

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Chemie

Lehrstuhl für Biotechnologie

Strukturelle Organisation von kleinen Hitzeschockproteinen

Thomas Kriehuber

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. M. Sattler
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff
3. Univ.-Prof. Dr. S. Sieber

Die Dissertation wurde am 02.05.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.06.2012 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Molekulare Chaperone	7
1.2	Kleine Hitzeschockproteine (sHsps)	9
1.2.1	Evolution von sHsps	9
1.2.2	Aufbau und Struktur von sHsps	11
1.2.2.1	Primärstruktur	11
1.2.2.2	Sekundär und Tertiärstruktur	13
1.2.2.3	Quartärstruktur/Oligomerisierung	14
1.2.3	Funktion	17
1.2.4	Substrat-Erkennung/Bindung	19
1.2.5	Kleine Hitzeschockproteine in <i>S. cerevisiae</i>	20
1.2.6	Hsp26 aus <i>S. cerevisiae</i>	21
1.3	Fragestellung	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Verwendete Materialien	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Sonstige Materialien und Geräte	25
2.1.3	Software	25
2.1.4	Mikroorganismen und ihre Kultivierung	26
2.1.5	Vektoren	27
2.1.6	Primer	27
2.2	Crosslinks und Massenspektrometrie	27
2.2.1	Crosslinks	27
2.2.2	Gelextraktion und Verdau	28
2.2.3	Elution, Anreicherung und Fraktionierung der Peptide	29
2.2.3.1	Unfraktionierte Probenvorbereitung	29
2.2.3.2	Fraktionierte Probenvorbereitung	29
2.2.4	Orbitrap-Messung	30
2.2.5	Datenkonvertierung	31
2.2.6	Datenanalyse	31
2.2.6.1	Crosslinker mit Isotopenmarkierung	32
2.2.6.2	Crosslinker ohne Isotopenmarkierung	33
2.3	Proteinchemische Arbeitsmethoden	33
2.3.1	SDS-PAGE	33
2.3.2	Coomassie-Färbung	34

2.3.3	Analytische Ultrazentrifugation	34
2.3.3.1	Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe	34
2.3.3.2	Sedimentationsgleichgewichtsläufe	35
2.3.3.3	Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe mit Fluoreszenzdetektor	35
2.3.4	Größenausschlusschromatographie	35
2.3.5	Statische Lichtstreuung	36
2.3.6	Temperaturübergänge	36
2.3.6.1	Circulardichroismus	37
2.3.6.2	Sypro-Orange	37
2.3.7	Elektronenmikroskopie und Größenabschätzung	37
2.4	Präparative Methoden	38
2.4.1	Expression Hsp26 wt und Mutanten	38
2.4.2	Zellaufschluss	38
2.4.3	Reinigung Hsp26 und Vollängen-Mutanten	38
2.4.4	Reinigung Hsp26 ₃₀₋₁₉₅	39
2.4.5	Herstellung unterschiedlicher Oligomere	39
2.5	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	39
2.5.1	Klonierung von Hsp26 Mutanten	39
2.5.2	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	40
2.5.3	Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten	40
2.5.4	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
2.5.5	Sequenzierung von DNA	40
2.5.6	Chemisch kompetente <i>E. coli</i>	41
2.5.7	Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	41
2.5.8	Chemische Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	41
2.6	Bioinformatische Methoden	42
2.6.1	Isolation der Sequenzen	42
2.6.2	Längenverteilung und Aminosäurehäufigkeit	42
2.6.3	Phylogenetische Analyse	43
3	Ergebnisse und Diskussion	45
3.1	Bioinformatische Analyse von sHsps	45
3.1.1	PFAM Modell PF00011	45
3.1.2	Analyse der Primärsequenz	46
3.1.3	Anzahl sHsps je Genom	50
3.1.4	Evolutionäre Entwicklung der sHsps	51
3.1.5	Phylogenetische Entwicklung der α -Kristallin-Domäne	53
3.1.6	Phylogenetische Entwicklung der terminalen Bereiche	57

3.1.7 Zusammenfassung bioinformatische Analyse von sHsps . . .	60
3.2 Oligomerisierung von Hsp26	61
3.2.1 Oligomerisierung <i>in vivo</i>	61
3.2.2 Oligomerisierung <i>in vitro</i>	63
3.2.3 Einfluss der Oligomerisierung auf die Chaperonaktivität . .	68
3.2.4 Bestimmung der Anzahl an Untereinheiten	74
3.2.5 Posttranslationale Modifikationen von Hsp26	81
3.2.5.1 Phosphoproteom Analysen in <i>S. cerevisiae</i>	81
3.2.5.2 Phosphomimetische Mutanten	82
3.2.6 Zusammenfassung Oligomerisierung von Hsp26	85
3.3 Analyse von sHsp/Substrat-Interaktionen durch chemische Quer- vernetzung	87
3.3.1 Etablierung der Methoden	87
3.3.2 Crosslinks innerhalb der sHsp Oligomere	89
3.3.3 Substratinteraktionen mit heterobifunktionalem aminreak- tiven Crosslinker	94
3.3.3.1 Lysozym	94
3.3.3.2 Alkoholdehydrogenase	98
3.3.3.3 Malatdehydrogenase	101
3.3.3.4 Citratsynthase	104
3.3.4 Crosslinks mit dem heterobifunktionalem <i>zero length</i> Cross- linker EDC/NHS	107
3.3.4.1 Crosslinks innerhalb Hsp26	109
3.3.4.2 Crosslinks mit Lysozym	110
3.3.5 Diskussion der chemischen Quervernetzung von sHsp Oli- gomeren und deren Substratkomplexe	112
 4 Zusammenfassung	 119
 5 Summary	 121
 Anhang	 123
Veröffentlichungen	123
Literaturverzeichnis	124
Danksagung	141
Erklärung	143

1 Einleitung

1.1 Molekulare Chaperone

Die Synthese einer Polypeptidkette aus Aminosäuren am Ribosom ist mit großem Energie- und Zeitaufwand verknüpft. So benötigt alleine die Knüpfung einer Peptidbindung die Hydrolyse von vier energiereichen Phospho-anhydrid-Bindungen (Alberts et al., 2002). Berücksichtigt man neben der Beladung der tRNA und Knüpfung der Peptidbindung auch die Synthese des entsprechenden Codons belaufen sich die Energiekosten auf 10 energiereiche Bindungen. In den meisten Zellen wird daher mehr Energie für die Peptidbiosynthese (in Bakterien bis zu 70%) aufgewandt als für irgendeine andere Biosynthese (Szaflarski and Nierhaus, 2007; Alberts et al., 2002). Zusätzlich zu den hohen Energiekosten kommt hinzu, dass die Synthese einer neuen Polypeptidkette je nach Organismus und Länge mehrere Minuten an Zeit in Anspruch nehmen kann (Hartl et al., 2011).

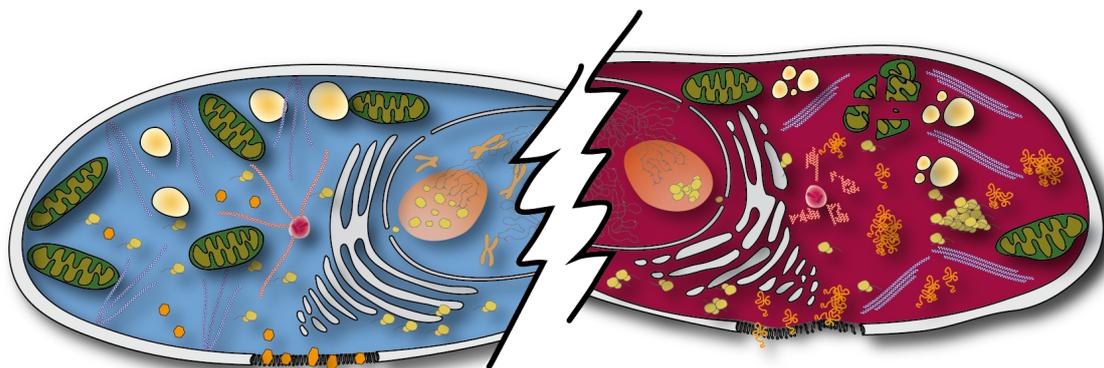


Abbildung 1: Der Vergleich zwischen einer ungestressten (links) und gestressten eukaryotischen Zelle (rechts) zeigt die Auswirkungen von Hitzestress auf die Organisation der Zelle. Hitzestress führt zur Beschädigung/Reorganisation des Zytoskellets (Aktinfilamente: blau, Mikrotubuli: rot) und Fragmentierung/Reduktion von Organellen (Mitochondrien: grün, Golgi/ER: weiß, Lysosomen: gelb/weiß). Der Nukleolus schwillt an. Aggregierende Proteine und RNA (zum Beispiel Ribosome) werden in Stressgranula abgelegt. Darüberhinaus entfalten/aggregieren cytosolische Proteine (orange: hexagonal -> Knäuelstruktur). Im finalen Stadium ändert sich die Membranzmorphologie. Insgesamt führen alle diese Punkte zu einem Wachstumsarrest mit Zell-Zyklus-Stopp (nicht kondensierte Chromosomen im Zellkern). (Abbildung adaptiert nach Richter et al. (2010) mit Erlaubnis von Elsevier)

