 (grüne Kugeln) und dem N-terminus der α -Kristallin Domäne (rot) sind hervorgehoben. c, d) Analog (a) und (b) mit MjHsp16.5 als Templatstruktur. Die Position des N-terminus der α -Kristallin Domäne ist blau hervorgehoben.

Beide Hybridmodelle enthalten die N-terminalen AS nicht. Da dadurch die Lage von Cys5 nicht bestimmt ist, sind eindeutige Aussagen über die Nachbarschaftsbeziehungen beider Cysteine bzw. über wahrscheinliche intra- und intermolekulare Disulfidbrücken nicht möglich. Allerdings scheinen intermolekulare Cys5-Cys5 bzw. inter- und/oder intramolekulare Cys5-Cys54 Disulfidbrücken plausibel, wenn angenommen wird, dass die N-Termini im Bereich des leeren EM-Volumens lokalisiert sind und/oder sich durch ihre Flexibilität temporär annähern. Beide Modelle schließen jedoch intermolekulare Cys54-Cys54 Disulfidbrücken zwischen den Monomeren eines Dimers bzw. zwischen den Monomeren benachbarter Dimere eindeutig aus, da die genannten Abstände größer als 30 Å sind.

Sip-1 zeigt Chaperonaktivität unter neutralen und oxidierenden Bedingungen. In Anwesenheit von Reduktionsmitteln tritt eine Aggregation bzw. eine co-Aggregation mit dem Substratprotein ein, wie es im Chaperonassay mit chemisch (durch Zugabe von DTT) entfaltetem Insulin beobachtet wird. Damit tritt der Verdacht auf, dass die Substrataffinität bzw. Chaperonaktivität von Sip-1, wie sein Oligomerisierungsgrad, mit dem Redoxzustand seiner Cysteine direkt korreliert.

Redox-regulierte Chaperone sind bereits durch das prokaryotische EcHsp33 (Graumann *et al.*, 2001; Graf *et al.*, 2004) und die eukaryotische 2-Cys Peroxiredoxin

Familie (Wood *et al.*, 2002) bekannt. Diese Chaperone zeigen eine direkte Antwort auf den oxidativen Stress. Sie besitzen Redox-sensitive Cysteine, deren Oxidationsgrad die Affinität zu ungefalteten Proteinen und somit die Chaperonaktivität bestimmen. Die Cysteine in Hsp33, welches ein für die Aktivität entscheidendes zweiwertiges Ion (Zn^{2+}) bindet, sind im inaktiven Zustand reduziert und im aktivierten Zustand oxidiert. Zusammen mit der Oxidierung der Cysteine findet zusätzlich eine Dimerisierung des Proteins statt. Bei der 2-Cys Peroxiredoxin Familie findet die Aktivierung über eine Reduktion der Thiolgruppen zur Sulfinssäure einhergehend mit einer Oligomerisierung statt.

Wie TXRF-Analysen zeigen, bindet Sip-1 Kalzium, welches vermutlich das Oligomerisierungsverhalten von Sip-1 moduliert. So werden in Negativ Kontrastierung in Gegenwart von EDTA nahezu keine Oligomere mehr beobachtet. Ob dieser Effekt allein auf die Komplexierung des Kalziums zurückzuführen ist, muss noch überprüft werden, da EDTA auch das Redoxpotential des Systems beeinflussen könnte.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass die Frage, ob Sip-1 ein „klassisches“ kleines Hitzeschockprotein oder ein Redox-reguliertes Chaperon ist, zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig beantwortet werden kann, da das Gesamtbild insgesamt komplex und unvollständig ist. Seine besonderen Strukturmerkmale als auch seine fehlende Stress-Induzierbarkeit lassen vermuten, dass Sip-1 im *C. elegans* Embryo nicht die klassische Aufgabe der kleinen Hitzeschockproteine, die Aggregation von partiell entfaltenen Substratproteinen zu unterdrücken, übernimmt, sondern spezialisiere Funktionen ausübt. Ob dabei Redox-regulierte Prozesse eine Rolle spielen, bleibt zu untersuchen. *In vitro* scheinen sowohl die Bildung von Disulfidbrücken als auch die Bindung von zweiwertigen Ionen eine entscheidende Rolle bei der Oligomerisierung zu spielen. Der mit der Dissoziation der Oligomere in Monomere und eventuell Dimere einhergehende Verlust der Chaperonaktivität in Gegenwart von Reduktionsmitteln kann damit zusammenhängen, dass dabei ein großer Überschuss von hydrophoben, bindungsaffinen Flächen, die im Oligomer nicht zugänglich sind, freigegeben werden, was zur unkontrollierten co-Aggregation mit Substratproteinen führt. Auch die pH-abhängige Änderung der Chaperonaktivität bleibt noch im Detail zu untersuchen.

5. Humanes α A- und α B-Kristallin

5.1. Kenntnisstand

Das Augenlinsenprotein α -Kristallin ist der prominenteste Vertreter der sHsps und Gegenstand intensiver Forschung hinsichtlich seiner Struktur und Funktion. α -Kristallin trägt der totalen Proteinkonzentration der Augenlinse von Vertebraten zu etwa 40 % bei (Bloemendal *et al.*, 2004), wo es bei der Unterdrückung der Aggregation anderer lentikulärer Kristalline (β - und γ -Kristalline) sowie bei der Erhaltung der Linsentransparenz wichtige Rollen spielt (Tardieu, 1998; Horwitz, 2000). α -Kristallin kommt in der Augenlinse unter physiologischen Bedingungen in sehr hohen Konzentrationen vor, so liegen diese im Cortex der Augenlinse bei etwa 250 mg/ml, im Nukleus sogar bei etwa 450 mg/ml (Fagerholm *et al.*, 1981).

α -Kristallin ist eine hetero-Oligomere Mischung aus zwei Polypeptidketten, α A- und α B-Kristallin, welche durch verschiedene Gene kodiert werden und ca. 60 % Sequenzhomologie besitzen (Horwitz, 2003). Das molare Verhältnis von α A- zu α B-Kristallin in der Augenlinse von den meisten Vertebraten beträgt 3:1 (Horwitz, 2003; Bloemendal *et al.*, 2004), wobei die physiologische Signifikanz dieses Verhältnisses noch ungenügend geklärt ist. Während das α A-Kristallin (173 Aminosäuren) hauptsächlich im Auge vorkommt, ist das α B-Kristallin (175 Aminosäuren) ubiquitär im Körper verteilt und wird u.a. im Hirn- und Lungengewebe sowie in Herz- und Skelettmuskeln expremiert (Iwaki *et al.*, 1990).

In vitro zeigen α A- und α B-Kristallin Chaperonaktivität und unterdrücken die Aggregation von Lysozym bei einem doppelten molaren Überschuss (Peschek *et al.*, 2009). *In vivo* sind beide Proteine für die Transparenz der Augenlinse verantwortlich. Vor allem verhindert das α B-Kristallin durch eine irreversible Bindung an teilweise denaturierte Proteine die Trübung der Augenlinse. Auch beim Fehlen von α A-Kristallin setzt eine frühe Kataraktbildung ein. Die Chaperonaktivität des α B-Kristallins ist nicht nur auf die Augenlinse beschränkt. Seine allgemeine funktionelle Wichtigkeit wird u.A. durch seine Assoziation mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie Creutzfeldt-Jakob (Iwaki *et al.*, 1992), Alzheimer (Lowe *et al.*, 1992) sowie Parkinson (Renkawek *et al.* 1992; 1994) deutlich, alles neuropathologische Erkrankungen, die ihre Wurzeln in irreversibler Aggregation von fehlgefalteten/entfalteten Proteinen haben. α B-Kristallin zeigt auch *in vitro* Chaperonaktivität und unterdrückt die Aggregation von Substratproteinen wie Lysozym (Peschek *et al.*, 2009).

Aus der Augenlinse von Vertebraten isoliertes α -Kristallin wird in der Literatur als eine Mischung von dynamischen, polydispersen hetero-Oligomeren mit bis zu 50 Untereinheiten und molekularen Massen von 300 kDa bis 1,2 MDa beschrieben (Siezen *et al.*, 1978; Horwitz, 2009). Seine Quartärstruktur scheint von verschiedenen Faktoren wie z.B. der Temperatur, Ionenstärke, Kalzium-Konzentration, pH, post-translationalen Modifikationen wie Phosphorylierung, Lokalisation in der Linse, Gewebealter, Spezies etc. abzuhängen (Horwitz, 2009).

Nativ gereinigte oder rekombinant hergestellte α A- und α B-Kristalline bilden homo-Oligomere, die ihre Untereinheiten schnell und reversibel austauschen und ähnliche Polydispersitäten wie das native α -Kristallin zeigen. Laut einer Studie mittels Elektrosprayionisation-Tandem-Massenspektrometrie bildet das aus der Rinderaugenlinse gereinigte α B-Kristallin eine heterogene Mischung aus Oligomeren mit 24 bis 33 Untereinheiten, wobei 28mere dominieren und auch Subpopulationen mit kleineren (10-mere) und größeren (40-mere) Spezies vorhanden sind (Aquilina *et al.*, 2003). Laut SEC-MALS (SEC gekoppelt mit „multiangle“ Lichtstreuung) bildet das humane, rekombinante α B-Kristallin Oligomere mit Molekulargewichten von 530 kDa bis 684 kDa (Horwitz, 2003), wobei die Polydispersität des Proteins mit Phosphorylierung zunimmt (Aquilina *et al.*, 2004). Das rekombinante, humane α A-Kristallin existiert ebenso als eine heterogene Mischung aus Oligomeren mit 22 bis 30 Untereinheiten (Aquilina *et al.*, 2005), wobei die Heterogenität von α A-Kristallin stärker ausgeprägt zu sein scheint als die von α B-Kristallin (Peschek *et al.*, 2009).

Aufgrund der ausgeprägten Polydispersität und strukturellen Flexibilität von α A- und α B-Kristallin ist es bis heute nicht gelungen, die Strukturen dieser Proteine bei hoher Auflösung zu ermitteln. Kürzlich wurden die Strukturen von dimeren α -Kristallin-Domänen von α A- und α B-Kristallin mittels Röntgen-Kristallographie bzw. NMR bestimmt (Bagneris *et al.*, 2009; Laganowsky *et al.*, 2010; Jehle *et al.*, 2010). Diese Arbeiten zeigten verschiedene Dimerisierungsformen der α -Kristallin-Domäne. Die Arbeiten enthielten auch einige Hinweise auf die Wechselwirkungen der Untereinheiten im Oligomer, dennoch lieferten sie keine detaillierten Aussagen über die strukturellen Grundlagen der Oligomerisierung sowie über die Bindungsstellen für Substratproteine.

Frühere Untersuchungen mittels Kryo-EM am funktionell-assemblierten α B-Kristallin in voller Länge (rekombinant, human) sowie am nativen α -Kristallin aus der Rinderaugenlinse führten lediglich zu „groben“ Modellen bei ca. 4 nm Auflösung (Haley *et al.*, 1998; 2000), die keine Aussagen über die Topologie der Untereinheiten

erlaubten. Dabei wurden die niedrigen Auflösungen darauf zurückgeführt, dass α -Kristalline eine variable, asymmetrische, schlecht definierte Quartärstruktur bzw. hohe Polydispersität besitzen.

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Lehrstuhl für Biotechnologie, TUM (Prof. J. Buchner) wurden in unserer Gruppe rekombinantes, humanes α A- und α B-Kristallin, (1:1) bzw. (3:1) Mischungen aus beiden sowie aus der Rinderaugenlinse gereinigtes, natives α -Kristallin mittels biophysikalischer Methoden hinsichtlich ihrer Polydispersität und Quartärstruktur charakterisiert (Peschek *et al.*, 2009). Dabei stellte es sich heraus, dass α B-Kristallin zwar eine hohe, aber im Vergleich zu den übrigen Proteinen dennoch geringere Polydispersität zeigt. Mittels 3D-Rekonstruktion an negativ-kontrastierten Einzelpartikeln gelang es zu zeigen, dass α B-Kristallin mindestens eine Population von strukturell definierten Oligomeren bildet (Peschek *et al.*, 2009). Für dieses Oligomer aus 24 Untereinheiten konnte ein 3D-Modell bei einer Auflösung von ca. 20 Å erstellt werden (Peschek *et al.*, 2009). Nach dem Modell besitzt das 24mer eine für sHsps sehr charakteristische Architektur (Kim *et al.*, 1998; Haslbeck *et al.*, 2008): die Untereinheiten bilden eine nahezu sphärische Proteinhülle (Durchmesser ca. 13,5 nm), in der sie entsprechend einer Tetraedersymmetrie angeordnet sind. Die Proteinhülle, die eine große Kavität umgibt, besitzt an Positionen der 2- und 3-zähligen Symmetrieachsen Öffnungen, die in die Kavität des Oligomers hineinragen. Inzwischen konnte die Auflösung der Rekonstruktion mittels Kryo-EM auf ca. 9,5 Å verbessert werden (Abb. 58). Auch konnte in einem dreifachen Hybrid-Ansatz (NMR, Kryo-EM und Homologie-Modellierung) ein pseudoatomares Modell für das 24mer erstellt werden, das ganz neue Erkenntnisse für die Assemblierungsprinzipien lieferte.

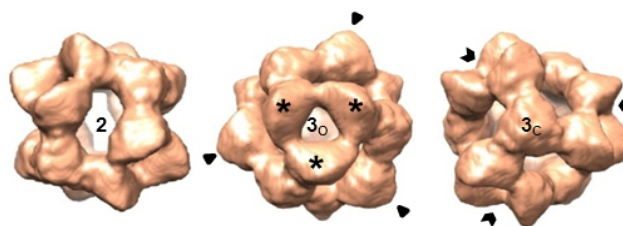


Abb. 58: Oberflächendarstellung der Kryo-EM Dichtekarte des α B-Kristallin 24mer (Braun *et al.*, 2011). Blickrichtung entlang einer 2-zähligen (links) und entlang einer 3-zähligen Achse (mitte, rechts) jeweils senkrecht auf die entgegengesetzten Durchstosspunkte der 3-zähligen Achse. Balken: 5 nm.

Zudem wurden Strukturmodelle für andere Oligomere mit unterschiedlichen Stöchiometrien vorgeschlagen, die sich von den 24meren durch Dissoziation/Assoziation von Monomeren und Dimeren herleiten lassen (Abb. 59) (Braun *et al.*, 2011).

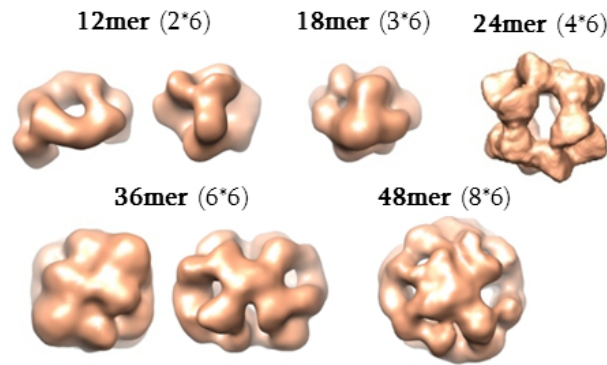


Abb. 59: Kryo-EM 3D-Rekonstruktionen von α B-Kristallin Oligomeren, die sich aus $n \times 6$ -Untereinheiten zusammensetzen (Braun *et al.*, 2011). Beachte die zwei unterschiedlichen Konformationen von 12- und 36meren.

5.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Basierend auf und ergänzend zu den genannten Studien wurden im Rahmen dieser Arbeit rekombinantes, humanes α A- und α B-Kristallin sowie drei verschiedene α B-Kristallin Mutanten mittels Kryo-EM hinsichtlich ihrer Oligomerverteilung untersucht. Um die Rolle der N-Termini bei der Oligomerisierung sowie deren mögliche Effekte auf die Oligomer-Stabilisierung bzw. -Verteilung zu untersuchen, wurden α B-Kristallin Doppelmutanten **A4C/H6C** und **H6C/S19C** kreiert (J. Peschek), die in ihrem C-terminalen Bereich Cystein-Reste enthielten. Bei der Tripelmutante **S19E/S45E/S59E** wurden die Serinreste an Positionen 19, 45 und 59 gegen Glutaminsäure ausgetauscht, um die *in vivo* Phosphorylierung (Ito *et al.*, 1997) nachzuahmen.

Vor der Präparation für TEM wurden alle genannten Proteine für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert, um die native Umgebungstemperatur zu simulieren. Anschließend wurden die Proteinlösungen sofort kryofixiert und im TEM visualisiert (Abb. 60). Alle EM-Aufnahmen bis auf die S19E/S45E/S59E (3E) Mutante (Abb. 60e) zeigten Projektionsbilder in ähnlichen Größenbereichen mit Größenvarianzen von ca. 8 bis 14 nm. Die Heterogenitäten von α B-Kristallin und seinen Mutanten waren vergleichbar. Die Partikel der 3E-Mutante scheinen im Mittel kleiner zu sein als die der anderen α -Kristalline.

Im nächsten Schritt wurden alle fünf Proteine mittels Bildverarbeitung analysiert, wobei bei allen die gleiche Vorgehensweise verwendet wurde, um einen möglichst fairen Vergleich zu gewährleisten. Die ersten Eigenbilder der untersuchten α -Kristalline, die nach einer MSA ohne Translations- und Rotationsalignierung der Einzelpartikel erhalten wurden, sind in Abbildung 61 vergleichend dargestellt.

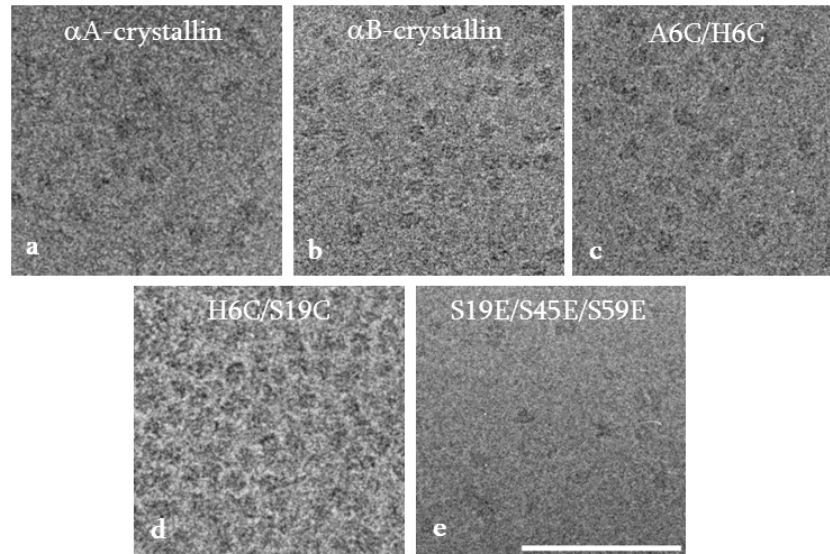


Abb. 60: Kryo-EM Aufnahmen von α -Kristallinen. 0,2 mg/ml Protein in 12 mM PBS Puffer, pH=7,4). Balken: 100 nm.

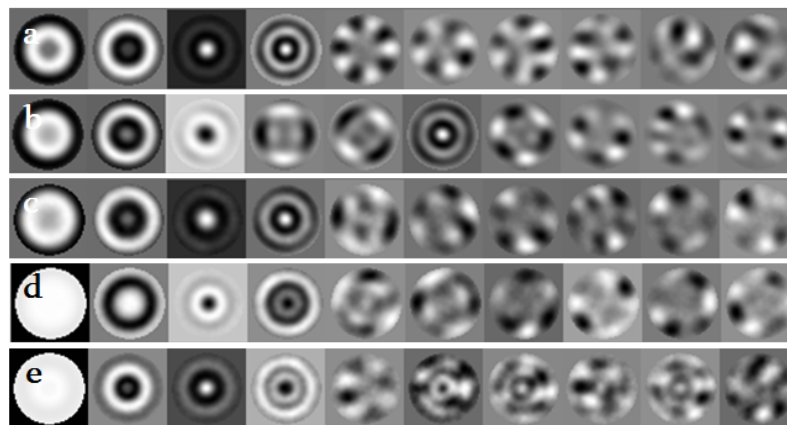


Abb. 61: Eigenbilder von **a)** α A-Kristallin, **b)** α B-Kristallin, **c)** α B-Kristallin-A4C/H6C, **d)** α B-Kristallin-H6C/S19C, **e)** α B-Kristallin-3E nach der ersten MSA ohne Translations- bzw. Rotationsalignierung. Boxgröße: 18 nm.

Bei allen Proteinen zeigen die ersten drei Eigenbilder eine Größenvarianz und bestätigen dadurch den ersten visuellen Eindruck. Die ersten beiden Eigenbilder bei α A- und α B-Kristallin lassen vermuten, dass diese in einem ähnlichen Größenbereich liegen. Unterschiede zwischen den untersuchten Populationen sind ab dem 4. Eigenbild zu erkennen. Während bei α A-Kristallin immer noch Größenvarianzen zu sehen sind, zeigt das 4. Eigenbild von α B-Kristallin eine Varianz, die auf längliche Partikel deutet. Hinweise auf Symmetrien sind bei α A-Kristallin erst ab dem 5. Eigenbild zu sehen, wobei die angezeigte 5-zählige Symmetrie ungewöhnlich erscheint. Das sechste Eigenbild aus α A-Kristallin deutet auf eine 2-zählige Symmetrie hin. Bei α B-Kristallin ist eine 2-zählige Symmetrie in den Eigenbildern 4 bzw. 5 und

eine 3-zählige im Eigenbild 7 zu sehen. α B-Kristallin Mutanten zeigen wie das α A-Kristallin bis einschließlich viertem Eigenbild ausschließlich Größenvarianzen, wobei die mittlere Partikelgröße bei der 3E-Mutante am kleinsten zu sein scheint.

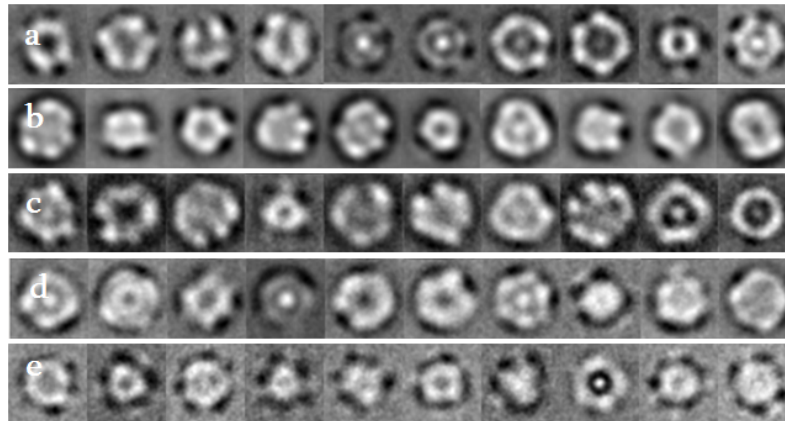


Abb. 62: Klassenmittelungsbilder von **a)** α A-Kristallin, **b)** α B-Kristallin, **c)** α B-Kristallin-A4C/H6C, **d)** α B-Kristallin-H6C/S19C, **e)** α B-Kristallin-3E nach der ersten MSA ohne Translations- bzw. Rotationsalignierung. Boxgröße: 18 nm.

Die erste Klassifizierung zeigt in den Klassenmittelungsbildern von jeweiligen Proben (Abb. 62) die in den Eigenbildern beobachtete Größenvarianz. Während bei der 3E-Mutante (Abb. 62e) hauptsächlich kleinere Partikel mit einem Durchmesser von ca. 10 nm zu erkennen sind, zeigen die restlichen Proben eine heterogene Verteilung mit Partikelgrößen bis zu 18 nm. Bei der α B-Kristallin A4C/H6C Mutante sind hauptsächlich Partikel vorhanden, die größer als 14 nm sind. Innerhalb der ersten Klassenmittelungsbilder sind, im Gegensatz zu den Eigenbildern, keinerlei Symmetrien erkennbar.

Im nächsten Schritt wurden alle Datensätze hinsichtlich der Verteilung von Oligomeren mit unterschiedlicher Anzahl von Untereinheiten untersucht. Dazu wurden Reprojektionen von aus dem hexameren Strukturelement des 24meren hergeleiteten, theoretischen Modellen von verschiedenen Oligomeren (6mer, 12mer, 18mer, 24mer, 36mer und 48mer) ($n \cdot 6$) bei allen Datensätzen als Referenzen eingesetzt, um eine Trennung der Datensätze nach unterschiedlichen Oligomer Populationen zu erzielen. Die erhaltene Oligomerverteilung ist in Abbildung 63 dargestellt.

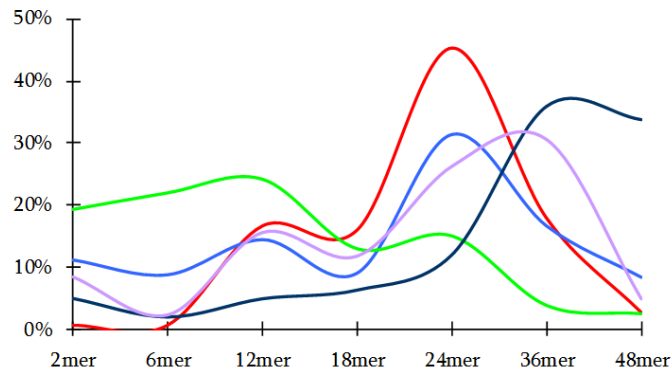


Abb. 63: Verteilung verschiedener Oligomere in α A-Kristallin (blau), α B-Kristallin (rot), α B-Kristallin-A4C/H6C (dunkel blau), α B-Kristallin-H6C/S19C (violett), α B-Kristallin-3E (grün).

Wie die Verteilung zeigt, dominieren in α A- und α B-Kristallin Präparationen 24- und 12mere. Die 12mere sind bei beiden gleich populiert, während die 24mere bei α B-Kristallin mit knapp 50 % dominanter sind. Im Vergleich zu α B-Kristallin enthält α A-Kristallin deutlich mehr kleinere Partikel. In α B-Kristallin-H6C/S19C sind mehr 36mere zu finden, während die Mutante A4C/H6C fast ausschließlich aus 36- und 48meren besteht und einen geringen Anteil an 24meren oder kleineren Oligomeren enthält. Die 3E-Mutante verhält sich gegensätzlich: hier sind nur noch viele kleine Oligomere, ca. 15 % 24mere und kaum größere Oligomere zu finden.

Im nächsten Schritt wurde innerhalb von jedem Datensatz mit den Partikeln, die den Projektionen des 24mer Modells zugeordnet wurden, eine 3D-Rekonstruktion über „projektion matching“ erstellt. In Abbildung 64 sind für jeden Datensatz 10 Mittelungsbilder dargestellt, die für die Rekonstruktion verwendet wurden.

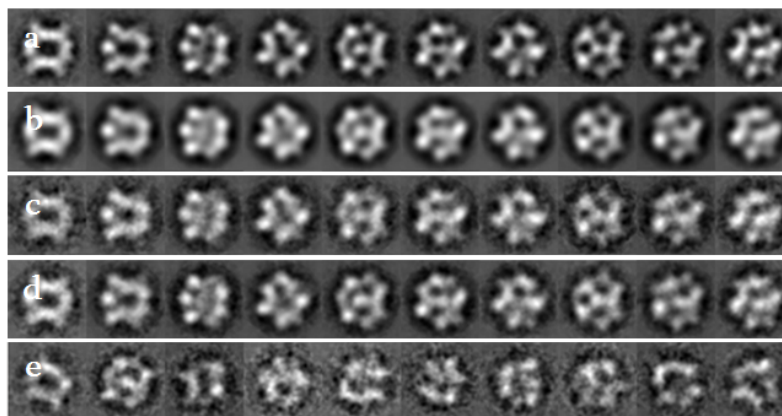


Abb. 64: Klassenmittlungen von Partikeln, die in den Datensätzen von α A-Kristallin (a), α B-Kristallin (b), α B-Kristallin-A4C/H6C (c), α B-Kristallin-H6C/S19C (d) und α B-Kristallin-3E (e) dem 24mer zugeordnet wurden. Die Mittelungsbilder sind für alle Datensätze in identischen Projektionsrichtungen (Eulerwinkel) gezeigt. Boxgröße: 18 nm.

Erwarteterweise sehen bei allen α B-Kristallin Datensätzen die Projektionsansichten des 24mers entlang identischen Projektionsrichtungen (Eulerwinkel) sehr ähnlich aus. Die Formen als auch die Größen sind innerhalb der zusammengehörenden Projektionsansichten konstant. Die schlechte Qualität der Klassenmittlungen bei der α B-Kristallin-3E Mutante (Abb. 64e) ist durch die geringe Anzahl der Partikel zu begründen, die dem 24mer zugeordnet wurden. Auch die Projektionsansichten des α A-Kristallin 24mers sind denen des α B-Kristallins sehr ähnlich.

Ausgehend von den in Abbildung 64 gezeigten Klassenmittlungen wurden über „*projektion matching*“ für alle Datensätze vorläufige 3D-Rekonstruktionen für das 24mer erstellt (Abb. 65). Nach einem ersten Alignierungslauf sehen alle Modelle, die unter der Annahme einer Tetraedersymmetrie rekonstruiert wurden, sehr ähnlich aus und zeigen alle bekannten Strukturmerkmale von α B-Kristallin 24mer. Allerdings muss hier nochmals betont werden, dass die Modelle nur vorläufig sind, da keinerlei Iterationen durchgeführt wurden.

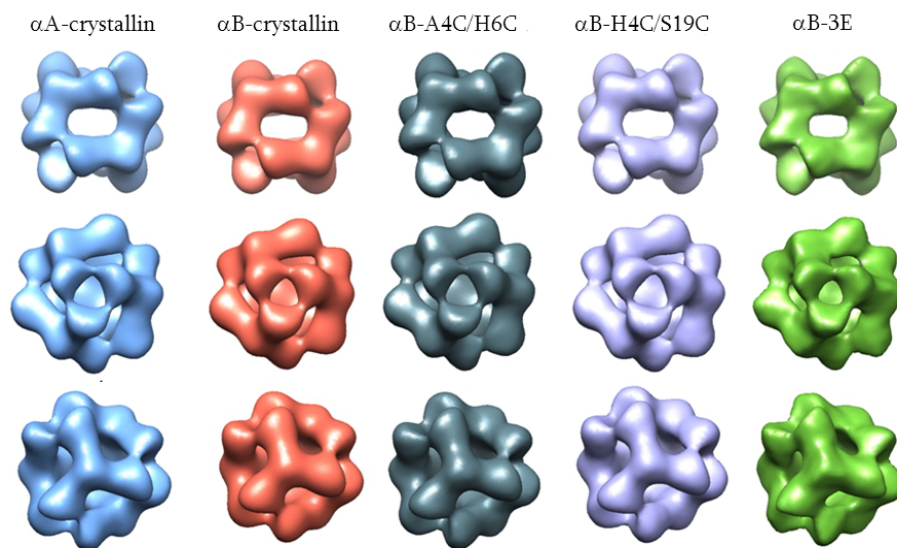


Abb. 65: Vorläufige Kryo-EM 3D-Rekonstruktionen von α A- und α B-Kristallin bzw. α B-Kristallin Mutanten mit 24 Untereinheiten. Blickrichtung entlang einer 2-zähligen Symmetrieachse (1. Reihe) und entlang einer 3-zähligen Achse jeweils senkrecht auf die entgegengesetzten Durchstoßpunkte der 3-zähligen Achse (2. und 3. Reihe).