Um den größtmöglichen Nutzen aus dieser „Investition“ zu ziehen und auch unter Stresssituationen die Integrität der Zelle, der Organellen, des Zytoskellets, der Membranen und zytosolischen Proteine zu schützen (vergleiche Abbildung 1) hat sich im Laufe der Evolution ein Netzwerk aus „Helfern“, den so genannten molekularen Chaperonen entwickelt. Auch wenn, wie von Anfinsen et al. (1961)

gezeigt werden konnte, die benötigte Information für die korrekte Faltung eines Proteins intrinsisch in der translatierten Peptid-Sequenz steckt, benötigen einige Proteine für die effektive Faltung in ihre native dreidimensionale Struktur Hilfe (Hartl, 1996; Narberhaus, 2002; Bukau et al., 2000). Neben der Unterstützung bei der *de novo* Faltung von Polypeptidketten besitzen Vertreter der molekularen Chaperone, die, wegen der Regulation unter (Hitze-)Stressbedingungen, auch Hitzeschockproteine (Hsp) genannt werden, eine Vielzahl an weiteren Funktionen im lebenden Organismus. Neben unterschiedlichen Faltungsaufgaben (zum Beispiel Konformationsänderungen, Aktivierung, Rückfaltung, Unterdrückung von Fehlfaltung/Aggregation unter widrigen Bedingungen) spielen die insgesamt je nach Organismus bis zu 200 (Co-) Chaperone auch eine Rolle bei Proteintransport, Proteinabbau und genetischer Stabilität in der Zelle (Richter et al., 2010; Hartl et al., 2011; Rutherford and Lindquist, 1998).

In Abhängigkeit des Molekulargewichts werden die Chaperone im Allgemeinen in fünf Klassen untergliedert: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 oder Chaperonine und sHsps.

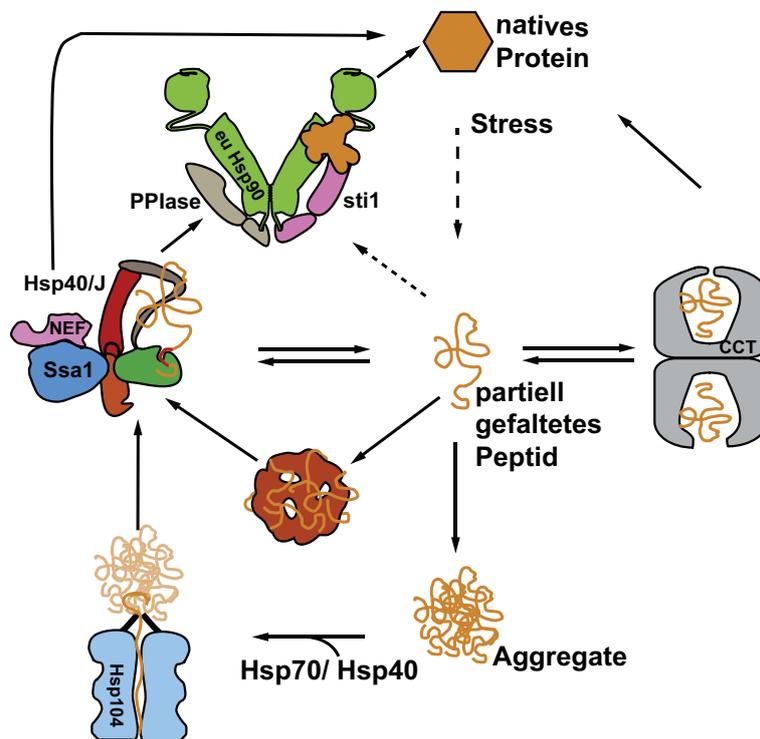


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zusammenspiels der einzelnen Chaperonfamilien in der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*): partiell entfaltete Substrate werden durch Mitglieder der Hsp70/Hsp40 Familie zurückgefaltet oder an die Hsp90 Chaperonmaschine übergeben. Alternativ können partiell entfaltete Zwischenprodukte von kleinen Hitzeschockproteinen gebunden und zwischengelagert werden. Bereits aggregierte Substrate können über Hsp104 zurückgefaltet und den Rückfaltungsprozess von Hsp70/Hsp40/Hsp90 zugeführt werden. (Abbildung adaptiert nach Richter et al. (2010) mit Erlaubnis von Elsevier)

Mitglieder der einzelnen Klassen interagieren in der lebenden Zelle in einem sehr gut reguliertem Netzwerk mit vielen unterschiedlichen Cochaperonen miteinander (Abbildung 2) und können so das Schicksal von partiell entfalteten Polypeptidketten beeinflussen. So werden die teilweise ungefalteten Polypeptidketten durch Vertreter der Hsp70/Hsp40 Klasse gebunden und können direkt oder, wenn notwendig, durch Weitergabe an das Hsp90 System in die native Struktur (zurück)gefaltet werden. Um unter Stressbedingungen das System zu puffern, können kleine Hitzeschockproteine die entfalteten Substrate binden und mit Hilfe des Hsp70 Systems rückfalten. Bereits aggregierte Proteine können durch Hsp104 aus den Aggregaten gelöst und dem oben beschriebenen Rückfaltungsprozess zugefügt werden (Richter et al., 2010).

1.2 Kleine Hitzeschockproteine (sHsps)

Kleine Hitzeschockproteine gehören (nach Molekulargewicht der Monomere gerechnet) zu den kleinsten und ATP-unabhängigen Vertretern der molekularen Chaperone, die historisch vor allem durch die starke Induktion unter Stressbedingungen und die Dominanz in Augenlinsen von Wirbeltieren bekannt wurden (Haslbeck et al., 2005a; Narberhaus, 2002). Evolutionär hat sich diese Proteinfamilie jedoch in allen Bereichen des Lebens, mit Ausnahme weniger Pathogenen, etabliert (Narberhaus, 2002). Die Bedeutung dieser Proteine für die Zelle wird sowohl durch die genetische Expansion in höheren Organismen (siehe Abschnitt 1.2.1) wie auch durch die Krankheitsassoziation (zum Beispiel Katarakt, Myopathien, Neuropathien) weiter unterstrichen (Mymrikov et al., 2011; Sun and MacRae, 2005). Auch wenn für die Annotation von potentiellen sHsps meist ausschließlich das Vorhandensein der konservierten α -Kristallin-Domäne ein Kriterium ist, weisen Vertreter dieser Superfamilie meist fünf weitere Kriterien auf (Haslbeck et al., 2005a): (1) kleines Molekulargewicht der Monomere, (2) Oligomerisierung, (3) dynamische Quartärstruktur, (4) Stressinduktion und (5) Chaperonaktivität.

1.2.1 Evolution von sHsps

Kleine Hitzeschockproteine müssen sich im Laufe der Evolution sehr früh entwickelt haben, da bereits in den letzten gemeinsamen Vorläufern von Eukaryoten und Prokaryoten sHsps gefunden wurden (Waters et al., 1996; Kappé et al., 2002). Seit diesem Zeitpunkt sind sie, außer in wenigen pathogenen Organismen, in allen Bereichen des Lebens (Archaeen, Bakterien und Eukaryoten) vertreten

(Plesofsky-Vig et al., 1992; de Jong et al., 1993; Caspers et al., 1995; Waters, 1995; Waters and Vierling, 1999; Franck et al., 2004). Dieses sehr frühe Auftreten in der Entwicklungsgeschichte deutet darauf hin, dass die sHsps vor anderen Chaperonfamilien wie zum Beispiel DnaK (das in vielen Archaeen fehlt) etabliert wurden (Gribaldo et al., 1999).

Betrachtet man die Entwicklung genauer, ist vor allem auffällig, dass die Anzahl der sHsps in höheren Eukaryoten und Pflanzen sehr stark zugenommen hat (vergleiche Tabelle 1). So besitzen die bis jetzt untersuchten Bakterien und einzelligen Eukaryoten meist einige wenige sHsps (Horwitz, 1992; Kappé et al., 2002; Narberhaus, 2002; Horwitz, 2003; Allen et al., 1992), wohingegen die Anzahl zum Beispiel in *D. melanogaster*, *C. elegans* oder Maus/Mensch auf vier, 16 beziehungsweise mindestens zehn Stück angestiegen ist (Candido, 2002; Kappé et al., 2003; Fontaine et al., 2003; Morrow et al., 2000). In Pflanzen ist die Anzahl sogar noch weiter erhöht (Scharf et al., 2001).

	Organismus	Anzahl sHsps	Zitat
Archaeen	<i>M. jannaschii</i>	1	Kim et al. (1998)
	<i>S. tokodaii</i>	2	Usui et al. (2004)
Bakterien	<i>M. tuberculosis</i>	1	Kennaway et al. (2005)
	<i>E. coli</i>	2	Allen et al. (1992)
Pilze	<i>S. cerevisiae</i>	2	Haslbeck et al. (2004a)
	<i>S. pombe</i>	2	Sugino et al. (2009)
Metazoen	<i>D. melanogaster</i>	4	Morrow et al. (2000)
	<i>H. sapiens</i>	10	Kappé et al. (2003)
	<i>M. musculus</i>	10	Fontaine et al. (2003)
	<i>C. elegans</i>	18	Aevermann and Waters (2008)
Pflanzen	<i>A. thaliana</i>	19	Scharf et al. (2001)

Tabelle 1: Anzahl der sHsps in ausgewählten Organismen.

Über die möglichen Gründe für eine so starke Expansion von sHsp-Sequenzen spekuliert Narberhaus (2002) wie folgt: (1) eine parallele, redundante Induktion liefert eine deutlich schnellere Stressantwort; (2) die Verwendung von unterschiedlichen Promotoren macht eine sehr differenzierte Regulation auf unterschiedliche Stimuli denkbar; (3) eine weitere Regulation der Funktion kann über Heterooligomere erfolgen; (4) die Redundanz macht eine Weiterentwicklung einzelner Proteine erst möglich, da das individuelle Gen von seiner ursprünglichen Funktion entbunden wird. Tatsächlich mag es für die funktionelle Notwendigkeit der genetischen Expansion unterschiedliche, speziesabhängige Gründe geben, die jedoch bis heute meist ungeklärt sind (Haslbeck et al., 2005a).

Da sich die sHsps auf Sequenzebene in unterschiedliche Klassen gliedern lassen (Waters et al., 2008; Siddique et al., 2008; Studer and Narberhaus, 2000), ist da-

von auszugehen, dass diese Expansion schrittweise und je nach Organismus zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt gefunden haben muss.

1.2.2 Aufbau und Struktur von sHsps

1.2.2.1 Primärstruktur

Auch wenn sich die sHsps ausgehend von einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben, entwickelten sich die Primärsequenzen zu einer (im Vergleich zu anderen Chaperonfamilien) sehr heterogenen Proteinfamilie. Die Sequenzidentität ist selbst bei sehr nah verwandten paralogen Sequenzen sehr gering (Narberhaus, 2002). Im Bezug auf die gesamte Proteinfamilie weist lediglich die ca. 90 Aminosäuren lange α -Kristallin-Domäne eine entsprechende Konservierung (vor allem auf struktureller Ebene) auf. Historisch wurde dieser Bereich, auf Grund der Homologie zu α -Kristallin, dem Hauptbestandteil der Augenlinse in Säugetieren, als α -Kristallin-Domäne bezeichnet (de Jong et al., 1993). An diese strukturell konservierte Domäne schließen sich N- und C-terminal, auf Sequenzebene weitgehend nicht konservierte, aber für die Funktion essentielle, Bereiche an (vergleiche Abbildung 3 und Kapitel 1.2.3).



Abbildung 3: Aufbau von sHsps: die konservierte α -Kristallin-Domäne (grün) wird von N- und C-terminalen Erweiterungen (gelb beziehungsweise blau) flankiert. Das konservierte IXI Motiv liegt C-terminal zur konservierten α -Kristallin-Domäne und untergliedert die C-terminale Erweiterung in zwei Bereiche (hell- und dunkelblau).

Die größte Varianz innerhalb der gesamten Sequenzlänge von 12 bis 43 kDa wird durch die unterschiedliche Länge der N-terminalen Sequenzen erreicht, da der C-terminale Sequenzbereich, welcher der α -Kristallin-Domäne folgt, meist (verglichen mit dem N-terminalen Sequenzen) relativ kurz ist (Narberhaus, 2002). In diesem C-terminalen Bereich befindet sich 10-15 Aminosäuren nach der α -Kristallin-Domäne in über 90 % der Sequenzen ein konserviertes Motiv aus drei Aminosäuren (Poulain et al., 2010). Dieses Motiv untergliedert die C-terminal an die α -Kristallin-Domäne anschließenden Aminosäuren in einen flexiblen Loop und einen C-terminalen Schwanz (Laganowsky and Eisenberg, 2010). Hier unterscheiden sich auch diverse bioinformatische Ansätze zur Identifizierung von potentiellen sHsps auf Sequenzebene. In manchen Ansätzen (wie zum Beispiel das PFAM Modell PF00011) werden für die Funktion wichtige Bereiche außerhalb der α -Kristallin-Domäne, wie der flexible Loop und das konservierte Motiv,

bei der Identifizierung mit berücksichtigt. Andere Ansätze (wie zum Beispiel das Prosite-Pattern PS01031) beziehen sich lediglich auf die strukturell konservierten Bereiche (Poulain et al., 2010).

Das Motiv selbst wird als IXI oder IXV Motiv bezeichnet, da es sich bei der ersten und letzten Aminosäure meist um ein Isoleucin handelt. Jedoch können auch andere hydrophobe Aminosäuren wie Valin oder Leucin an diesen Positionen vorkommen. Die mittlere Position ist weitgehend variabel. Jedoch ist hier das Vorhandensein eines Prolins charakteristisch für Metazoen wohingegen ein Glutamat charakteristisch für Sequenzen ist, die nicht aus Metazoen stammen (Poulain et al., 2010).

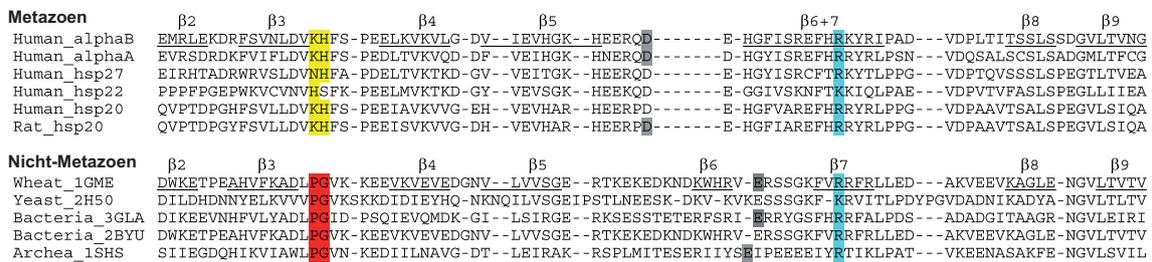


Abbildung 4: Sequenzalignment von kleinen Hitzeschockproteinen zeigen deutlich den Unterschied zwischen dem verlängerten β7 Strang in Metazoen im Vergleich zu den beiden getrennten β6 und β7 Strängen in anderen Sequenzen. Das konservierte und mit vielen Krankheiten assoziierte Arginin (cyan) bildet mit einer negativ geladenen Aminosäure eine Salzbrücke (grau). Die zwischen β3 und β4 strukturell wichtigen konservierten Motive sind jeweils typisch für den Ursprung der Sequenzen (Metazoen: „KH“ in gelb , Nicht-Metazoen: „PG“ in rot). (Abbildung adaptiert nach Clark et al. (2011) mit Erlaubnis von Elsevier)

Für die Varianz innerhalb der α-Kristallin-Domäne wird vor allem der in Nicht-Metazoen als β6 bezeichnete Bereich verantwortlich gemacht (vergleiche Abbildung 4) (Poulain et al., 2010). Neben den oben beschriebenen konservierten Aminosäuren im C-Terminalen Bereich gibt es einige wenige weitere Positionen innerhalb der α-Kristallin-Domäne, die eine ähnlich hohe Konservierung auf Sequenzebene aufweisen (vergleiche Abbildung 4). So wird ein mit verschiedenen Krankheiten assoziiertes Arginin (Abbildung 4 in cyan) in fast allen sHsp Sequenzen gefunden (Clark et al., 2011). Andere Sequenzmerkmale sind lediglich charakteristisch für gewisse Sequenzgruppen. Ein Beispiel hierfür ist das „PG“ Motiv (Abbildung 4 in rot) das nur außerhalb der Metazoen gefunden wird, beziehungsweise das Äquivalent „KH“ (gelb) an gleicher Position in Metazoen (de Jong et al., 1998).