5.3. Zusammenfassung und Diskussion

In der Literatur finden sich zahlreiche Arbeiten, die zeigen, dass α -, α A- und α B-Kristallin in polydispersen Oligomerpopulationen existieren. In vielen dieser Arbeiten wurden biophysikalische Methoden wie Lichtstreuung und AUZ eingesetzt, um Änderungen der Oligomerezustände bzw. Polydispersität abhängig von z.B. Temperatur, pH, post-translationalen Modifikationen wie Phosphorylierung etc. zu untersuchen und diese mit der Chaperonaktivität zu korrelieren (Horwitz, 2009). Allerdings resultierten diese Arbeiten in sehr widersprüchlichen Aussagen. Durch jüngere Studien mittels Massenspektroskopie u.A. auch an α B-Kristallin, ist es gelungen, unterschiedliche Oligomere zu identifizieren, deren relativen Häufigkeiten zu bestimmen und dadurch die α B-Kristallin Polydispersität plausibel zu begründen (Aquilina *et al.*, 2003; Benesch *et al.*, 2008). Die multiplen Strukturen von α B-Kristallin Oligomeren konnten kürzlich in unserer Arbeitsgruppe über einen dreifachen Hybrid-Ansatz (NMR, Kryo-EM und Homologie-Modellierung) aufgeklärt werden (Braun *et al.*, 2011). Demnach sind α B-Kristallin Oligomere unterschiedlicher Stöchiometrien sehr ähnlich aufgebaut und haben weitgehend ähnliche Dimensionen, was wiederum zu sehr ähnlichen hydrodynamischen Eigenschaften führt. Damit ist die Differenzierung zwischen verschiedenen Oligomerpopulationen, vor allem wenn sie in geringen Anteilen vorhanden sind, durch auf der Hydrodynamik basierende, integrierende Techniken wie AUZ oder DLS nahezu nicht möglich. Zwar zeigen die genannten Methoden Verschiebungen im mittleren Molekulargewicht an, die z.B. aus Temperatur- oder pH-Änderungen resultieren, sie geben aber nicht an, wie das Oligomergleichgewicht beeinflusst wird, in anderen Worten, welches Oligomer oder welche Oligomere unter bestimmten Bedingungen überwiegen. Dies ist jedoch für das Verständnis der Chaperonaktivität wichtig, da nach unseren Untersuchungen die Bindungsaffinität zu Substratproteinen sehr stark mit der Oligomerezustand und -architektur zusammenhängt.

In dieser Arbeit wurde ein erster Versuch unternommen, mittels Kryo-EM und MRA die Oligomerverteilungen von α A- und α B-Kristallin sowie von drei α B-Kristallin Mutanten miteinander zu vergleichen. Dazu wurden Projektionsbilder der genannten Proteine mit Projektionen bereits bekannter 3D-Modelle von α B-Kristallin Oligomeren, die sich aus $n \cdot 6$ Untereinheiten zusammensetzen, verglichen. Nach der Analyse überwiegen in α B-Kristallin 24- und 12mere, was im Einklang mit früheren Ergebnissen ist (Peschek *et al.*, 2009). Projektionen von α B-Kristallin Oligomeren werden auch in α A-Kristallin gefunden, was auf sehr ähnliche Oligomerarchitek-

turen beider Proteine hindeutet. Dies ist nicht überraschend, da α A- und α B-Kristallin *in vivo* und *in vitro* zu α -Kristallin hetero-Oligomeren assoziieren, was die Kompatibilität beider Strukturen zeigt. Auch in α A-Kristallin sind 24- und 12mere dominant, hier kommen jedoch kleinere (6mere) und größere (36- und 48mere) hinzu, so dass die Oligomerverteilung heterogener ist. Auch diese Beobachtung bestätigt frühere Ergebnisse aus Analysen an negativ kontrastiertem α A-Kristallin (Peschek *et al.*, 2009). In wieweit diese unterschiedlichen Oligomerverteilungen mit den allgemeinen Eigenschaften von α A- und α B-Kristallin wie z.B. Hydrophobizität, Chaperonaktivität etc. korrelieren, kann aber anhand der bisherigen Analyse nicht diskutiert werden, da sicherlich auch andere Oligomerformen zu beiden Gleichgewichten beitragen.

α B-Kristallin-3E Mutante enthält hauptsächlich 6- und 12mere. Dieses Verhalten lässt sich aus der Lage der drei Serine 19, 46 und 59 im pseudoatomaren Modell des α B-Kristallin 24mers plausibel erklären: alle drei Serine befinden sich in dem Bereich, in dem die N-Termini zu Hexameren assoziieren (Abb. 66). Laut Modell wird die Einführung von negativen Ladungen an Positionen S19 und S59 durch die Nachbarschaft von positiv geladenen Aminosäuren teilweise toleriert. Der Ersatz aller drei Serine durch Glutaminsäure führt allerdings zwangsläufig zu einer Akkumulation von negativen Ladungen in diesem Bereich, was die Assoziation von hexameren Substrukturen zum Oligomer verhindert und zur vermehrten Bildung von 6- und 12meren führt. Dass die 3E-Mutante 18- und 24mere jeweils zu einem geringen Anteil (ca. 15 %) enthält, ist angesichts der Flexibilität der N-Termini verständlich (Carver *et al.*, 1992). Es ist möglich, dass manche der N-Termini sich temporär von ihren im pseudoatomaren Modell angegebenen Positionen soweit entfernen, dass die negativen Ladungen (temporär) toleriert werden und damit (temporäre) Assoziationen zu 18- bzw. 24meren möglich sind.

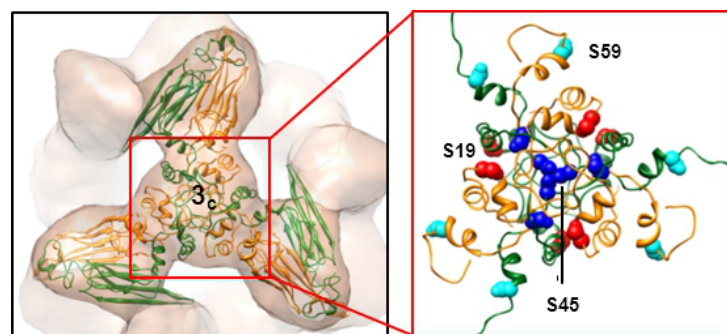


Abb. 66: Lage der Serine 19, 45 und 59 im pseudoatomaren Modell des α B-Kristallin 24mers. (Abbildung nach Braun *et al.*, 2011).

Die Oligomerverteilung der α B-Kristallin Doppelmutante **H6C/S19C** ähnelt, bis auf das häufigere Vorkommen von 36meren (ca. 30 %), den Oligomerverteilungen von α A- und α B-Kristallin. Die vermehrte Bildung von 36meren lässt sich anhand der Struktur und des Oligomerisierungsmusters von α B-Kristallin erklären. Im 24mer befinden sich die N-Termini in nächster Nachbarschaft, so dass eine Stabilisierung vom A4C/H6C-24mer durch die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken wahrscheinlich ist. Nach dem allgemeinen Oligomerisierungsmuster des α B-Kristallins (Braun *et al.*, 2011) (Abb. 67) scheinen sich weitere Dimere an diese 24mere anzulagern, so dass vermehrt 36mere gebildet werden, die ihrerseits durch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den angelagerten Dimeren und dem 24mer stabilisiert werden.

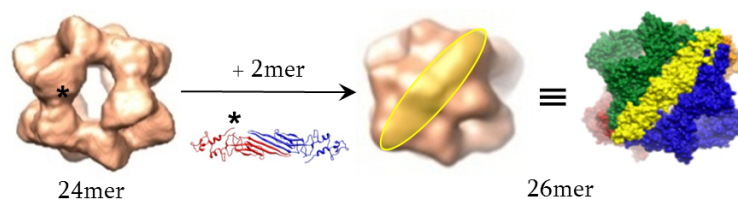


Abb. 67: Möglicher Mechanismus der Bildung von höheren Oligomeren durch die Anlagerung von Dimeren an das α B-Kristallin 24mer. Die Lage eines N-Terminus im Dimer und im 24mer ist mit einem Stern markiert. (Abbildung nach Braun *et al.*, 2011).

Die Doppelmutante **A4C/H6C** scheint nahezu zu gleichen Anteilen aus 36meren und 48meren zu bestehen. Der im Vergleich zu der Doppelmutante **H6C/S19C** sehr geringe Anteil an kleineren Oligomeren lässt hier einen Assoziationsweg über Hexamere oder noch kleinere Bausteine wie Dimere plausibler erscheinen.

Nach unseren Untersuchungen stellen Oligomere, bei denen die potentiellen Substratbildungsstellen in Kontakten zwischen den Monomeren involviert sind (z.B. 36mere) „storage“ Formen mit niedriger Affinität zu Substratproteinen dar (Braun *et al.*, 2011). Demnach sollten sich die untersuchten Mutanten in ihren Chaperonaktivitäten erheblich unterscheiden. Es ist zu erwarten, dass die Doppelmutanten eine geringere, die 3E-Mutante eine hohe Aktivität, sogar ein abnormale co-Aggregation mit den Substratproteinen, zeigen. Diesbezügliche Untersuchungen sind derzeit im Gange.

6. Materialien und Methoden

6.1. Materialien

6.1.1. Proteine

Alle sHsps aus *T. gondii* wurden von Martin Haslbeck (Lehrstuhl für Biotechnologie, TUM), sHsps aus *C. elegans* von Daniel Weinfurtner (Lehrstuhl für Biotechnologie, TUM), humanes α A-Kristallin, α B-Kristallin und α B-Kristallin-Mutanten von Jirka Peschek (Lehrstuhl für Biotechnologie, TUM) zur Verfügung gestellt. Für die Expression und Reinigung von sHsps aus *T. gondii* siehe de Miguel *et al.*, 2009, von sHsps aus *C. elegans* siehe Weinfurtner, 2008, und von α -Kristallinen siehe Peschek *et al.*, 2009.

6.1.2. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von Sigma Aldrich (St Louis, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) erhalten. Chemikalien von anderen Firmen wurden in der Arbeit explizit erwähnt.

6.1.3. Geräte

Name	Hersteller
JEOL JEM 100CX	JEOL, Japan
JEOL JEM 2011	JEOL, Japan
Kryo Halter	Gatan, Deutschland
Kryo-Guillotine	EMBL, Heidelberg
Vitrobot Mark III	FEI, Niederlande
Bal-Tec SCD005	Balzers, Lichtenstein
Wasserbad	GFL, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Deutschland
Gelelektrophoreseeinheit	Biorad, Deutschland
Spannungsquelle	Biorad, Deutschland
Laborwaagen	Satorius, Deutschland
Ultrospec 1000	Amersham Biosciences/ GE Healthcare
Scanner Flextight X5	Hasselblad, Schweden

6.1.4. Software

Name	Serverdienst
Imagic 5	www.imagescience.de
Eman 1.9	http://blake.bcm.edu/EMAN/
UCSF Chimera	www.cgl.ucsf.edu/chimera
Gimp	www.gimp.org
ImageJ	http://rsb.info.nih.gov/ij/
Jalview	www.jalview.org
Pymol	http://pymol.sourceforge.net/
Situs	http://situs.biomachina.org/
Phyre	www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/
Swiss-Model	http://swissmodel.expasy.org/

6.2. Methoden

6.2.1. Biochemische Proteinanalytik

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford:

Proteinkonzentration wurde nach Bradford-Assay (Bradford, 1976) bestimmt. Der Bradford-Assay ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Sie basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue G von 465 nm nach 595 nm nach der Bindung an kationische aber auch nicht-polare Seitenketten von Proteinen. Hierbei wird in saurer Lösung ein stabiler Komplex gebildet, der durch die Blauverschiebung photometrisch gemessen werden kann.

Für die Messung werden 20 µl Proteinlösung unbekannter Konzentration mit 980 µl Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH) vermischt und nach 5 Minuten Inkubation bei RT bei 595 nm im Photometer Ultrospec 1000 gegen eine Nullprobe (Wasser) gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt dann durch den Vergleich mit einer Eichgeraden, die mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration angefertigt wird.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE):

Bei der SDS-PAGE wird den Proben das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate, SDS*) hinzugegeben, welches an die Proteine bindet, diese denaturiert und ihnen gleichzeitig eine negative Gesamtladung gibt. Deshalb wandern die Proteine im elektrischen Feld zur Anode. Die Laufzeit der Proteine hängt fast ausschließlich von deren Masse ab. Durch die Maschen des verwendeten Polyacrylamidgels werden die Proteine aufgetrennt, d.h. Proteine mit größerem Molekulargewicht haben längere Laufzeiten als Proteine mit kleinerem.

In dieser Arbeit wurde SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) mit leichten Variationen durchgeführt. Es wurden 15 %ige Gele verwendet. 20 µl der Proteinlösung wurden je nach Experiment entweder mit Reduktionsmittel (DTT oder TCEP) oder ohne mit 5 µl Auftragspuffer ohne Aufheizen auf das Gel aufgetragen. Das Molekulargewicht wurde mit einem LMW-Standard (*low molecular weight*) bestimmt. Die Elektrophorese wurde für 45 Minuten bei 200 V oder 45 mA/Gel durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit 0,1% (w/v) Coomassie-Brilliant Blue für ca. 30 Min. Überschüssige Farbe wurde mit einem Entfärber entfernt.