1.2.2.2 Sekundär und Tertiärstruktur

Wie oben bereits erwähnt, sind sHsps auf struktureller Ebene deutlich stärker konserviert als auf Sequenzebene. Obwohl die beiden als erstes verfügbaren Kristallstrukturen von Hsp16.5 aus *M. jannaschii* und Hsp16.9 aus Weizen lediglich 23 % Sequenzidentität aufweisen, zeigen die Strukturen der α -Kristallin-Domäne lediglich eine mittlere quadratische Abweichung (RMS) von 1.5 Å (van Montfort et al., 2001).

	Protein	Organismus	PDB Code	Zitat
Archaeen	Hsp16.5	<i>M. jannaschii</i>	1SHS	van Montfort et al. (2001)
	Hsp14.0	<i>S. tokodaii</i>	3AAB, 3AAC	Takeda et al. (2011)
Metazoen	Tsp36	<i>T. saginata</i>	2BOL	Stamler et al. (2005)
	HspA	<i>X. citri</i>	3GUF, 3GT6,	Hilario et al. (2011)
			3GLA	Hilario et al. (2006)
	α A-Kristallin	<i>D. rerio</i>	3N3E	Laganowsky and Eisenberg (2010)
	HspB1	<i>H. sapiens</i>	3Q9P, 3Q9Q	Baranova et al. (2011)
	α B-Kristallin	<i>H. sapiens</i>	2WJ7	Bagn�ris et al. (2009)
			3L1G,	Laganowsky et al. (2010)
2KLR,			Jehle et al. (2010)	
		2Y1Z	Clark et al. (2011)	
α A-Kristallin	<i>B. taurus</i>	3L1E, 3L1F	Laganowsky et al. (2010)	
Hsp20	<i>R. rattus</i>	2WJ5	Bagn�ris et al. (2009)	
Pflanzen	Hsp16.9	<i>T. aestivum</i>	1GME	Kim et al. (1998)

Tabelle 2: Übersicht bekannter Strukturen von α -Kristallin-Domänen mit atomarer Auflösung.

Alle bisher gelösten sHsp Strukturen (Tabelle 2) sind aus einem β -Sandwich aus zwei antiparallelen β -Faltblättern mit einer Immunglobulin ähnlichen Struktur aufgebaut (Abbildung 5). Je nach Ursprungsorganismus bestehen die beiden β -Faltblätter der α -Kristallin-Domäne aus mindestens sieben Strängen, die in Anlehnung an die Struktur aus *M. jannaschii* von eins bis zehn durchnummeriert werden (vergleiche Abbildung 4). Der konservierte Bereich der α -Kristallin-Domäne wird von den Faltblättern zwei und neun begrenzt, welche in allen bisher gelösten Strukturen vorliegen (Poulain et al., 2010). Die stärksten strukturellen Unterschiede innerhalb der α -Kristallin-Domäne können an Hand der Präsenz des β 6-Faltblattes ausgemacht werden. In allen bisher untersuchten Strukturen aus der Gruppe der Metazoen fehlt dieser β -Strang, was (im Vergleich zu den restlichen Strukturen) zu einer geänderten Dimerbildung führt (vergleiche Kapitel 1.2.2.3) (McHaourab et al., 2009).

Die Sekundärstrukturelemente außerhalb der α -Kristallin-Domäne sind einer deutlich gr o eren Heterogenität und Flexibilität zwischen verwandten sHsps unterworfen. Zusätzlich dazu können sich die Strukturen beziehungsweise Orientierungen der einzelnen Monomere innerhalb eines Oligomers unterscheiden (Braun et al., 2011). Zusätzlich werden in den Kristallstrukturen meist nur ein

Teil der terminalen Bereiche aufgelöst beziehungsweise in NMR-Studien liefern diese mehrere definierte Signale (Jehle et al., 2011; van Montfort et al., 2001).

1.2.2.3 Quartärstruktur/Oligomerisierung

Fast alle bisher näher untersuchten sHsps können Oligomere mit 12 bis 40 Untereinheiten bilden (Takeda et al., 2011; Haslbeck et al., 2005a). Im Allgemeinen geht man davon aus, dass der Grundbaustein für diese Oligomere, neben anderen potentiellen Zwischenstufen, Dimere sind, wobei Kontakte außerhalb der α -Kristallin-Domäne zur Stabilisierung dieser notwendig sind (Chen et al., 2010a). Jedoch wurden, vor allem Dank moderner massenspektrometrischer und elektronenmikroskopischer Methoden, auch Komplexe mit einer ungeradzahli- gen Anzahl an Untereinheiten vorgeschlagen (Braun et al., 2011; Stengel et al., 2010). Wenn der oben beschriebene β 6-Strang vorhanden ist, wird das Dimer über einen Strangaustausch zwischen zwei Monomeren, welche sich gegenseitig das β -Faltblatt vervollständigen, gebildet. Dabei erzeugt der β 6-Strang eines Monomers zusammen mit den Strängen β 2, β 3, β 8 und β 9 des benachbarten Monomers eine Kontaktfläche wie es zum Beispiel in den Kristallstrukturen von Hsp16.5, Hsp16.9 und Hsp14.0 (vergleiche Abbildung 5) sichtbar ist (Kim et al., 1998; van Montfort et al., 2001; Takeda et al., 2011). Diese Art von Dimerbildung wird für die meisten sHsps aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen vorhergesagt (Bascha et al., 2012).

Im Gegensatz dazu ist in Sequenzen aus Metazoen bei Abwesenheit des β 6 Stranges der β 7 Strang verlängert und bildet in einer antiparallelen Orientierung eine Kontaktfläche mit dem entsprechenden Strang aus dem benachbarten Monomer (vergleiche Abbildung 5) (Bagn ris et al., 2009; Jehle et al., 2009).

Die so gebildeten Dimere können über Kontaktstellen außerhalb der α -Kristallin-Domäne zu höheren Oligomeren assemblieren. Hier spielen unabhängig von der Art des Dimers sowohl die Kontakte der N- wie auch die der C-terminalen Sequenzen eine entscheidende Rolle. Das hydrophobe IXI/IXV Motiv bindet zum Beispiel in eine aus den β 4 und β 8 Strängen gebildete hydrophobe Fläche benachbarter Dimere (Braun et al., 2011; Kim et al., 1998; van Montfort et al., 2001). Die Struktur der N-terminalen Bereiche ist weniger gut definiert. So sind lediglich in der Kristallstruktur von Hsp16.9 aus Weizen Signale für die kompletten N-terminalen Sequenzen vorhanden, von denen aber lediglich die Hälfte aufgelöst sind. Die Struktur beschreibt dabei helikale Motive, die Kontakte zu einem N-terminalen Bereich eines anderen Dimers herstellt. Zusammen mit der Interaktion des IXI/IXV-Motivs sorgt dieser Kontakt für eine Quervernetzung (van Mont-

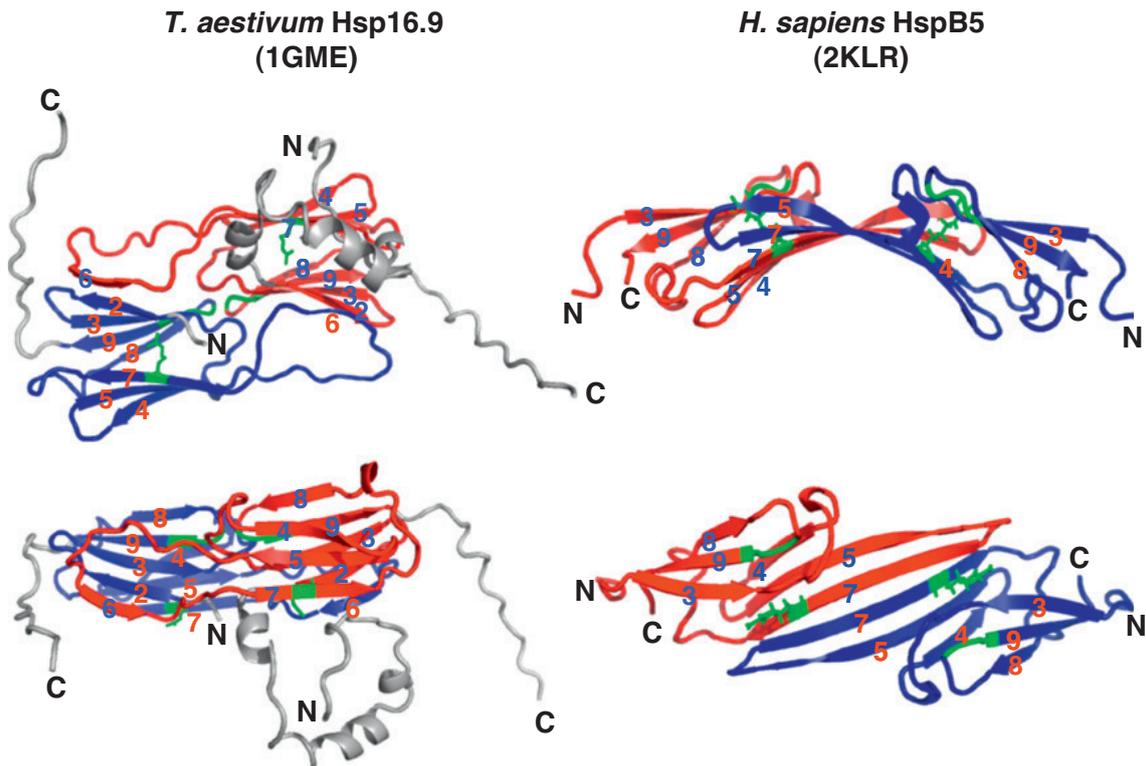


Abbildung 5: Unterschiedliche Dimerbildung bei sHsps aus Metazoen (rechts) und Nicht-Metazoen (links). Die Kontaktfläche zwischen den beiden Monomeren (rot und blau) unterscheidet sich in den bisher gelösten Strukturen phylonspezifisch. Ist der $\beta 6$ Strang, wie bei Hsp16.9 aus Weizen, vorhanden, so dimerisieren die sHsps über einen Strangaustausch. Bei fehlendem $\beta 6$ Strang, wie bei dem humanem HspB5, bildet $\beta 7$ eine antiparallele Kontaktfläche. (Abbildung adaptiert nach Basha et al. (2012) mit Erlaubnis von Elsevier)

fort et al., 2001). Dank der großen Flexibilität der terminalen Sequenzen lassen sich über dieses einheitliche „Baukastenprinzip“ eine Vielzahl an unterschiedlichen Oligomerisierungsformen und Geometrien mit unterschiedlicher Anzahl an Untereinheiten verwirklichen (Braun et al., 2011; van Montfort et al., 2001; Kim et al., 1998; Kennaway et al., 2005; Laganowsky et al., 2010).

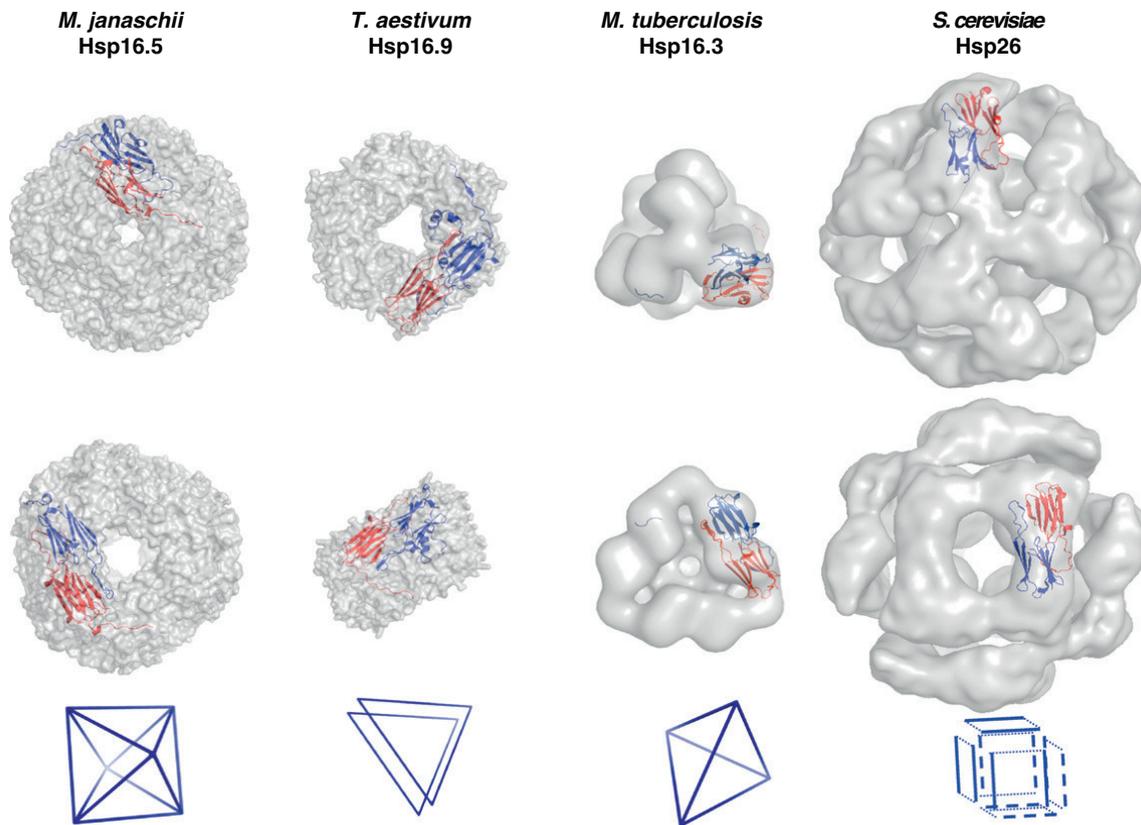


Abbildung 6: Kleine Hitzeschockproteine oligomerisieren in unterschiedlichen Geometrien. Oberflächendarstellungen von Hsp16.5, Hsp16.9, Hsp16.3 und Hsp26 mit Darstellung der Dimerorientierung (für die EM-Rekonstruktionen von Hsp16.3 und Hsp26 ist die Kristallstruktur aus Hsp16.9 eingepasst). Unten: Schematische Darstellung der Symmetrie: Eine durchgezogene Linie repräsentiert die Lage eines Dimers. (Abbildung adaptiert nach Basha et al. (2012) mit Erlaubnis von Elsevier)

So besteht sowohl Hsp16.9 aus Weizen wie auch Hsp16.3 aus *M. tuberculosis* aus zwölf Untereinheiten jedoch mit unterschiedlicher Geometrie (vergleiche Abbildung 6). Bei Hsp16.9 bilden zwei miteinander verbundene Scheiben zu je drei Dimeren das Oligomer (van Montfort et al., 2001). Im Gegensatz dazu sind in Hsp16.3 die gleiche Anzahl an Dimere entlang der Kanten eines Tetraeders angeordnet (Kennaway et al., 2005). Die Geometrie der Oligomere mit 24 Untereinheiten entspricht meist einem Oktaeder (Kim et al., 1998; Braun et al., 2011; Haslbeck et al., 2008). Für die 36 Untereinheiten von HspA aus *X. citri* ist ein Stapel aus unterschiedlichen Hexameren beziehungsweise Dodecameren beschrieben (Hilario et al., 2011).