15 %iges SDS-Gel:	5 ml	30%ige Acrylamidlösung (BioRad)
	2,35 ml	H ₂ O (deionisiert)
	2,5 ml	Trenngelpuffer 1,5M Tris/HCl, pH 8,8
	100 µl	10 % (w/v) SDS-Lösung
	zum Starten der Polymerisation:	50 µl
	5 µl	TEMED
Trenngel:	0,67 ml	30 %ige Acrylamidlösung (BioRad)
	3,0 ml	H ₂ O (deionisiert)
	1,25 ml	Sammelpuffer 0,5M Tris/HCl, pH 6,8
	50,0 ml	10 % (w/v) SDS-Lösung
	zum Starten der Polymerisation:	25 µl
	5 µl	TEMED
Auftragspuffer:	0,5 M	Tris/HCl, pH 6,8
	20 %	Glycerol
	0,1%	Bromphenolblau
	1%	SDS
Entfärber:	30 %	Methanol
	10 %	Essigsäure
	60 %	H ₂ O (deionisiert)

Blue-Native-Gel-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE):

Um den Oligomierzustand von untersuchten Proteinen im nativen Zustand zu bestimmen, wurde die Methode des Blue-Native-Gels nach Schägger angewandt (Schägger and von Jagow, 1991; Wittig *et al.*, 2006). Bei der BN-PAGE werden keine denaturierenden Agentien wie SDS aber auch keine Reduktionsmittel hinzugegeben, damit die native Oligomerform des Proteins erhalten bleibt. Auch werden hier Polyacrylamidgele mit größerer Maschengröße als bei der SDS-PAGE verwendet. Bei BN-PAGE muss das Protokoll auf das jeweils zu untersuchende Protein abgestimmt werden, d.h. für jedes Protein wird die Zusammensetzung, pH und Ionenstärke des Puffers, aber auch die Gelbeschaffenheit variiert. Die Standardzusammensetzung ist im Folgenden angeführt:

Stammlösungen:

Acrylamid 50 %	96 g Acrylamid (49,5 %) 3 g Bisacrylamid (3 %), 100 ml H ₂ O
3 x Gelpuffer	150 mM BisTris-HCl, 200 mM 6-Amino-Caprönsäure, pH 7,0
10 x Ladepuffer	5 % Serva G, 500 mM 6-Amino-Caprönsäure, 100 mM BisTris-HCl, pH 7,0
5 x Anodenpuffer	250 mM BisTris-HCl, pH 7,0
10 x Kathodenpuffer	500 mM Tricin, 150 mM BisTris-HCl, ± 0,02% Serva G, pH wird nicht eingestellt

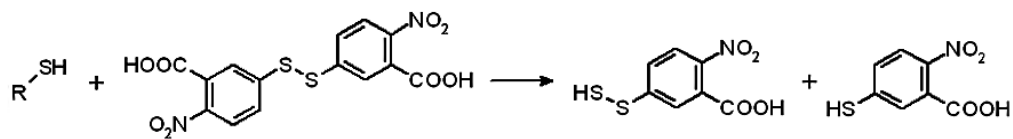
	6 %	13 %	16,5 %	20 %	Sammelgel
3 x Gelpuffer	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	2,5 ml
Acrylamid	1,07 ml	2,35 ml	3,05 ml	3,75 ml	0,6 ml
Glycerol	-	1,8 ml	1,8 ml	1,8 ml	-
10% APS	38 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Temed	3,8 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
Wasser		auf 9 ml Gesamtvolumen auffüllen			auf 7,5 ml auffüllen

Für die Elektrophorese werden 45 µl Proteinlösung mit 5 µl Ladepuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Kathodenpuffer (mit Serva G) wird anschließend vorsichtig eingefüllt, so dass die Proben nicht aus den Taschen gespült werden. Die Elektrophorese wird bei 100 V gestartet und nachdem das Protein durch das Sammelgel gelaufen ist, wird die Spannung auf 500 V erhöht (Laufzeit von 30 Minuten bis zu 5 Stunden). Die Temperatur des Gels soll bei möglichst 4 °C gehalten werden. Nachdem der Ladepuffer ca. die Hälfte des Gels durchwandert hat, wird der Kathodenpuffer durch einen Kathodenpuffer ohne Serva G ersetzt und die Elektrophorese wird so

lange fortgeführt bis der Ladepuffer am unteren Ende des Gels angekommen ist. Gefärbt und entfärbt wird das Gel wie bei SDS-PAGE.

Nachweis zugänglicher Thiolgruppen/Ellman's-Reaktion:

Das Ellman's Reagenz (Ellman, 1959) dient dem quantitativen Nachweis freier, zugänglicher Thiolgruppen durch eine photometrische Messung. Bei der Reaktion des Ellman's Reagenz 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) mit einer Thiolgruppe bildet sich 5-Thio-2-nitrobenzoat, welches bei 412 nm sein Absorptionsmaximum hat.



Die Erstellung einer Eichgerade erfolgt mit Reagenzien bekannter Thiolkonzentration wie z.B. DTT und β -Mercaptoethanol in einem Konzentrationsbereich von 1-20 μM . Für die Reaktion werden zu 50 μl DTNB Lösung (50 μM Natriumacetat, 2 μM DTNB) 100 μl Puffer ($\text{pH} > 8$) und 840 μl H_2O gegeben. Nach Zugabe von 10 μl Proteinlösung wird das Reaktionsgemisch 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 412 nm im Photometer (Ultrospec 1000) gemessen.

Chaperon-Assay/Thermische Aggregation von Citratsynthase:

Das Modellsubstrat Citratsynthase (CS) verliert bei Temperaturen oberhalb 40 $^{\circ}\text{C}$ seine native Struktur. Bei einer Inkubation von CS bei 43 $^{\circ}\text{C}$ führt diese nach 45 Minuten zur Aggregation, welche mit einem UV/Vis-Absorptionsspektrometer oder Fluoreszenzspektrometer verfolgt werden kann.

Alle Aggregationsmessungen wurden bei 360 nm und 43 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Es wurden 100 μl Quarzglas-Küvetten verwendet, die durch einen Wasser-Kryostaten temperiert wurden. Messungen erfolgten sowohl in HEPES als auch PBS und MOPS Puffern verschiedener pH-Werte. Die CS Konzentration wurden bei allen Messungen bei 75 nM konstant gehalten und die Aggregation mit einem Fluoreszenzspektrometer verfolgt.

6.2.2. Biophysikalische Proteinanalytik

Größenausschlußchromatographie (SEC):

Bei der Größenausschlußchromatographie (Gelpermeationschromatographie, *size exclusion chromatography*) werden Proteine entsprechend ihres hydrodynamischen Radius aufgetrennt. Das Prinzip der Trennung beruht auf den unterschiedlichen Retentionszeiten der Proteine in der Säulenmatrix mit unterschiedlichen Porengrößen. Große Proteine können nicht in die feinen Poren der Matrix eindringen und eluieren schneller als kleine Proteine, die insgesamt einen längeren Weg durch die Säule zurücklegen. Vorausgesetzt dass alle Partikel gleichzeitig auf die Säulenmatrix gegeben werden, eluieren Partikel mit demselben hydrodynamischen Radius zur selben Zeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine TosoHaas TSK 4000 PW Säule mit einem Trennbereich von 10-1500 kDa verwendet. Die Proteine wurden über einen Fluoreszenzdetektor (Jasco, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 330 nm detektiert. Zur Kalibrierung wurde ein Standard Molekulargewichtsmarkerkit (Aldolase, Ferritin und Thyroglobulin, Sigma, USA) verwendet.

Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) :

Die analytische Ultrazentrifugation dient zur spektroskopischen (Detektion durch Absorptions-, Interferenz- oder Fluoreszenzmessung) Untersuchung des Sedimentationsverhaltens von Proteinen in einem Zentrifugalfeld. Die Methode liefert Informationen über die Hydrodynamik und Thermodynamik der Makromoleküle in Lösung (Lebowitz *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurde das sogenannte Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment genutzt. Bei diesem Verfahren werden die zu Beginn in Lösung gleichmäßig verteilten Proteinmoleküle bei hoher Drehzahl auf den Boden der Zelle sedimentiert. Hierbei entsteht eine Sedimentationsfront, die in Richtung des Zellbodens wandert und spektroskopisch erfasst wird. Der zeitliche Verlauf der Sedimentationsfront ermöglicht die Berechnung der Sedimentationskoeffizienten, welcher u.A. von der Molekülmasse des Proteins und dem Reibungskoeffizienten des Analyten abhängt. Aus der spezifischen Sedimentationsfront können das Molekulargewicht, der hydrodynamische Radius ermittelt und Heterogenitäten abgeschätzt werden.

Die Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente wurden am Lehrstuhl für Biotechnologie (TUM) in einer Beckman XL-A Ultrazentrifuge mit UV-Detektion (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) mit 500 µl Probe (0,5 mg/ml) bei einer Umdrehungszahl von 30.000 Upm und einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die Daten wurden mit der Software UltraScan oder SedFit (Schuck, 2000) ausgewertet.

Dynamische Lichtstreuung (DLS):

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ermöglicht die Berechnung des hydrodynamischen Radius von Partikeln. Hierbei werden die Intensitätsfluktuationen des Streulichts als Funktion der Zeit gemessen, welche durch die Brownsche Molekularbewegung der Partikel in Lösung verursacht werden. Die zeitliche Änderung der Intensität des Streulichts steht in direkter Beziehung zu Partikelgrößen. Bei bekannter und konstanter Temperatur und Viskosität der Lösung können Diffusionskoeffizienten und somit die hydrodynamischen Radien der Partikel in der Lösung unter bestimmten Annahmen, die die Partikelform berücksichtigen, nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{f} = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta_A \cdot R_h}$$

mit D, Diffusionskoeffizient; k_B , Boltzmann-Konstante; T, Temperatur; f, Reibungskoeffizient; η_A , Viskosität der umgebenden Flüssigkeit und R_h , hydrodynamischer Radius.

In dieser Arbeit wurden Messungen an Sip-1 an einem ALV/CGS-8 Instrument mit einem digitalen Autokorrelator (ALV/5000/6010) im „single cross-correlation“ Modus durchgeführt. Als Lichtquelle wurde ein He-Ne Laser bei 632,8 nm verwendet. Spektren wurden mit einem Paar von Photomultiplier-Modulen (SPCM-CD2969, Perkin-Elmer) aufgenommen. Die Datenanalyse erfolgte wie oben beschrieben. Die Partikelgrößen wurde durch die Autokorrelationsfunktion durch Provencher's regulierter Laplace Inversion CONTIN (Provencher, 1982) erhalten. Die Formfaktoren wurden als harte Kugeln angenommen.

Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse (TRFA):

Die Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse (TRFA oder TXRF) ist eine energiedispersive Multielementmethode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Mikroproben (< 100 µg). Bei der TXRF Messung trifft ein Röntgenstrahl unter einem sehr

flachen Winkel ($0,1^\circ$) auf eine polierte Ebene, die einen getrockneten dünnen Probenfilm trägt, und wird dabei totalreflektiert. Die Probenatome werden durch den Röntgenstrahl angeregt, wobei beim Überschreiten der Bindungsenergien Elektronen aus den inneren Schalen herausgeschlagen werden. Diese Lücken werden durch Elektronen aus den äußeren Schalen wieder besetzt. Dadurch wird ein Röntgenphoton frei, welches als elementspezifische Röntgenfluoreszenz detektiert werden kann. Die Detektion erfolgt durch einen senkrecht angebrachten Si(Li)-Detektor. Die Absolutnachweisgrenzen liegen für alle Elemente schwerer als Chlor im Bereich von 1 bis 10 pg.

Die Messungen erfolgten im Arbeitskreis Prof. Schuster (Fakultät für Chemie, TUM) in einem TRFA-Gerät 8010 mit einem Si(Li)-Detektor und einer Molybdän-Röhre bei 50 kV und 40 mA als Anregungsquelle (Atomika, Oberschleißheim, Deutschland). Das Gerät ist in einem Laminarflowbox (Krause, Bad Hersfeld) eingebettet, um 99,99 % aller Partikel ($> 0,5 \mu\text{m}$) aus der Luft herauszufiltern. Die Messzeit einer Probe betrug 300 s. Zur Quantifizierung wurde der Eichstandard Ammoniumvanadat ($10 \mu\text{l}$) auf $990 \mu\text{l}$ Probenvolumen zugegeben. $1 \mu\text{l}$ der vermischten Lösung wurde auf ein 6-Zoll Si-Wafer (Silchem, Freiberg, Deutschland) aufgetragen, eingedampft und anschließend vermessen.

6.2.3. Transmissionselektronenmikroskopie

Negativ Kontrastierung (Ohi *et al.*, 2004) – Kupfernetzchen mit einem kontinuierlichen Kohlefilm wurden in einer Bal-Tec SCD005 Sputteranlage für 30 Sekunden bei 3-5 mA hydrophilisiert und danach für mindestens 15 Minuten stehen gelassen. $5 \mu\text{l}$ einer Proteinlösung (0,01 - 0,2 mg/ml) wurden auf einen Parafilm pipettiert und das kohlebeschichtete Kupfernetzchen wurde auf den Tropfen gelegt. Das Netzchen wurde nach einer Minute Adsorptionszeit entfernt, überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgezogen und unverzüglich danach für 30 Sekunden auf $5 \mu\text{l}$ des Kontrastmittels (Uranylacetat, Ammoniummolybdat oder Phosphorwolframsäure, je 2% w/v) gelegt. Nach 30 Sekunden wurde der Überschuss am Kontrastmittel entfernt und das Netzchen in einer Petrischale auf einem Filterpapier getrocknet.

Kryo-Präparation – Für die Präparation für Kryo-EM wurden $3 \mu\text{l}$ der zu untersuchenden Proteinlösung (Proteinkonzentration ca. 0,2 mg/ml) auf unmittelbar vorher beglimmte Kohle-Lochfolien (R 2/2, R 2/1 oder Multi A Quantifoil-Netzchen, Quantifoil, Deutschland) aufgebracht. Nach ~ 5 s wurde die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt, so dass das Netzchen nur noch von einem hauch-

dünnen Flüssigkeitsfilm benetzt wurde. Die Probe wurde dann durch Einschließen in flüssiges Ethan bei -180 °C kryofixiert, i.e. vitrifiziert. Dazu wurde entweder die Kryojet-Einrichtung Vitrobot Mark III (FEI, Niederlande) oder eine sogenannte Guillotine (EMBL, Deutschland) benutzt. Anschließend wurde das Netzchen im flüssigen Stickstoff in einen auf -170 °C gekühlten Kryohalter der Firma Gatan (Deutschland) transferiert und möglichst schnell in das TEM eingeführt, um Kontamination der Probe durch die Kondensation der Luftfeuchtigkeit zu vermeiden. Die Präparation erfolgte in einem auf 21 °C klimatisiertem Raum mit variabler Luftfeuchtigkeit.

Abbildung – Negativ kontrastierte Präparate wurden an einem JEOL JEM 100CX TEM, das mit einer Wolfram-Kathode ausgestattet ist, bei 100 KV und 50.000facher Vergrößerung analysiert. Aufnahmen erfolgten auf Kodak SO-163 Negativ-Filmen (Interfoto, Deutschland) bei einem Defokus von 300–1.200 nm. Die Entwicklung der Negative erfolgte nach Herstellerangaben.

Für Kryo-EM wurden vitrifizierte Proben in einem Kryohalter der Firma Gatan (Deutschland) in das Kryo-TEM JEOL JEM 2011 transferiert, das mit einer LaB₆ Kathode ausgestattet war und bei 120 kV betrieben wurde. Um Strahlenschäden während der Beobachtung möglichst zu minimieren, wurde die im Mikroskop implementierte Methode „Minimum Exposer Operation (MDS)“ genutzt. Hierbei wurde zunächst bei geringer Vergrößerung (10.000fach) eine geeignete Präparatstelle, d.h. eine möglichst dünne Eisschicht in einem Loch des Kohlefilms, gesucht (Search). Die Fokuseinstellung erfolgte bei einer höheren Vergrößerung (50.000fach) und an einer anderen Präparatstelle, die ca. 1-2 μm entfernt von der Stelle lag, an der die Aufnahme getätigt werden sollte („Focus“). Nach Einstellung des Fokus wurde der Elektronenstrahl zu der Präparatstelle zurückgelenkt, an der die Aufnahme erfolgte („Photo set“). Die Negative wurden auf Kodak SO-163 in einem Defokusbereich von 800 -2.500 nm aufgenommen.

6.2.4. Bildverarbeitung und 3D-Rekonstruktion

Für Bildverarbeitung geeignete Negative wurden mit einem Flextight X5 Scanner (Hasselblad, Schweden) bei einer Pixelgröße von $8,5\ \mu\text{m}$ digitalisiert.

Vorbereitung der Datensätze – Aus den digitalisierten Bilder wurden die Einzelpartikel semi-automatisch mit dem Programm Boxer des EMAN Softwarepakets (Ludtke

et al., 1999; 2001) ausgewählt und in Boxen mit einer Größe von 200 bis 300 Pixeln ausgeschnitten. Dieses Softwarepaket wurde auch zur Bestimmung des Defokus, sowie zur Korrektur der Phase und des Astigmatismus verwendet (Programm CTFIT). Die weitere Bildverarbeitung erfolgte mit dem Programm IMAGIC (van Heel, 1979; van Heel and Keegstra, 1981; van Heel *et al.*, 1996). Alle Einzelbilder aus einem Experiment wurden in einem Bilderstapel zusammengefasst. Die Bilder wurden dann normalisiert und einem Bandpass-Filter unterzogen (Negativ Kontrastierung: zwischen 15 Å und 300 Å; Kryo-EM: zwischen 5 Å und 300 Å).

Multivariate Statistische Analyse (MSA) – Multivariate statistische Analyse (MSA) und Klassifizierung (van Heel & Frank, 1981; van Heel, 1984) wurde am kompletten Datensatz des jeweiligen Experiments durchgeführt. Eulerwinkel von dominanten Projektionen wurden entweder iterativ oder mittels „angular reconstitution“ (van Heel, 1987; van Heel *et al.*, 2000) über „common lines“ ermittelt. Symmetrien wurden nur dann eingeführt, wenn sie in den Projektionen eindeutig zu erkennen waren.

Drei-dimensionale (3D) Rekonstruktion – 3D-Rekonstruktionen wurden mittels „exact filtered back projections“ (Radermacher, 1988) berechnet. Aus den ersten Modellen wurden mittels Rückprojektionen innerhalb der asymmetrischen Einheit Referenzen ermittelt (Schatz *et al.*, 1995), die für die Multireferenzalignierung (MRA) des Datensatzes verwendet wurden. Nach weiteren MSA- und Klassifizierungsschritten konnten teilweise mehrere unterschiedliche 3D-Modelle in einem Datensatz berechnet werden. Jedes Modell wurde als neue Referenz für eine neue Verfeinerung genutzt. Die Iterationen wurden beendet, wenn die Klassenmittelungsbilder und die 3D Rekonstruktionen konvergierten.

Bestimmung der Auflösung – Die Auflösung der Rekonstruktion wurde mittels der Fourier Shell Correlation (FSC) (van Heel and Schatz, 2005), eine Erweiterung der Fourier Ring Correlation, überprüft. Hierzu wurde der Datensatz in zwei Hälften geteilt und aus jeder Hälfte eine 3D-Rekonstruktion erstellt. Anschließend wurde die Übereinstimmung der beiden unabhängigen Rekonstruktionen als Funktion der Raumfrequenzen, i.e. die Kreuzkorrelationskoeffizienten (cross-correlation coefficients, CCC)“ der Volumina in korrespondierenden Schalen im Fourierraum verglichen. Der Wert, bei dem die FSC unter 0,5 fiel, wurde als Auflösung der Rekonstruktion angenommen (FSC 0,5-cut-off-Kriterium).

Die in dieser Arbeit angewandten Standardprozeduren für die Bildverarbeitung sind in den Abbildungen 68 und 69 vereinfacht und schematisch dargestellt.

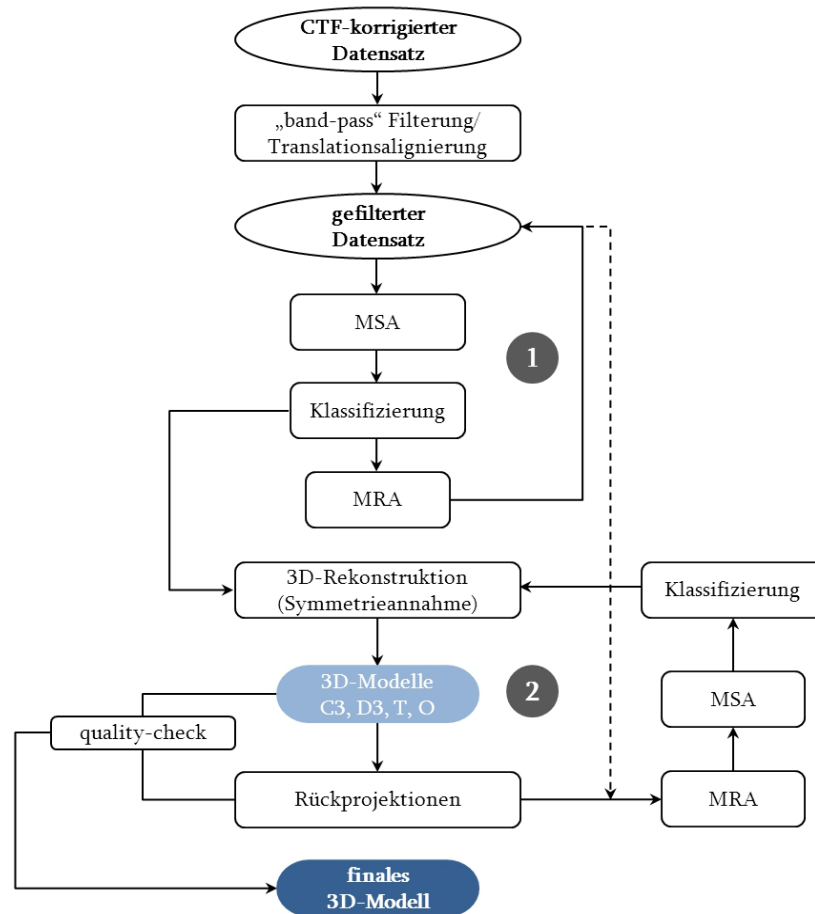


Abb. 68: Standardprozedur, die in dieser Arbeit bei der 3D-Rekonstruktion von allen sHsps bis auf Sip-1 angewandt wurde.

In der in Abbildung 68 gezeigten Vorgehensweise, die auf alle untersuchten sHsps bis auf Sip-1 angewandt wurde, wurde in einem ersten Schritt der CTF-korrigierte Datensatz einer „band-pass“-Filterung unterzogen und translationsaligniert. Dieser gefilterte Datensatz wurde dann einer ersten MSA unterzogen, wobei die dabei erhaltenen Varianzen für eine erste Klassifizierung benutzt wurden. Aus den ersten Klassenmittelungsbildern wurden charakteristische Bilder extrahiert und in einem anschließenden Schritt als Referenzen für eine MRA des gefilterten Datensatzes verwendet. Der neue Datensatz wurde erneut einer MSA und Klassifizierung unterzogen. Diese Schritte wurden so lange wiederholt (Schleife 1), bis in den Klassenmittelungsbildern keine Änderungen mehr zu beobachten waren. Mit den so erhaltenen Klassenmittelungsbildern wurde dann ein erstes 3D-Modell (oder erste 3D-Modelle) erstellt. Aus diesem 3D-Modell wurden Rückprojektionen berechnet, die als Referenzen für eine folgende MRA des gefilterten Datensatzes dienten. Nach einer weiteren MSA/Klassifizierung wurde ein zweites 3D-Modell berechnet, mit

dessen Rückprojektionen der Datensatz erneut aligniert und einer weiteren MSA/Klassifizierung unterzogen wurde. Diese Schritte wurden so lange wiederholt (Schleife 2), bis keine Verbesserung des 3D-Modells zu erkennen war. Die „Qualitätskontrolle“ der Modelle erfolgte durch den Vergleich der für die 3D-Rekonstruktion verwendeten Klassenmittelungsbilder mit den Rückprojektionen des jeweiligen 3D-Modells sowie durch dessen Auflösung. Das finale 3D-Modell wurde erhalten, wenn die Klassenmittelungsbilder keine Veränderungen mehr zeigten und die Auflösung einen finalen Wert erreichte.

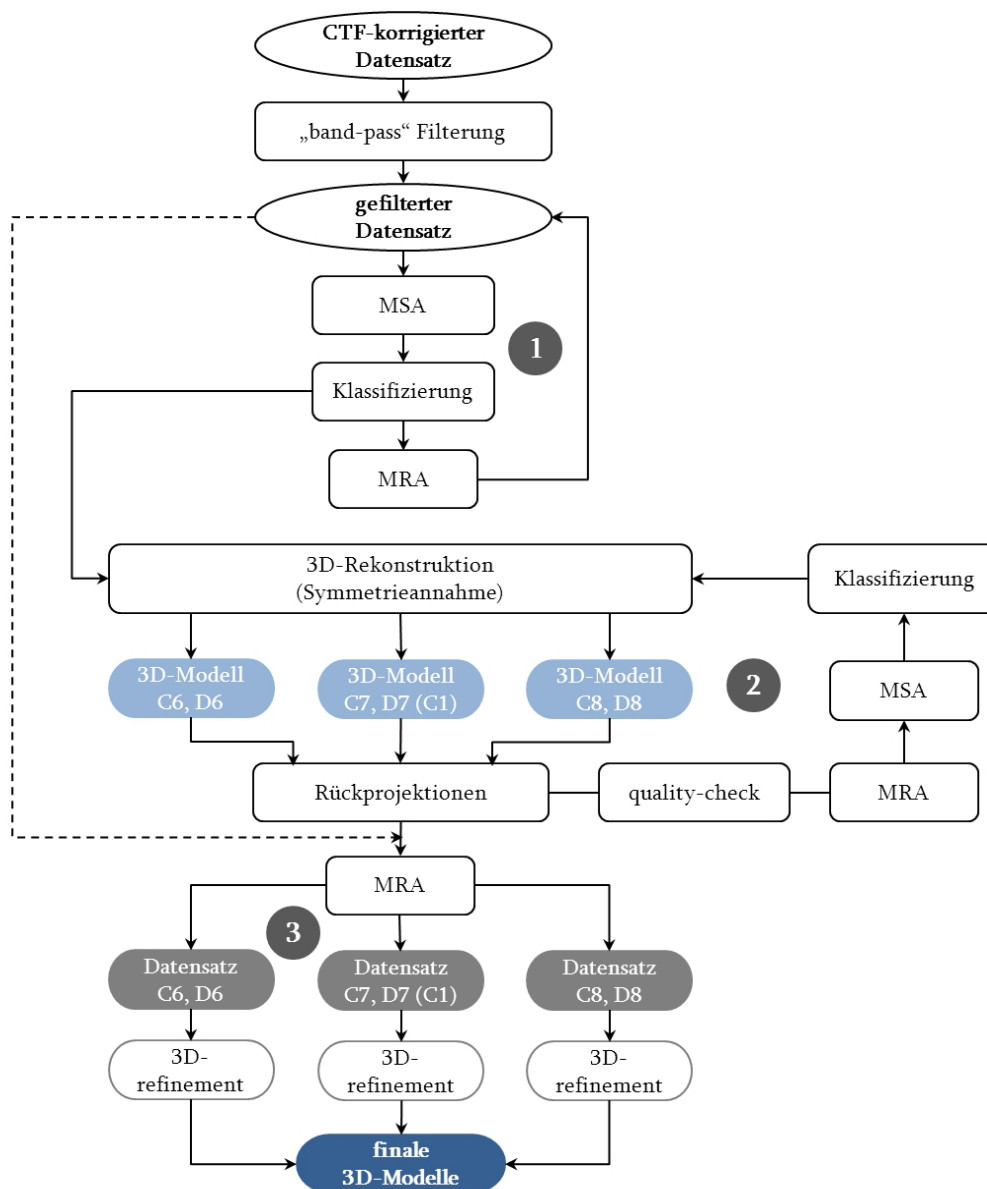


Abb. 69: Standardprozedur, die in dieser Arbeit bei der 3D-Rekonstruktion von Sip-1 angewandt wurde.

Die Bildverarbeitung bei Sip-1 erfolgte nach einem ähnlichen Schema (Abb. 69). Jedoch wurde hier auf die Translationsalignierung im ersten Schritt verzichtet, sie wurde während den MRA-Schritten durchgeführt. Die ersten erhaltenen 3D-Modelle wurden alle gemeinsam in mehreren MRA/MSA/Klassifizierungszyklen verfeinert, bis keine Verbesserung mehr zu erkennen war. Anschließend wurde der Datensatz anhand dieser Modelle getrennt und einzeln so lange iterativ verfeinert, bis sich keine Verbesserung mehr einstellte. Die so erhaltenen Modelle ergaben die finalen 3D-Modelle.

Die Darstellung der 3D-Rekonstruktionen erfolgte mit dem Programm Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

6.2.5. Strukturmodellierung und Fitting

Sekundärstrukturvorhersage und Tertiärstrukturmodellierung von Sip-1 wurde mit den Strukturvorhersage-Servern PHYRE (Kelley and Sternberg, 2009) und SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009) durchgeführt.

Sip-1 Dimere wurden mittels Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) anhand der Strukturen von α -Kristallin-Domänen-Dimer des α B-Kristallins (pdb id: 2KLR) und von MjHsp16.5 (pdb id: 1SHS) als Schablone erstellt.

Für das Fitten von der dimeren α -Kristallin-Domänenstruktur in die EM-Dichtekarte mittels Chimera wurden die Strukturen des α B-Kristallins (α -Kristallin-Domänen-dimer, NMR, pdb id: 2KLR) sowie des MjHsp16.5 (Röntgenstruktur, pdb id: 1SHS) benutzt. Hierbei wurde die am steilsten ansteigende lokale Optimierung genutzt. Die atomaren Koordinaten wurden abwechselnd durch Rotation und Translation in immer kleineren Schritten in die EM-Dichte eingepasst. Für das Fitten wurde alternativ das Programmpaket Situs (Wriggers, 2010) benutzt.

7. Zusammenfassung

Kleine Hitzeschockproteine (small heat shock proteins, sHsps), eine schnell induzierbare Subfamilie der molekularen Chaperone, kommen in allen drei Domänen des Lebens vor. Sie werden sowohl unter Stress- als auch unter physiologischen Bedingungen exprimiert. Sie steuern *in vivo* zur Hitzetoleranz bei, indem sie bei erhöhten Temperaturen partiell entfaltete Proteine komplexieren und vor Aggregation schützen, bis diese von ATP-abhängigen Chaperonen rückgefaltet und dem Zellzyklus zugeführt werden. Einige Vertreter der sHsps sind unter physiologischen Bedingungen aktiv und helfen manche ständige Zellfunktionen aufrecht zu erhalten, andere werden durch Stressfaktoren in ihren aktiven Zustand überführt. Das wahrscheinlich auffälligste Charakteristikum der sHsps ist ihre Assemblierung in große, (meist) sphärisch aufgebaute, dynamische und polydisperse Oligomere aus 12 oder 24, manchmal aber auch bis zu 40 Untereinheiten, wobei der Grad der Polydispersität der Oligomere für verschiedene Vertreter unterschiedlich zu sein scheint. Die Heterogenität von sHsps stellt eine nahezu unüberwindbare Hürde für eine Strukturanalyse mittels Röntgenkristallographie dar. Daher sind die Strukturen bzw. Assemblierungsprinzipien nur für wenige Vertreter bekannt, die weitgehend monodisperse Oligomere mit definierter Stöchiometrie bilden, während die polydispersen sHsps diesbezüglich noch nicht charakterisiert sind. Folglich sind auch die strukturellen Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede zwischen sHsps eines Organismus bzw. von verschiedenen Organismen nicht genügend verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige sHsps aus verschiedenen Eukaryoten mittels Negativ Kontrastierung bzw. Kryo-Elektronenmikroskopie in Kombination mit Einzelpartikel-Rekonstruktionstechniken untersucht, da diese Methoden die Möglichkeit bieten, heterogene Molekülpopulationen in (weitgehend) homogene Subpopulationen zu trennen. Zu den untersuchten Proteinen gehörten Hsp20, Hsp21, Hsp28, Hsp29, Hsp30 aus *Toxoplasma gondii*, Hsp16.11, Hsp16.2, Hsp16.41, Hsp16.48, Sip-1 aus *Caenorhabditis elegans* sowie α A- und α B-Kristallin aus *Homo sapiens*.

Alle *T. gondii* sHsps (Hsp20, Hsp21, Hsp28, Hsp29, Hsp30) erschienen auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen als weitgehend globuläre Oligomere mit Durchmessern zwischen 9 nm und 18 nm, wobei verschiedene Vertreter unterschiedlich ausgeprägte Heterogenitäten zeigten. Sowohl diese Größenvariabilität als auch die Ergebnisse aus unabhängigen biophysikalischen Methoden deuteten auf ein Gleichgewicht von Oligomerformen mit unterschiedlichen Stöchiometrien und mit vari-

ablen und dynamischen Quartärstrukturen. Auf Grund der fehlenden Detailinformationen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten jedoch für *T. gondii* sHsps keine 3D-Rekonstruktionen erstellt werden.