Insgesamt ist die Quartärstruktur der sHsps sehr dynamisch. Neben dem kontinuierlichen Austausch von Untereinheiten/Grundbausteinen (Bova et al., 1997; Franzmann et al., 2005; Sobott et al., 2002; Studer and Narberhaus, 2000; Benesch et al., 2010) weisen vor allem die bis jetzt untersuchten eukaryotischen Vertreter eine breite Verteilung an unterschiedlichen Oligomierzuständen auf (Braun et al., 2011; Stengel et al., 2010; Benesch et al., 2010). Die Dissoziation des Oligomers scheint dabei der geschwindigkeitsbestimmende Faktor zu sein, was zur Folge hat, dass in Lösung hauptsächlich das „vollständige“ Oligomer populiert ist (Narberhaus, 2002; Basha et al., 2012). Jedoch lässt sich die Dynamik des Oligomers durch viele Faktoren, wie zum Beispiel Temperatur, Ionenstärke, Salzkonzentration und posttranslationale Modifikationen beeinflussen beziehungsweise verschieben (Bova et al., 2000). Dieser hohe Grad an Dynamik und Heterogenität ist vermutlich auch der Grund dafür, dass insgesamt nur sehr wenige Kristallstrukturen (vergleiche Kapitel 1.2.2.2) verfügbar sind. Jedoch nimmt man an, dass diese Polydispersität auch für die extrem hohe Löslichkeit und biologische Aufgabe der Proteine (mit)verantwortlich ist (vergleiche Kapitel 1.2.3) (Laganowsky and Eisenberg, 2010).

1.2.3 Funktion

Die für sHsps beschriebene (Haupt-)Funktion ist das ATP-unabhängige Binden und in Lösung Halten von (partiell) entfaltenen Substraten. Dabei können diese bis zu einer äquimolaren Anzahl an Substraten in einem faltungskompetenten Zustand halten (Narberhaus, 2002) (vergleiche Abbildung 7). Um dadurch nicht funktionell wichtige Proteine aus dem Cytosol zu depletieren und so die Funktion der Zelle zu gefährden, muss die Funktion der sHsps strikt reguliert werden (Haslbeck et al., 2005a). So werden erst unter (Hitze-)Stressbedingungen viele sHsps induziert und/oder aktiviert und können dann ein sehr breites Substratspektrum (bis zu 1/3 aller cytosolischen Proteine) abdecken (Narberhaus, 2002; Haslbeck et al., 2005a, 2004a). Eine Aktivierung der sHsps kann durch Änderungen im Oligomerisierungsgleichgewicht zum Beispiel durch Temperaturänderung, posttranslationale Modifikationen (vor allem Phosphorylierung) aber auch über intramolekulare Konformationsänderungen geschehen (Franzmann et al., 2008; Ecroyd et al., 2007; Shashidharamurthy et al., 2005).

Die Substratkomplexe halten die Proteine in Lösung und sind *in vitro* meist sehr stabil (Ehrnsperger et al., 1997; Lee et al., 1997). Jedoch gibt es in der Stärke der (Modell-)Substratinteraktion eine große Bandbreite bei unterschiedlichen sHsps. So wird zum Beispiel die Citratsynthase von Hsp28 von *T. gondii* sehr stabil in

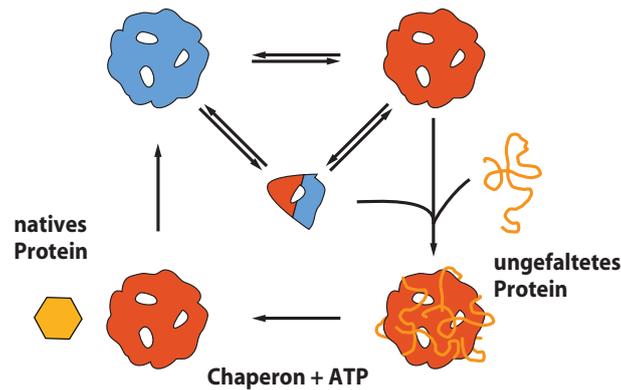


Abbildung 7: Mechanismus des sHsp Chaperonzyklus: Die Oligomerisierung von sHsps ist, auch in der Abwesenheit von Stress, sehr dynamisch (blau). Unter (Hitze-)Stressbedingungen oder über Modifikationen kann das sHsp in einen aktiven Zustand überführt werden (rot) und so Substrate binden und stabilisieren. Einmal gebundene Substrate benötigen meist die Hilfe von ATP-abhängigen Chaperonen um zurückgefaltet oder dem Proteinabbau zugeführt zu werden. (Abbildung adaptiert nach Richter et al. (2010) mit Erlaubnis von Elsevier)

Komplexen gebunden, wohingegen die Interaktion mit Hsp30 aus dem selben Organismus eher transient ist (de Miguel et al., 2009). Die stabil gebundenen Substrate werden jedoch meist nur mit Hilfe von ATP-abhängigen Chaperonen wieder in Lösung beziehungsweise in die native Konformation gebracht (Mogk et al., 2003; Lee et al., 1997). Somit sind diese sHsps nach klassischer Definition streng genommen keine Chaperone, da sie lediglich als Teil des gesamten Chaperonnetzwerks (Abbildung 2) die Faltung von Proteinen unterstützen (Narberhaus, 2002). Ist eine Rückfaltung der Substrate nicht möglich, können diese auch dem Proteinabbau zugeführt werden (Vos et al., 2008). Durch diese „Holdase“-Funktion entkoppeln sHsps in der Zelle die Aggregationsunterdrückung von der ATP-abhängigen Prozessierung/Rückfaltung der Substrate (Haslbeck et al., 2005a).

Ist eine Unterdrückung der Aggregation zum Beispiel wegen eines zu geringem Verhältnis Chaperon zu Substrat nicht möglich, so können die sHsps in die Aggregate integriert werden und verändern deren Struktur und Rückfaltungsmöglichkeiten (Haslbeck et al., 2005b; Cashikar et al., 2005; Liberek et al., 2008).

Um die oben beschriebene Aggregationsunterdrückung *in vitro* zu charakterisieren, wird häufig auf Modellsubstrate (zum Beispiel Citratsynthase, Lysozym, Insulin oder Malatdehydrogenase) zurückgegriffen (Buchner et al., 1998; Scheibel et al., 1998; Goldberg et al., 1991; Lee et al., 1997).

Neben der für die Annotation als sHsp entscheidenden Chaperonfunktion (Haslbeck et al., 2005a) besitzen viele sHsps weitere Funktionen im zellulären Kontext, die über die Unterdrückung von Aggregation unter (Hitze-)Stressbedingungen

hinausgehen. So spielen sHsps zum Beispiel eine Rolle in der Zellzyklusregulation, Apoptose, zellulären Entwicklungsprozessen, Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies, Stabilität des Zytoskeletts und Pathogen/Symbionten Beziehungen (Mymrikov et al., 2011; Narberhaus, 2002; Basha et al., 2012).

1.2.4 Substrat-Erkennung/Bindung

Der genaue Mechanismus der Substrat-Erkennung/Bindung ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden. Jedoch ist die Chaperonfunktion sehr eng mit der Oligomerisierung verknüpft, da für isolierte α -Kristallin-Domänen beziehungsweise Konstrukte, deren Oligomerisierung auf der Stufe des Dimers endet, keine oder nur eine sehr reduzierte Aggregationsunterdrückung beschrieben ist (Stromer et al., 2004; Studer et al., 2002; Leroux et al., 1997b; Narberhaus, 2002). Wegen der engen Verknüpfung ist es bis jetzt nicht möglich, einzelne Bereiche der sHsps eindeutig einer spezifischen Funktion zuzuordnen (Haslbeck et al., 2005a).

Nachdem fast alle Bereiche in einem sHsp Oligomer lösungsmittelzugänglich sind, ist es nicht verwunderlich, dass für alle die Bindung zu Substraten postuliert wurde (Jehle et al., 2011). Allerdings scheint aber in keinem Bereich der sHsps durch Substratbindung die Lösungsmittelzugänglichkeit geändert zu werden (Cheng et al., 2008). Vermutlich werden Substrate daher nicht durch eine spezifische Position/Fläche des sHsp Monomers/Dimers erkannt, sondern über das Zusammenspiel mehrerer (schwacher) Interaktionen, die über das ganze Oligomer verteilt und möglicherweise substratspezifisch sind (Haslbeck et al., 2005a; Basha et al., 2012), gebunden.

Um ein (wie oben beschriebenes) sehr großes Substratspektrum von mehreren Hundert unterschiedlichen Proteinen abdecken zu können, muss die Erkennung der Substrate auf ein generelles Prinzip, wie zum Beispiel die Exposition von hydrophoben Flächen in (partiell) entfalteten Polypeptidketten, zurückzuführen sein. Auf der Seite der sHsps konnte gezeigt werden, dass ein Freisetzen von ansonsten verdeckten hydrophoben Flächen mit einer erhöhten Chaperonaktivität einhergeht (Narberhaus, 2002; Lindner et al., 2000, 1998; Yang et al., 1999). Auf der Substratseite ist der Nachweis deutlich schwieriger, da bereits frühe Intermediate auf dem Entfaltungsweg, die für eine detaillierte Analyse sehr schwierig zugänglich sind, durch sHsps erkannt werden (McHaourab et al., 2009; Narberhaus, 2002; Cheng et al., 2008).

Als Interaktionsflächen auf der Seite der sHsps bieten sich vor allem die Kontaktflächen die unter anderem zur Oligomerisierung beitragen und im vollständigen

Oligomer verborgen sind an. Die Kontaktfläche zwischen den beiden Monomeren hingegen scheidet für viele sHsps aus, da sie sehr stabil ist und unter typischen Hitzestressbedingungen intakt bleibt (Haslbeck et al., 1999; Basha et al., 2010). Jedoch gibt es bei der Stabilität dieser Dimerkontakte sehr große Unterschiede zwischen den einzelnen sHsps. So benötigt Hsp26 Bereiche außerhalb der α -Kristallin-Domäne um stabile Dimere zu bilden wohingegen die isolierte α -Kristallin-Domäne von Hsp16.5 aus *M. jannaschii* bereits stabile Dimere in Lösung bildet (Bertz et al., 2010; Chen et al., 2010a).

Die zweite potentielle Oberfläche zur Substratbindung wird aus dem β 8 und β 4 Strang gebildet und im Oligomer durch das konservierte IXI/IXV Motive verdeckt (Braun et al., 2011; van Montfort et al., 2001; Laganowsky et al., 2010). Im dissoziierten Zustand wird vermutet, dass beide Flächen für eine Substratinteraktion zur Verfügung stehen (Jehle et al., 2010; Pasta et al., 2004).

Weitere potentielle hydrophobe Interaktionsflächen bilden die sehr flexiblen (und daher in den Kristallstrukturen zum Teil nicht aufgelöst) phenylalaninreichen Sequenzen der N-terminalen Erweiterung, die ebenfalls für die Substratkomplexstabilität mit verantwortlich gemacht wurden (Braun et al., 2011; Haslbeck et al., 2004b; Plater et al., 1996).

Neben den hydrophoben Interaktionen können auch ionische Interaktionen eine Rolle für die (Langzeit-)Stabilität der Substratkomplexe spielen (Narberhaus, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die negativen Ladungen innerhalb der α -Kristallin-Domäne beziehungsweise die positiven Ladungen in den C-terminalen Bereichen von α -Kristallin eine wichtige Rolle für deren Stabilität beziehungsweise die Chaperonaktivität spielen (Boelens et al., 1998; Plater et al., 1996). Jedoch ist auch hier eine detaillierte Unterscheidung der Einflüsse auf Oligomerisierung und Faltung beziehungsweise direkt auf die Chaperonfunktion sehr schwierig.

1.2.5 Kleine Hitzeschockproteine in *S. cerevisiae*

Für das Studium der Stressantwort in einfachen eukaryotischen Zellen ist die Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, ein beliebtes Modell. Im Cytosol der Bäckerhefe findet man zwei Vertreter der kleinen Hitzeschockproteine (Hsp26 und Hsp42) mit teilweise überlappender Funktion (Haslbeck et al., 2004a). Das größere der beiden Chaperone, Hsp42, wird in der Zelle sowohl unter physiologischen wie auch unter Stressbedingungen exprimiert (Haslbeck et al., 2004a), wohingegen Hsp26 fast ausschließlich bei erhöhten Temperaturen im Cytoplasma in aktiver Form zu finden ist (Haslbeck et al., 1999). Zusammen können sie ein

großes, teilweise überlappendes, Substratspektrum von ungefalteten Proteinen oder teilweise gefalteten Intermediaten binden, die Aggregation verhindern und so das Gleichgewicht zwischen Faltung und Aggregation/Proteinabbau in der Zelle aufrecht erhalten (Haslbeck et al., 1999, 2004a). Auch in der Hefe ist die Beteiligung von kleinen Hitzeschockproteinen an der Organisation des Zytoskeletts (Rahman et al., 1995; Gu et al., 1997) und eine Kernlokalisation (Petko and Lindquist, 1986) postuliert, jedoch bis jetzt nicht näher untersucht.

1.2.6 Hsp26 aus *S. cerevisiae*

Das kleinere der beiden cytosolischen sHsps in *S. cerevisiae*, Hsp26, besitzt innerhalb der 214 Aminosäuren, wie alle Vertreter der Superfamilie, eine homologe Domäne zu α -Kristallin (Aminosäure 95-195). Neben der C-terminalen Erweiterung besitzt Hsp26 eine ungewöhnlich lange N-terminale Sequenzen. Dieser N-terminal vor der α -Kristallin-Domäne gelegene Bereich kann durch einen kurzen glycinreichen Linker (Position 25 - 31) in die eigentliche N-terminale Domäne und die Mittel-Domäne untergliedert werden (White et al., 2006). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die ersten 30 Aminosäuren für die Oligomerisierung und Chaperonfunktion nicht essentiell sind, jedoch den Substratkomplex stabilisieren (Haslbeck et al., 2004b). Der Mittel-Domäne hingegen wird als Thermosensor eine regulatorische Funktion für die Aktivität unter Hitzeschockbedingungen zugeschrieben (Franzmann et al., 2008). Darüber hinaus gibt es aus unterschiedlichen proteomweiter Analysen Berichte über Phosphorylierungen (T42, S90, T163, S208, S211) und einer Glykosylierung (R30) (Albuquerque et al., 2008; Ficarro et al., 2002; Smolka et al., 2007; Gomes et al., 2006; Peixoto et al., 2010). Ob diese Modifikationen jedoch ähnlich wie für andere sHsps Einfluss auf die Oligomerisierung beziehungsweise Chaperonaktivität besitzen, wurde bis jetzt nicht näher untersucht (Nagaraj et al., 2003; Oya-Ito et al., 2006; Narberhaus, 2002).

Sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* besitzt Hsp26, nach thermischer Aktivierung, eine Chaperonaktivität gegenüber einer großen Anzahl an (Modell-)Substraten wie zum Beispiel Insulin, Citratsynthase, Rhodanase oder Glutamatdehydrogenase (Haslbeck et al., 2005b, 1999, 2004b; Franzmann et al., 2008).

Historisch wurde die für die Chaperonaktivität essentielle Oligomerisierung von Hsp26 mittels Größenausschlusschromatographie, analytischer Ultrazentrifugation und Elektronenmikroskopie (vergleiche Abbildung 8) sehr früh als stabiles 24mer interpretiert (Bentley et al., 1992; Haslbeck et al., 1999; Franzmann, 2008; White et al., 2006). Neuere massenspektrometrische Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass neben dem früher beschriebenen 24mer eine Vielzahl wei-

terer Zustände in der Gasphase mit bis zu 42 Untereinheiten existieren (Benesch et al., 2010).

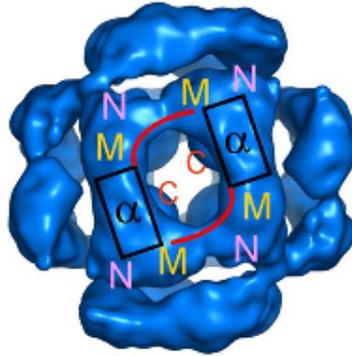


Abbildung 8: Rekonstruktion der Hsp26-Struktur aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit eingezeichneten Kontakten zwischen den Domänen (N-terminale Domäne (N), Mittel-Domäne (M), α -Kristallin-Domäne (α) und C-terminale Sequenzen (C)) (Abbildung aus White et al. (2006) mit Erlaubnis von Elsevier).

Auf Grund der sehr großen räumlichen Abstände zwischen den einzelnen in die Elektronendichte platzierten Dimeren ist eine von vielen anderen sHsps abweichende Organisation des Oligomers postuliert worden. So erwartet man, dass das C-terminale IXV Motiv nicht innerhalb der α -Kristallin-Domäne bindet und dort (wie bei anderen sHsps) die aus $\beta 8$ und $\beta 4$ gebildeten Flächen verdeckt, sondern an die Mittel-Domäne bindet (White et al., 2006).

Bei Aktivierung durch Hitzestress wird das Oligomer, wie bei vielen anderen sHsps auch, destabilisiert (Haslbeck et al., 1999; Benesch et al., 2010), was jedoch scheinbar keine Voraussetzung für die Chaperonfunktion darstellt (Franzmann et al., 2005).