Eine Korrelation der aus der Literatur bekannten Daten zu Untereinheiten-Austauschkinetiken mit den elektronenmikroskopisch ermittelten Struktureigenschaften zeigte, dass diejenigen *T. gondii* sHsps mit den höchsten Austauschraten, nämlich das Hsp29 und das Hsp30, Oligomerpopulationen mit den höchsten Polydispersitäten bilden. Auffällig dabei war ausserdem, dass Hsp30 mit dem geringsten α -Helix-Anteil (8 %) die schnellste Austausch-Kinetik ($t_{1/2}$ ca. 60 s) zeigt, was vermuten liess, dass die Determinanten des Untereinheiten-austauschs bzw. der Polydispersität in der Aminosäuresequenz liegen könnte. Die Proteine Hsp20, Hsp21 und Hsp28 mit geringeren Untereinheiten-Austauschraten bildeten weniger heterogene Populationen.

Die sHsps aus der erweiterten Hsp16 Proteinfamilie von *C. elegans*, Hsp16.11, Hsp16.2, Hsp16.41, Hsp16.48, und Sip-1 zeigten auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ebenso heterogene Oligomere. Während jeweils die Paarungen Hsp16.11/Hsp16.2 und Hsp16.41/-Hsp16.48 sich in vielen Hinsichten ähnlich verhielten, zeigte Sip-1 sowohl strukturell als auch funktionell einige Besonderheiten.

Die sphärischen Oligomere von Hsp16.2 und Hsp16.11, welche zu 93 % sequenzidentisch sind, zeigten die größte Heterogenität und variierten bei Raumtemperatur im Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm. Bei beiden Proteinen deutete die Bildverarbeitung auf gering strukturierte Partikel hin. Eine Analyse der jeweiligen Hauptpopulationen mit Durchmessern zwischen 13 nm und 15 nm (ca. 20 % aller Partikel) ergab zwar etwas strukturiere Klassenmittelungen, jedoch konnten ihre Orientierungen nicht eindeutig bestimmt werden, so dass für beide Proteine keine zuverlässigen 3D-Rekonstruktionen erstellt werden konnten. Dennoch belegten die elektronenmikroskopischen Analysen deutlich, dass auch Hsp16.11 und Hsp16.2 in einem Gleichgewicht von verschiedenen Oligomerformen mit unterschiedlichen Stöchiometrien existieren. Laut Literatur tauschen sowohl Hsp16.11 als auch Hsp16.2 in Lösung ihre Untereinheiten kontinuierlich und mit ähnlichen Kinetiken aus ($t_{1/2}$ -Werte unterhalb von 100 s). Sie scheinen damit zu sHsps mit hohen Austauschraten und folglich hohen Polydispersitäten zu gehören, wie es auch für das Hsp29 und Hsp30 aus *T. gondii* festgestellt wurde.

Die beiden Vertreter der Hsp16-Subfamilie Hsp16.41 und Hsp16.48 (93 % Sequenzidentität) wiesen eine merklich geringere Heterogenität mit einer Hauptpopulation um 13 nm auf. Damit konnten für Hsp16.41 und Hsp16.48 aus negativ kontrastierten

Einzelpartikeln 3D-Modelle bei einer mittleren Auflösung von ca. 20 Å erstellt werden, während Kryo-EM Daten an Hsp16.41 zu einer 3D-Rekonstruktion bei 13 Å führten. Die aus negativ kontrastierten Einzelpartikeln berechneten 3D-Rekonstruktionen beider Proteine zeigten nahezu sphärische Proteinhüllen (Durchmesser ca. 13 nm), in denen 24 Untereinheiten entsprechend einer Tetraedersymmetrie angeordnet sind. Beide Proteinhüllen enthielten breite Öffnungen und ähnelten sich, bis auf einige geringfügige Unterschiede in der Verteilung der Massen an Positionen der Symmetrieachsen, sehr stark. In beiden 24meren war im Inneren Masse zu erkennen, die mit der äußeren Proteinhülle durch dünne „Stege“ verbunden war. Diese Masse wurde allerdings in der späteren 3D-Rekonstruktion vom Hsp16.41 24mer aus Kryo-EM Daten nicht mehr beobachtet. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Hsp16.41 und Hsp16.48 aus *C. elegans* eine Oligomerarchitektur zeigen, die vielen anderen sHsps gemeinsam ist. Auffallend ist dabei die große strukturelle Ähnlichkeit zu AfHsp20.2 bzw. zu MjHsp16.5, die ebenfalls 24mere bilden.

Die Untersuchungen an Sip-1 führten zu sehr interessanten, allerdings noch nicht in allen Details geklärten Ergebnissen. Die mittels Negativ Kontrastierung ermittelte und durch Kryo-EM bestätigte bzw. verfeinerte Quartärstruktur von Sip-1 unterschied sich von den Strukturen der restlichen *C. elegans* sHsps erheblich: Sip-1 Oligomere zeigten eine Architektur, die dem Aufbau von fassförmigen Hsp16.9 aus Weizen (*Triticum aestivum*) sehr ähnlich ist. Ausserdem wurde festgestellt, dass Sip-1 drei co-existierende Populationen von Oligomeren mit 24, 28 und 32 Untereinheiten bildet, deren Verteilung sich in Abhängigkeit vom pH-Wert ändert. Bei einem pH-Wert von 6,5, bei dem das Protein höchste Aktivität zeigte, überwogen 28mere, während bei einem pH-Wert von 8,5 32mere deutlich stärker populierte waren. Alle drei Oligomere zeigten (pH- und pufferunabhängig) den gleichen Aufbau, nämlich eine Proteinhülle aus einem Doppelring aus jeweils 6 (24mer), 7 (28mer) oder 8 (32mer) Untereinheiten, die einen inneren Hohlraum sowie Öffnungen besitzt. Die hohe Auflösung (ca. 9 Å) der Kryo-EM Rekonstruktion des Sip-1 28mer erlaubte den Versuch, in einer Hybrid-Vorgehensweise seine pseudoatomare Struktur zu modellieren und in die EM-Dichte anzudocken. Dabei wurde festgestellt, dass eine der 3D-Struktur des MjHsp16.5 ähnliche Assemblierung des Sip-1 28mers wahrscheinlich ist.

Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Sip-1, das in seiner Sequenz zwei Cysteine besitzt (Cys5 und Cys54), unter reduzierenden Bedingungen nicht mehr als höheres Oligomer, sondern als Monomer vorliegt, was auch mittels AUZ bestätigt wurde. Dies deutete darauf hin, dass das Protein unter

neutralen und oxidierenden Bedingungen inter- und eventuell auch intramolekulare Disulfidbrücken bildet. Der Verlust von Chaperonaktivität in Anwesenheit von Reduktionsmitteln (Aggregation bzw. co-Aggregation mit dem Substratprotein) zusammen mit der Dissoziation von Oligomeren liess vermuten, dass die Substrataffinität bzw. Chaperonaktivität von Sip-1, wie sein Oligomerisierungsgrad, mit dem Redoxzustand seiner Cysteine direkt korreliert. Allerdings konnte die Frage, ob das Protein ein „redox-reguliertes“ Chaperon darstellt, im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

Bekanntlich existieren humanes α A- und α B-Kristallin in polydispersen Oligomerpopulationen. Aus Arbeiten in unserer Gruppe ist es bekannt, dass die Oligomere mit unterschiedlichen Stöchiometrien sehr ähnliche hydrodynamische Eigenschaften zeigen und damit durch auf Hydrodynamik basierende, integrierende Techniken wie AUZ oder DLS nicht getrennt detektierbar sind. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein erster Versuch unternommen, die Oligomerverteilungen von α A- und α B-Kristallin sowie von drei α B-Kristallin Mutanten mittels Kryo-EM und MRA zu bestimmen und miteinander zu vergleichen.

Die Analysen zeigten, dass α A- und α B-Kristallin ähnliche Oligomerarchitekturen besitzen. In beiden Proteinen waren 12- und 24mere dominant, während in α A-Kristallin auch kleinere (6mere) und größere (36- und 48mere) Oligomere vorhanden waren und damit eine heterogenere Oligomerverteilung vorlag. Bei der α B-Kristallin Tripelmutante S19E/S45E/S59E, bei der die Serinreste an Positionen 19, 45 und 59 (*in vivo* Phosphorylierungsstellen) gegen Glutaminsäure ausgetauscht waren, waren hauptsächlich 6- und 12mere populiert. Dieses Ergebnis bestätigte die räumliche Nähe der drei Serine und die dadurch bedingte Akkumulation von negativen Ladungen in einem kleinen Bereich, was die Bildung von höheren Oligomeren beeinträchtigte. Die beiden Doppelmutanten A4C/H6C und H6C/S19C, bei denen im N-terminalen Bereich Cystein-Reste eingeführt wurden, zeigten vermehrt größere Oligomere (36- bzw. 48mere), was mit der Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken erklärt werden konnte.

8. Summary

Small heat shock proteins (sHsps), a diverse subfamily of molecular chaperones, exist in all domains of life. Many family members are expressed under physiological and stress conditions. *In vivo*, sHsps contribute to thermotolerance by complexing a variety of partially unfolded, non-native proteins and thus preventing their aggregation until their refolding by downstream ATP-dependent chaperone systems. Some members of the sHsp family bind client proteins under physiological conditions and help to maintain cellular functions. Others are shifted into an active, high-affinity binding state only upon stress. The most distinctive characteristic of sHsps is their organization into large, (mostly) spherical, dynamic and polydisperse oligomers commonly consisting of 12 or 24 subunits, however, sometimes of 40 and more subunits. The propensity for heterogeneity appears variable for different members of the sHsp family. The heterogeneity of sHsps renders their structure determination by X-ray crystallography challenging. To date, the structures and assembly principles are known only for few family members which form monodisperse oligomers with distinct stoichiometries while the more polydisperse members are still not characterized. As a result, the functional/structural similarities/differences between sHsps within an organism and between sHsps from different organisms are still not well understood.

In the course of this thesis, the structural properties of several sHsps from different eukaryotic organisms were elucidated using negativ stain- and cryo-electron microscopy in combination with single particle reconstruction techniques as these methods can handle variability in image sets and allow to separate a heterogeneous population into (largely) homogeneous subpopulations. The proteins under study were Hsp20, Hsp21, Hsp28, Hsp29, Hsp30 from *Toxoplasma gondii*, Hsp16.11, Hsp16.2, Hsp16.41, Hsp16.48, Sip-1 from *Caenorhabditis elegans* as well as human α A- und α B-Kristallin.

All *T. gondii* sHsps (Hsp20, Hsp21, Hsp28, Hsp29, Hsp30) appeared on electron micrographs as globular oligomers with diameters ranging from 9 nm to 18 nm, while their levels of heterogeneity differed. Both this immense size variability and results from independent biophysical methods indicated the coexistence of oligomers with different subunit stoichiometries and variable and dynamic quaternary structures. Due to the lack of detailed structure information in projection images, it was not possible to calculate 3D-reconstructions for any of the *T. gondii* sHsps.

A correlation of the literature data on subunit exchange kinetics of *T. gondii* sHsps with their overall structural properties (e.g. heterogeneity) determined by electron microscopy showed that the *T. gondii* sHsps with the highest subunit exchange rates, namely Hsp29 and Hsp30, form the most polydisperse oligomer populations. It was also striking that Hsp30 with the lowest α -helical content (8 %) amongst the *T. gondii* sHsps showed the fastest subunit exchange rates ($t_{1/2}$ approximately 60 s), which gave rise to the (vague) assumption that the determinants of the propensity for subunit exchange and for polydispersity could lie in the amino acid sequence, and in turn, in secondary structure elements. The proteins Hsp20, Hsp21 and Hsp28 with lower subunit exchange rates formed less polydisperse oligomer populations.

The sHsps of the extended Hsp16 protein family of *C. elegans*, Hsp16.11, Hsp16.2, Hsp16.41, Hsp16.48, and Sip-1 appeared on electron micrographs as heterogeneous oligomers as well. While Hsp16.11/Hsp16.2 and Hsp16.41/-Hsp16.48 clustered into pairs due to their similar behaviours in many aspects, Sip-1 displayed structurally and functionally some particular features.

The oligomers of Hsp16.11 and Hsp16.2, spherical in shape, showed the most pronounced heterogeneity. Their diameters varied at room temperature between 8 nm and 20 nm. For both proteins, image processing indicated the lack of detailed structure information in projection images. The class averages obtained upon an initial analysis of the respective “main populations”, i.e. particles with diameters between 13 nm and 15 nm (approximately 20 %), revealed more features. However, as their orientations could not be assigned unequivocally, it was not possible to calculate reliable 3D-reconstructions. Nevertheless, electron microscopic analyses substantiated clearly that Hsp16.11 and Hsp16.2 both exist in an equilibrium of oligomers with different subunit stoichiometries. According to the literature, both proteins exchange in solution their subunits continuously and at similar rates ($t_{1/2}$ -values below 100 s) and thus belong to sHsps with high subunit exchange rates and polydispersity.

The other two members of the Hsp16 subfamily Hsp16.41 and Hsp16.48 (93 % sequence identity) displayed markedly less heterogeneity with an obvious main population containing particles of approximately 13 nm in diameter. As these particles revealed clear structure details, it was possible to establish for Hsp16.41 and Hsp16.48 3D models at approximately 20 Å resolution from negatively stained single particles and for Hsp16.41 a 3D-reconstruction at 13 Å resolution from cryo-EM data.

According to the models obtained from negatively stained single particles, both proteins consist of almost spherical protein shells (diameter approx. 13 nm) in which 24 subunits are arranged according to tetrahedral symmetry. The protein shells contain openings leading into the interior and are almost identical except for small differences in mass distributions at positions of the symmetry axes. Both assemblies accommodate an additional, central density in their cavities which is connected to the outer shell by thin “bridges”. This central mass was not observed in the 3D-reconstruction of Hsp16.41 24mer from cryo-EM data. To sum up, Hsp16.41 and Hsp16.48 from *C. elegans* possess oligomer architectures common to many other sHsps. There is striking structural homology to AfHsp20.2 and MjHsp16.5 which also form symmetric 24mers.

The analyses on Sip-1 led to highly interesting, albeit yet largely unexplained results. The 3D model obtained from negatively stained single particles, later confirmed and refined by cryo-EM, revealed a quaternary structure for Sip-1 which differed from the structures of other *C. elegans* sHsps: according to the reconstruction, Sip-1 assembles into barrel-like oligomers which closely resemble the structure of Hsp16.9 from wheat (*Triticum aestivum*). Moreover, it turned out that Sip-1 exists in three oligomer populations consisting of 24, 28 and 32 subunits and the overall distribution of the oligomers among the three assembly forms changes significantly depending on pH. At a pH of 6.5, at which Sip-1 showed its highest chaperone activity, 24mers were predominant, while at a pH value of 8.5 32mers became more populated. The general assembly pattern of all three oligomer forms was not influenced by pH- or buffer conditions. The assemblies consisted of double rings each containing 6 (24mer), 7 (28mer) and 8 (32mer) subunits, which enclosed a central cavity and possessed windows. The resolution (9 Å) of the 28mer reconstruction from cryo-EM data allowed applying a hybrid approach, during which a homology-modeled pseudoatomic structure for Sip-1 was generated and docked into the EM-density map. The model resembled in many details the assembly pattern of MjHsp16.5.

Biochemical and electron microscopic analyses showed that Sip-1, which possesses two cysteins in its sequence (Cys5 und Cys54), assembles under reducing conditions no longer into higher oligomers, but it exists as monomers, as it was confirmed by analytical ultracentrifugation. This indicated that the protein forms inter- or eventually intramolecular disulfide bridges under neutral and oxidizing conditions. The loss of chaperone activity in the presence of reducing agents (self-aggregation and co-aggregation with client proteins) along with the dissociation of oligomers into

monomers led to the assumption that its substrate affinity and respectively its chaperone activity as well as its oligomeric state directly correlate with the redox state of its cysteins. Nevertheless, the issue, whether Sip-1 is a redox-regulated chaperone, could not be addressed conclusively within this work.

Human α A- und α B-crystallin exist in polydisperse oligomer populations. It is known from studies in our laboratory that the oligomers with different subunit stoichiometries show very similar hydrodynamic properties so that hydrodynamics-based, integrating techniques such as analytical ultracentrifugation or dynamic light scattering fail to discriminate between different oligomer populations. Within this work, a first attempt was made to determine and compare the oligomer distributions of human, recombinant α A- und α B-crystallin as well as of three α B-crystallin mutants by cryo-EM and MRA.

The analysis showed that α A- und α B-crystallin possess very similar oligomer architectures. In both proteins, 12- and 24mers were dominant, while α A-crystallin contained in addition smaller (6mers) and larger (36- and 48mers) oligomers and thus showed higher heterogeneity. In α B-crystallin triple mutant S19E/S45E/S59E, in which the serine residues at positions 19, 45 und 59 (*in vivo* phosphorylation sites) were substituted by glutamic acids, only 6- and 12mers were highly populated. This confirmed the nearby localisation of the three serine residues and indicated that the formation of higher oligomers was largely inhibited by the accumulation of negative charges within a small area. The double mutants A4C/H6C and H6C/S19C with cysteine residues at their N-terminal regions consisted mainly of large oligomers (36- and 48mers) which were possibly stabilized due to the formation of intermolecular disulfide bridges.

Referenzen

- Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J. & McDowell, A. (1984) Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* **308**, 32-36.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J.R. & Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195-201.
- Aquilina J.A., Benesch J.L., Bateman O.A., Slingsby C., Robinson C.V. (2003) Polydispersity of a mammalian chaperone: Mass spectrometry reveals the population of oligomers in α B-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10611-10616.
- Aquilina J.A., Benesch J.L.P., Ding L.L., Yaron O., Horwitz J., Robinson C.V. (2004) Phosphorylation of α B-crystallin alters chaperone function through loss of dimeric substructure. *J. Biol. Chem.* **279**, 28675-28680.
- Aquilina, J.A., Benesch, J.L.P., Ding, L.L., Yaron, O., Horwitz, J. & Robinson, C.V. (2005) Subunit exchange of polydisperse proteins. *J. Biol. Chem.* **280**, 14485-14491.
- Bagn eris, C., Bateman, O.A., Naylor, C.E., Cronin, N., Boelens, W.C., Keep, N.H. & Slingsby, C. (2009) Crystal structures of α -crystallin domain dimers of α B-crystallin and Hsp20. *J. Mol. Biol.* **392**, 1242-1252.
- B arcena, M., Koster, A. (2009) Electron tomography in life science. *Sem. Cell Develop. Biol.* **20**, 920-930.
- Basha, E., Lee, G.J., Breci, L.A., Hausrath, A.C., Buan, N.R., Giese, K.C. & Vierling, E. (2004) The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *J. Biol. Chem.* **279**, 7566-7575.
- Basha, E., Jones, C., Wysocki, V. & Vierling, E. (2010) Mechanistic differences between two conserved classes of small heat shock proteins found in the plant cytosol. *J. Biol. Chem.* **285**, 11489-11497.
- Benesch, J.L.P., Ayoub, M., Robinson, C.V. & Aquilina J.A. (2008) Small heat shock protein activity is regulated by variable oligomeric structure. *J. Biol. Chem.* **283**, 28513-28517.
- Bloemendal H., de Jong WW., Jaenicke R., Lubsen N.H., Slingsby C. & Tardieu A. (2004) Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **86**, 407-485.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **7**, 248-254.
- Braun, N., Zacharias, M., Peschek, J., Kastenm uller, A., Hanzlik, M., Haslbeck, M., Buchner, J. & Weinkauff, S. (2011) Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone α B-crystallin. Manuskript eingereicht.

- Bremer, A., Henn, C., Engel, A., Baumeister, W. & Aeberli, U. (1992) Has negative staining still a place in biomacromolecular electron microscopy? *Ultramicroscopy* **46**, 85-111.
- Brenner, S. (1973) The genetics of behaviour. *Br. Med. Bull.* **29**, 269-271.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Burgess, S.A., Walker, M.L., Thirumurugan, K., Trinick, J. & Knight, P.J. (2004) Use of negative stain and single-particle image processing to explore dynamic properties of flexible macromolecules. *J. Struct. Biol.* **147**, 247-258.
- Burgio, M.R., Kim, C.J., Dow, C.C. & Koretz, J.F. (2000) Correlation between the chaperone-like activity and aggregate size of α -crystallin with increasing temperature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 426-432.
- Carver, J.A., Aquilina, J.A., Truscott, R.J. & Ralston, G.B. (1992) Identification by ^1H -NMR spectroscopy of flexible C-terminal extensions in bovine lens α -crystallin. *FEBS Lett.* **311**, 143-149.
- Carver, J.A., Esposito, G., Schwedersky, G. & Gaestel, M. (1995) ^1H NMR spectroscopy reveals that mouse Hsp25 has a flexible C-terminal extension of 18 amino acids. *FEBS Lett.* **369**, 305-310.
- Cashikar, A.G., Duennwald, M. & Lindquist, S.L. (2005) A chaperone pathway in protein disaggregation: Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J. Biol. Chem.* **280**, 23869-23875.
- Chen, J.Z., Fürst, J., Chapman, M.S. & Grigorieff, N. (2003) Low-resolution structure refinement in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **144**, 144-151.
- Cheng, Y., Wolf, E., Larvie, M., Zak, O., Aisen, P., Grigorieff, N., Harrison, S.C. & Walz, T. (2006) Single particle reconstructions of the transferrin-transferrin receptor complex obtained with different specimen preparation techniques. *J. Mol. Biol.* **355**, 1048-1065.
- Cheng, Y. & Walz, T. (2009) The advent of near-atomic resolution in single-particle electron microscopy. *Ann. Rev. Biochem.* **78**, 723-742.
- Crowther, R.A., DeRosier, D.J. & Klug, A. (1970) The reconstruction of a three dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. *Proc. Roy. Soc. London Series B, Biol. Sci.* **317**, 319-340.
- de Jong, W.W., Caspers, G.-J. & Leunissen, J.A.M. (1998) Genealogy of the α -crystallin-small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.* **22**, 151-162.
- de Miguel, N., Echeverria, P.C. & Angel, S.O. (2005) Differential subcellular localization of members of the *Toxoplasma gondii* small heat shock protein family. *Eukaryot. Cell* **4**, 1990-1997.
- de Miguel, N., Lebrun, M., Heaslip, A., Hu, K., Beckers, C.J., Matrajt, M., Dubremetz, J.F. & Angel, S.O. (2008) *Toxoplasma gondii* Hsp20 is a stripe-arranged chaperone-

- like protein associated with the outer leaflet of the inner membrane complex. *Biol. Cell* **100**, 479-489.
- de Miguel, N., Braun, N., Bepperling, A., Kriehuber, T., Kastenmüller, A., Buchner, J., Angel, S.O. & Haslbeck, M. (2009) Structural and functional diversity in the family of small heat shock proteins from the parasite *Toxoplasma gondii*. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **1793**, 1738-1748.
- Derham, B.K. & Harding, J.J. (1999) α -Crystallin as a molecular chaperone. *Prog. Ret. Eye Res.* **18**, 463-509.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S. & Speer, C.A. (1998) Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 267-299.
- Dubochet, J., McDowell, A., Chang, J., Freeman, R., Lepault, J. & Walter, C. (1983) Electron microscopy of frozen hydrated sections of vitreous ice and vitrified biological samples. *J. Microsc.* **13**, 1-9.
- Echeverria, P.C., Matrajt, M., Harb, O.S., Zappia, M.P., Costas, M.A., Roos, D.S., Dubremetz, J.F. & Angel, S.O. (2005) *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a potential drug target whose expression and subcellular localization are developmentally regulated. *J. Mol. Biol.* **350**, 723-734.
- Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M. & Buchner, J. (1997) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* **16**, 221-229.
- Elad, N., Clare, D. K., Saibil, H.R. & Orlova, E. V. (2008) Detection and separation of heterogeneity in molecular complexes by statistical analysis of their two-dimensional projections. *J. Struct. Biol.* **162**, 108-120.
- Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
- Elmore, S.A., Jones, J.L., Conrad, P.A., Patton, S., Lindsay, D.S. & Dubey, J.P. (2010) *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.* **26**, 190-196.
- Eyles, S.J. & Gierasch, L.M. (2010) Nature's molecular sponges: Small heat shock proteins grow into their chaperone roles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 2727-2728.
- Fabiola, F. & Chapman, M.S. (2005) Fitting of high-resolution structures into electron microscopy reconstruction images. *Structure* **13**, 389-400.
- Fagerholm P.P., Philipson B.T., Lindström B. (1981) Normal human lens - the distribution of proteins. *Exp. Eye Res.* **33**, 615-620.
- Frank, J. (2010) Single-particle reconstruction of biological macromolecules in electron microscopy – 30 years. *Q. Rev. Biophys.* **42**, 139-158.

- Frank, J. (1996) Three dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies. Academic Press, Inc.
- Franzmann, T.M., Wühr, M., Richter, K., Walter, S. & Buchner, J. (2005) The activation mechanism of Hsp26 does not require dissociation of the oligomer. *J. Mol. Biol.* **350**, 1083-1093.
- Giese, K.C., Basha, E., Catague, B.Y. & Vierling, E. (2005) Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein *in vivo*, independent of *in vitro* chaperone activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 18896-18901.
- Gilbert, P.F.C. (1972) The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. II. Direct methods. *Proc. Roy. Soc. London Series B, Biol. Sci.* **182**, 89-102.
- Glaeser, R.M. (2008) Retrospective: Radiation damage and its associated "information limitations". *J. Struct. Biol.* **163**, 271-276.
- Graf, P.C.F., Martinez-Yamout, M., VanHaerents, S., Lilie, H., Dyson, H.J. & Jakob, U. (2004) Activation of the redox-regulated chaperone Hsp33 by domain unfolding. *J. Biol. Chem.* **279**, 20529-20538.
- Graumann, J., Lilie, H., Tang, X., Tucker, K.A., Hoffmann, J.H., Vijayalakshmi, J., Saper, M., Bardwell, J.C.A. & Jakob, U. (2001) Activation of the redox-regulated molecular chaperone Hsp33 – A two-step mechanism. *Structure* **9**, 377-387.
- Haley D.A., Horwitz J., Stewart P.L. (1998) The small heat-shock protein, α B-crystallin, has a variable quarternary structure. *J. Mol. Biol.* **277**, 27-35.
- Haley, D.A., Bova, M.P., Huang, Q.-L., McHaourab, H.S. & Stewart, P.L. (2000) Small heat-shock protein structures reveal a continuum from symmetric to variable assemblies. *J. Mol. Biol.* **298**, 261-272.
- Hannover, A. (1854) Das Mikroskop: Konstruktion und Verwendung, *Historical Science* **18**, Europäischer Hochschulverlag GmbH & Co KG.
- Harris, J.R. & Scheffler, D. (2002) Routine preparation of air-dried negatively stained and unstained specimens on holey carbon support films: a review of applications. *Micron* **33**, 461-480.
- Harting, P., Theile, F.W. (1866) Das Mikroskop. Braunschweig, Friedrich Vieweg und Sohn.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H.E., Chen, S., Saibil, H.R. & Buchner, J. (1999) Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* **18**, 6744-6751.
- Haslbeck, M. (2002) sHsps and their role in the chaperone network. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1649-1657.

- Haslbeck, M., Ignatiou, A., Saibil, H., Helmich, S., Frenzl, E., Stromer, T. & Buchner, J. (2004) A domain in the N-terminal part of Hsp26 is essential for chaperone function and oligomerization. *J. Mol. Biol.* **343**, 445-455.
- Haslbeck, M., Braun, N., Stromer, T., Richter, B., Model, N., Weinkauff, S. & Buchner, J. (2004a) Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **23**, 638-649.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurtner, D. & Buchner, J. (2005) Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 842-846.
- Haslbeck, M., Kastenmüller, A., Buchner, J., Weinkauff, S. & Braun, N. (2008) Structural dynamics of archaeal small heat shock proteins. *J. Mol. Biol.* **378**, 362-374.
- Head, M.W., Corbin, E. & Goldman, J.E. (1994) Coordinate and independent regulation of α B-crystallin and HSP27 expression in response to physiological stress. *J. Cell. Physiol.* **159**, 41-50.
- Hilario, E., Teixeira, E.C., Pedrosa, G.A., Bertolini, M.C. & Medrano, F.J. (2006) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of XAC1151, a small heat-shock protein from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* belonging to the α -crystallin family. *Acta Cryst. F* **62**, 446-448.
- Hockertz, M.K., Clark-Lewis, I. & Candido, E.P.M. (1991) Studies of the small heat shock proteins of *Caenorhabditis elegans* using anti-peptide antibodies. *FEBS Lett.* **280**, 375-378.
- Horwitz J. (2000) The function of α -crystallin in vision. *Sem. Cell Dev. Biol.* **11**, 53-60.
- Horwitz J. (2003) α -crystallin. *Exp. Eye Res.* **76**, 145-153.
- Horwitz J. (2009) α -crystallin: The quest for a homogeneous quaternary structure. *Exp. Eye Res.* **88**, 190-194.
- Hudson, B.P., Quispe, J., Lara-Gonzalez, S., Kim, Y., Berman, H.M., Arnold, E., Ebright, R.H. & Lawson, C.L. (2009) Three-dimensional EM structure of an intact activator-dependent transcription initiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 19830-19835.
- Ito, H., Okamoto, K., Nakayama, H., Isobe, T. & Kato, K. (1997) Phosphorylation of α B-crystallin in response to various types of stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 29934-29941.
- Iwaki, T., Kume-Iwaki, A., Goldman, J.E. (1990) Cellular distribution of alphaB-crystallin in non-lenticular tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 31-39.
- Iwaki, T., Wisniewski, T., Iwaki, A., Corbin, E., Tomokane, N., Tateishi, J. & Goldman, J. (1992). Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions. *Am. J. Pathol.* **140**, 345-356.

- Jehle, S., Rajagopal, P., Bardiaux, B., Markovic, S., Kuhne, R., Stout, J.R., Higman, V.A., Klevit, R.E., van Rossum, B.-J. & Oschkinat, H. (2010) Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of α B-crystallin oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1037-1042.
- Kappe, G., Leunissen, J.A.M. & Jong, W.W. (2002). Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **28**, 1-17.
- Katayama, H., Wang, J., Tama, F., Chollet, L., Gogol, E.P., Collier, R.J. & Fisher, M.T. (2010) Three-dimensional structure of the anthrax toxin pore inserted into lipid nanodiscs and lipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 3453-3457.
- Kato, K., Hasegawa, K., Goto, S. & Inaguma, Y. (1994). Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, Hsp27. *J. Biol. Chem.* **269**, 11274-11278.
- Kelley, L.A. & Sternberg, M.J.E. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protocols* **4**, 363-371.
- Kennaway, C.K., Benesch, J.L.P., Gohlke, U., Wang, L., Robinson, C.V., Orlova, E.V., Saibil, H.R. & Keep, N.H. (2005) Dodecameric structure of the small heat shock protein Acr1 from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **280**, 33419-33425.
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M, Bordoli, L. & Schwede, T. (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research* **37**, D387-D392.
- Kim, K.K., Kim, R. & Kim, S.-H. (1998) Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**, 595-599.
- Kim, R., Kim, K.K., Yokota, H. & Kim, S.-H. (1998a) Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 9129-9133.
- Kiselev, N.A., Sherman, M.B. & Tsuprun, V.L. (1990) Negative staining of proteins. *Elec. Mic. Rev.* **3**, 43-72.
- Knoll, M. & Ruska, E. (1932) Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik A. Hadrons and Nuclei* **78**, 318-339.
- Kokke, B.P., Leroux, M.R., Candido, E.P.M., Boelens, W.C. & de Jong, W.W. (1998) *Caenorhabditis elegans* small heat-shock proteins hsp12.2 and hsp12.3 form tetramers and have no chaperone-like activity. *FEBS Lett.* **433**, 228-232.
- Kosinski, R. & Zaremba, M. (2007) Dynamics of the model of the *Caenorhabditis elegans* neural network. *Acta Phys. Pol. B* **38**, 2201-2210.
- Koteiche, H.A., Chiu, S., Majdoch, R.L., Stewart, P.L. & McHaourab, H.S. (2005) Atomic models by cryo-EM and site-directed spin labeling: Application to the N-terminal region of Hsp16.5. *Structure* **13**, 1165-1171.

- Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M. & Buchner, J. (2010) Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB J.* **24**, 3633-3642.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laganowsky, A., Benesch, J.L.P., Landau, M., Ding, L., Sawaya, M.R., Cascio, D., Huang, Q., Robinson, C.V., Horwitz, J. & Eisenberg, D. (2010) Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. *Prot. Sci.* **19**, 1031-1043.
- Lavoie, J.N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L.A. & Landry, J. (1995) Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 505-516.
- Lebowitz, J., Lewis, M.S. & Schuck, P. (2002) Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Prot. Sci.* **11**, 2067-2079.
- Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R. & Vierling, E. (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* **16**, 659-671.
- Leewenhoek, A. (1677) Observations, Communicated to the Publisher by Mr. Antony van Leewenhoek, in a Dutch Letter of the 9th of Octob. 1676. Here English'd: concerning Little Animals by Him Observed in Rain-Well-Sea. and Snow Water; as Also in Water Wherein Pepper Had Lain Infused. *Phil. Trans.* **12**, 821-831.
- Leroux, M.R., Melki, R., Gordon, B., Batelier, G.R. & Candido, E.P.M. (1997) Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J. Biol. Chem.* **272**, 24646-24656.
- Leroux, M.R., Ma, B.J., Batelier, G., Melki, R. & Candido, E.P.M. (1997a) Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 12847-12853.
- Leschziner, A.E. & Nogales, E. (2007) Visualizing flexibility at molecular resolution: Analysis of heterogeneity in single-particle electron microscopy reconstructions. *Ann. Rev. Biophys. and Biomol. Struct.* **36**, 43-62.
- Linder, B., Jin, Z., Freedman, J.H. & Rubin, C.S. (1996) Molecular characterization of a novel, developmentally regulated small embryonic chaperone from *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **271**, 30158-30166.
- Lindert, S., Stewart, P.L. & Meiler, J. (2009) Hybrid approaches: applying computational methods in cryo-electron microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 218-225.

- Lindquist, S. & Craig, E.A. (1988) The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Gen.* **22**, 631-677.
- Lindner, R.A., Carver, J.A., Ehrnsperger, M., Buchner, J., Esposito, G., Behlke, J., Lutsch, G., Kotlyarov, A. & Gaestel, M. (2000) Mouse Hsp25, a small heat shock protein. The role of its C-terminal extension in oligomerization and chaperone action. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1923-1932.
- Lowe, J., McDermott, H., Pike, I., Spendlove, I., Landon, M. & Mayer, R. (1992). Alpha-B crystallin expression in non-lenticular tissues and selective presence in ubiquitinated inclusion bodies in human disease. *Am. J. Pathol.* **166**, 61-68.
- Ludtke, S.J., Baldwin, P.R. & Chiu, W. (1999) EMAN: Semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J. Struct. Biol.* **128**, 82-97.
- Ludtke, S.J., Jakana, J., Song, J.-L., Chuang, D.T. & Chiu, W. (2001) A 11.5 Å single particle reconstruction of GroEL using EMAN. *J. Mol. Biol.* **314**, 253-262.
- Mehlen, P. & Arrigo, A.-P. (1994) The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localization and levels of oligomerization. *Eur. J. Biochem.* **221**, 327-334.
- Mellwig, C. & Böttcher, B. (2001) Dealing with particles in different conformational states by electron microscopy and image processing. *J. Struct. Biol.* **133**, 214-220.
- Mitra, K. & Frank, J. (2006) Ribosome dynamics: Insights from atomic structure modeling into cryo-electron microscopy maps. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 299-317.
- Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E. & Bukau, B. (2003) Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol. Microbiol.* **50**, 585-595.
- Narberhaus, F. (2002) Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing mini-chaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 64-93.
- Nicholson, W., Glaeser, R. (2001) Review: Automated particle detection in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **133**, 90-101.
- Nishikawa, Y., Quittnat, F., Stedman, T. T., Voelker, D.R., Choi, J.-Y., Zahn, M., Yang, M., Pypaert, M., Joiner, K.A. & Coppens, I. (2005) Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular Toxoplasma. *Cell. Microbiol.* **7**, 849-867.
- Nover, L. & Scharf, K.D. (1997) Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 80-103.
- Ohi, M., Li, Y., Cheng, Y. & Walz, T. (2004) Negative staining and image classification - powerful tools in modern electron microscopy. *Biol. Procedures Online* **6**, 23-34.

- Penczek, P.A., Yang, C., Frank, J. & Spahn, C.M.T. (2006) Estimation of variance in single-particle reconstruction using the bootstrap technique. *J. Struct. Biol.* **154**, 168-183.
- Peschek, J., Braun, N., Franzmann, T.M., Georgalis, Y., Haslbeck, M., Weinkauff, S. & Buchner, J. (2009) The eye lens chaperone alpha-crystallin forms defined globular assemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 13272-13277.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. & Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605-1612.
- Piersing, W. (2009) Mikroskop und Mikroskopie - Ein wichtiger Helfer auf vielen Gebieten, GRIN Verlag.
- Poulain, P., Gelly, J.-C. & Flatters, D. (2010) Detection and architecture of small heat shock protein monomers. *PLoS One* **5**, e9990.
- Provencher, S. W. (1982) CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Comp. Phys. Comm.* **27**, 229-242.
- Radermacher, M. (1988) Three-dimensional reconstruction of single particles from random and non-random tilt series. *J. Elec. Mic. Tech.* **9**, 359-394.
- Reichow, S., Gonen, T. (2009) Lipid-protein interactions probed by electron crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 560-565.
- Renkawek K., de Jong W.W., Merck K.B., Frenken C.W., van Workum F.P., Bosman, G.J. (1992) α B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol.* **83**, 324-327.
- Renkawek K., Voorter, C.E., Bosman G.J., van Workum F.P., de Jong W.W. (1994) Expression of α B-crystallin in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **87**, 155-160.
- Richter, K., Haslbeck, M. & Buchner, J. (2010) The heat shock response: Life on the verge of death. *Mol. Cell* **40**, 253-266.
- Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protocols* **5**, 725-738.
- Ruska, E. (1987) The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Rev. Mod. Phys.* **59**, 627-638.
- Russnak, R.H., Jones, D. & Candido, E.P.M. (1983) Cloning and analysis of cDNA sequences coding for two 16 kilodalton heat shock proteins (hsps) in *Caenorhabditis elegans*. Homology with the small hsps of *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **11**, 3187-3205.
- Sanz-García, E., Stewart, A.B. & Belnap, D.M. (2010) The random-model method enables ab initio 3D reconstruction of asymmetric particles and determination of particle symmetry. *J. Struct. Biol.* **171**, 216-222.

- Schatz, M., Orlova, E.V., Dube, P., Jäger, J. & van Heel, M. (1995) Structure of *Lumbricus terrestris* hemoglobin at 30 Å resolution determined using angular reconstitution. *J. Struct. Biol.* **114**, 28-40.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.
- Schlesinger, M.J. (1990) Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 12111-12114.
- Schuck, P. (2000) Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophys. J.* **78**, 1606-1619.
- Siezen R.J., Bindels J.G., Hoenders H.J. (1978) The quaternary structure of bovine α -crystallin. Size and charge microheterogeneity: more than 1000 different hybrids? *Eur. J. Biochem.* **91**, 387-396.
- Skouri-Panet, F., Quevillon-Cheruel, S., Michiel, M., Tardieu, A. & Finet, S. (2006) sHSPs under temperature and pressure: The opposite behaviour of lens alpha-crystallins and yeast HSP26. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins & Proteomics* **1764**, 372-383.
- Stamler, R., Kappé, G., Boelens, W. & Slingsby, C. (2005) Wrapping the α -crystallin domain fold in a chaperone assembly. *J. Mol. Biol.* **353**, 68-79.
- Stengel, F., Baldwin, A.J., Painter, A.J., Jaya, N., Basha, E., Kay, L.E., Vierling, E., Robinson, C.V. & Benesch, J.L.P. (2010) Quaternary dynamics and plasticity underlie small heat shock protein chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 2007-2012.
- Stewart, P.L., Fuller, S.D. & Burnett, R.M. (1993) Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J.* **12**, 2589-2599.
- Stirling, P., Lundin, V. & Leroux, M. (2003) Getting a grip on non-native proteins. *EMBO Reports* **4**, 565-570.
- Stringham, E.G., Dixon, D.K., Jones, D. & Candido, E.P.M. (1992) Temporal and spatial expression patterns of the small heat shock (*hsp16*) genes in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **3**, 221-233.
- Stromer, T., Ehrnsperger, M., Gaestel, M. & Buchner, J. (2003) Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 18015-18021.
- Tardieu A. (1998) α -Crystallin quaternary structure and interactive properties control eye lens transparency. *Int. J. Biol. Macromol.* **22**, 211-217.
- Tatar, M., Bartke, A. & Antebi, A. (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* **299**, 1346-1351.

- Treweek, T.M., Rekas, A., Walker, M.J. & Carver, J.A. (2010) A quantitative NMR spectroscopic examination of the flexibility of the C-terminal extensions of the molecular chaperones, α A- and α B-crystallin. *Exp. Eye Res.* **91**, 691-699.
- Thuman-Commike, P. (2001) Single particle macromolecular structure determination via electron microscopy. *FEBS Letters* **505**, 199-205.
- van Heel, M. G. (1979) Imagic and its results. *Ultramicroscopy* **4**, 117-117.
- van Heel, M. & Frank, J. (1981) Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy* **6**, 187-194.
- van Heel, M. & Keegstra, W. (1981) IMAGIC: A fast, flexible and friendly image analysis software system. *Ultramicroscopy* **7**, 113-129.
- van Heel, M. (1984) Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules). *Ultramicroscopy* **13**, 165-183.
- van Heel, M. (1987) Angular reconstitution: *a posteriori* assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy* **21**, 111-123.
- van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E.V., Schmidt, R. & Schatz, M. (1996) A new generation of the IMAGIC image processing system. *J. Struct. Biol.* **116**, 17-24.
- van Heel, M., Gowen, B., Matadeen, R., Orlova, E.V., Finn, R., Pape, T., Cohen, D., Stark, H., Schmidt, R., Schatz, M. & Patwardhan, A. (2000) Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Quart. Rev. Biophys.* **33**, 307-369.
- van Heel, M. & Schatz, M. (2005) Fourier shell correlation threshold criteria. *J. Struct. Biol.* **151**, 250-262.
- van Montfort, R.L.M., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C. & Vierling, E. (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8**, 1025-1030.
- Vierling, E. & Kimpel, J.A. (1992) Plant responses to environmental stress. *Curr. Opin. Biotech.* **3**, 164-170.
- Wade, R. H. (1992) A brief look at imaging and contrast transfer. *Ultramicroscopy* **46**, 145-156.
- Wadsworth, W.G. & Riddle, D.L. (1988) Acidic intracellular pH shift during *Caenorhabditis elegans* larval development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 8435-8438.
- Walter, S. & Buchner, J. (2002) Molekulare Chaperone: zelluläre Maschinen für die Proteinfaltung. *Angew. Chem.* **114**, 1142-1158.
- Waters, E. & Rioflorido, I. (2007) Evolutionary analysis of the small heat shock proteins in five complete algal genomes. *J. Mol. Evol.* **65**, 162-174.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M.L. & Barton, G.J. (2009) Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189-1191.

- Weinfurtner, D.M. (2008) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung einer Familie kleiner Hitzeschockproteine. Dissertation, Technische Universität München.
- Weiss, L. M., Laplace, D., Takvorian, P., Tanowitz, H.B. & Wittner, M. (1996) The association of the stress response and *Toxoplasma gondii* bradyzoite development. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**, 120S.
- White, H.E., Saibil, H.R., Ignatiou, A. & Orlova, E.V. (2004) Recognition and separation of single particles with size variation by statistical analysis of their images. *J. Mol. Biol.* **336**, 453-460.
- White, H.E., Orlova, E.V., Chen, S., Wang, L., Ignatiou, A., Gowen, B., Stromer, T., Franzmann, T.M., Haslbeck, M., Buchner, J. & Saibil, H.R. (2006) Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. *Structure* **14**, 1197-1204.
- Winter, J., Ilbert, M., Graf, P.C.F., Özcelik, D. & Jakob, U. (2008) Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* **135**, 691-701.
- Wittig, I., Braun, H.-P. & Schagger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat. Protocols* **1**, 418-428.
- Wolkow, C.A. (2002) Life span: getting the signal from the nervous system. *Trends Neurosci.* **25**, 212-216.
- Wood, Z.A., Poole, L.B., Hantgan, R.R. & Karplus, P.A. (2002) Dimers to doughnuts: Redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* **41**, 5493-5504.
- Wriggers, W. (2010) Using Situs for the integration of multi-resolution structures. *Biophys. Rev.* **2**, 21-27.
- Zierold, K. (1995) Mikroskopie in Forschung und Praxis, GIT Verlag.
- Zhou, H. (2008) Towards atomic resolution structural determination by single-particle cryo-electron microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 218-228.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Andreas Kastenmüller, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt. Teile dieser Arbeit wurde in wissenschaftlichen Journalen veröffentlicht.

Garching, August 2011

Publikationen

- Haslbeck M., **Kastenmüller A.**, Buchner J., Weinkauff S. & Braun N. (2008) Structural dynamics of archaeal small heat shock proteins. *J. Mol. Biol.* **378**, 362-374.
- de Miguel N., Braun N., Bepperling A., Kriehuber T., **Kastenmüller A.**, Buchner J., Angel S.O. & Haslbeck M. (2009) Structural and functional diversity in the family of small heat shock proteins from the parasite *Toxoplasma gondii*. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **1793**, 1738-1748.
- Zeiler E., Braun N., Böttcher T., **Kastenmüller A.**, Weinkauff S. & Sieber S.A. (2011) Vibralactone as a tool to unravel the activity and structure of the *Listeria monocytogenes* ClpP1P2 complex, *Angew. Chem.* (im Druck).
- Braun N., Zacharias M., Peschek J., **Kastenmüller A.**, Zou J., Hanzlik M., Haslbeck M., Rappsilber, J., Buchner, J. & Weinkauff S. (2011) Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone α B-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (angenommen).
- Gebendorfer K., Drazic, Le Y., Gundlach J., **Kastenmüller A.**, Braun N., Bepperling A., Franzmann T. & Winter J. Identification of a Hypochlorite-Specific Transcription Factor from *Escherichia coli*. (in Vorbereitung).
- Bepperling A., Peschek J., Braun N., **Kastenmüller A.**, Weinkauff S., Haslbeck M. & Buchner, J. Small heat shock proteins: A comparative survey of conserved structural and functional properties from bacteria to eukaryotes. (in Vorbereitung).