1.3 Fragestellung

Auch wenn die Chaperonfunktion von sHsps seit vielen Jahren bekannt ist (Jakob et al., 1993; Horwitz, 1992) und *in vitro* zum Teil sehr gut charakterisiert ist, so fehlt immer noch ein detailliertes molekulares Verständnis der Dynamik im Oligomer, der Chaperon-Substrat-Interaktion und den Vorgängen in der lebenden Zelle. Auf Grund der sehr komplexen und dynamischen Oligomere stehen bis jetzt nur sehr wenige hochaufgelöste Momentaufnahmen der Oligomere *in vitro* zur Verfügung (Kim et al., 1998; van Montfort et al., 2001). Systematische, über phänomenologische Beschreibungen hinaus gehende Informationen zu Oligomierzuständen *in vivo* und Substratinteraktionen fehlen.

Das Ziel der Arbeit war daher die Voraussetzungen für die Substraterkennung und Bindung mit unterschiedlichen Herangehensweisen näher zu untersuchen.

Zum einen sollten die Fortschritte der Genomsequenzierung der letzten Jahre genutzt werden, um die bislang an Hand weniger Sequenzen aufgestellten Thesen und Beobachtungen zu Sequenzeigenschaften mit einer deutlich größeren Datenbasis zu überprüfen. Außerdem sollten (in Zusammenarbeit mit Prof. Thomas Rattei, Uni Wien) Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf Sequenzebene von sHsps untersucht werden. Es sollte unter anderem überprüft werden, ob über evolutionäre Beziehungen vorhandene funktionelle Gemeinsamkeiten erklärt und Vorhersagen für weitere sHsps getroffen werden können.

Desweiteren sollte, da die Chaperonfunktion von sHsps sehr eng mit der Oligomerisierung verknüpft ist, die Relevanz der bis jetzt *in vitro* sehr gut charakterisierten Oligomerisierung von Hsp26 aus *S. cerevisiae* (White et al., 2006; Benesch et al., 2010; Franzmann et al., 2008) im zellulären Zusammenhang und deren Einfluss auf die Chaperonfunktion näher untersucht werden.

Als dritter Punkt sollte die direkte Wechselwirkung zwischen Chaperon und Substrat mit Hilfe von chemischen Crosslinkern „eingefroren“ werden, um anschließend potentielle Interaktionsstellen mit Hilfe von hochauflösenden massenspektrometrischen Techniken zu analysieren. Mit dieser Methodik sollten die häufig über 1 MDa großen Substratkomplexe analytisch zugänglich gemacht werden. Für diese Art der Analysen sollten neben der Etablierung geeigneter Protokolle für die chemischen Modifikation der Substratkomplexe, deren Aufbereitung und Messung auch geeignete Prozeduren für die Datenanalyse und Fehlerabschätzung im Rahmen diese Arbeit erarbeitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nichts anderes angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigmaaldrich (Schnelldorf, Deutschland) im Reinheitsgrad p.a. bezogen.

Trypsin Gold, MS Grade	Promega, Mannheim, Deutschland
Roti-Mark prestained	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Low-Range-molecular weight marker	BioRad, München, Deutschland
High Pure PCR Product Purification Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
Wizard® Plus SV Mini-Preps DNA purification kit	Promega, Mannheim, Deutschland
1 kb DNA Längenstandard	peQLab, Erlangen, Deutschland
Di-SulfoSuccinimidylGluterat (DSSG)	Creative Molecules, Victoria, Kanada
EDC/NHS aus Amine Coupling Kit	GE Healthcare, München, Deutschland
ETD ₂	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Wasser, HPLC grade	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril, HPLC grade	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure, für LC-MS	Sigmaaldrich, Schnelldorf, Deutschland

2.1.2 Sonstige Materialien und Geräte

Soweit nichts anderes angegeben wurden die am Lehrstuhl für Biotechnologie vorhandenen Routinegeräte verwendet.

Zentrifugenfilter	Millipore, Schwalbach, Deutschland
pH-Teststreifen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SCX-Säulenmaterial	Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland
ZipTip C18	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Acclaim PepMap RSLC C18 trap	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
PepMap RSLC C18 column	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Dionex HPLC Ultimate 3000	Dionex, Idstein, Deutschland

2.1.3 Software

Folgende Software wurde, soweit nichts anderes angegeben, jeweils in der aktuellsten verfügbaren Version verwendet.

Jalview	http://www.jalview.org/
ImageJ	http://rsb.info.nih.gov/ij/
UCSF Chimera	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/
Primer Design	S&E Software, Madison, USA
TexShop	http://pages.uoregon.edu/koch/texshop/
BibDesk	http://bibdesk.sourceforge.net/
MM File Conversion Tool	http://massmatrix.org/
MassMatrix Webservice	http://massmatrix.org/
R	http://www.r-project.org/
iTol	http://itol.embl.de/
Sedfit	http://www.ultracentrifugation.com
Origin	Originlab, Northhampton, USA
Eman	http://blake.bcm.edu/EMAN/
Imagic	http://www.imagescience.de/

2.1.4 Mikroorganismen und ihre Kultivierung

Folgende Mikroorganismen wurden in der Arbeit verwendet:

<i>E. coli</i> HB101	<i>thi-1, hsdS20</i> (r_B^- , m_B^-), <i>supE44, recA13, ara-14, leu B6, pro A2, lacY1, rpsL20</i> (str^r), <i>xyl-5, mtl-1</i>	Promega, Mannheim Deutschland
<i>E. coli</i> Mach1	Δ recA1398 endA1 tonA Φ 80 Δ lacM15 Δ lacX74 hsdR(r_K^- m_K^+)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r_B^- , m_B^-) <i>dcm+</i> <i>Tetr gal 1</i> (DE3) <i>endA</i> <i>Hte</i> [<i>argU ileY leuW CamR</i>]	Stratagen, La Jolla, USA
Δ Hsp26-His	BY4741, Mat a; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0; YBR072w:: <i>his3</i>	Christopher Stratil

Alle *E. coli* Kulturen wurden in LB₀-Medium (Serva, Heidelberg, Deutschland) bei 37 °C mit der entsprechenden Antibiotikakonzentration (100 µg/ml Ampicillin, 35 µg/ml Kanamycin) in Flüssigmedium oder mit 20 g/l Agar (Serva, Heidelberg, Deutschland) versetzt auf Platten kultiviert.

Die *S. cerevisiae* Kulturen wurden in Zusammenarbeit mit Christopher Stratil auf CSM-Platten ausgestrichen und, wenn nicht anders angegeben, bei 30 °C für 2-3 Tage bebrütet. Flüssigkulturen wurden ebenfalls bei 30 °C im Reagenzglasroller oder, bei größeren Volumina, im Umluftschüttelinkubator bebrütet.

Die Zellzahl für Hefe wurde photometrisch bei 595 nm ($OD_{595} = 1$ entspricht $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml (Walker, 1998)) bestimmt.

CSM-Selektionsmedium	6,7 g/l Hefestickstoffbasis
	1-2 g/l Selektionsamino säuremix
	20 g/l Glucose
	H ₂ O _{bidest}
	pH 7,2 (NaOH)
für Platten	20 g/l Bacto Agar

Selektionsamino-säuremix	0,5 g	Adenin
(für die Selektion benutzte Amino-säure wurde jeweils weggelassen)	2,0 g	L-Arginin
	2,0 g	L-Aspartat
	2,0 g	L-Histidin
	10,0 g	L-Leucin
	2,0 g	L-Lysin
	2,0 g	L-Methionin
	2,0 g	L-Phenylalanin
	2,0 g	L-Threonin
	2,0 g	L-Tryptophan
	2,0 g	L-Tyrosin
	2,0 g	Uracil

2.1.5 Vektoren

Folgende Vektoren wurden in der Arbeit benutzt beziehungsweise erstellt:

pQE60-Hsp26	Martin Haslbeck
pQE60-Hsp26 _{S47ET48E}	diese Arbeit
pQE60-Hsp26 _{S144E}	diese Arbeit
pQE60-Hsp26 _{S208ES211E}	diese Arbeit
pQE60-Hsp26 _{S4C}	diese Arbeit
pet28-Hsp26 ₃₀₋₁₉₅	Johannes Beck
p425GPD-Leu-Hsp26 _{FIAsh}	Christopher Stratil
p425GPD-Leu-Hsp26 _{wt}	Christopher Stratil

2.1.6 Primer

Alle Primer wurden bei der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) bestellt.

Hsp26-Hind3-rv	GATCAAGCTTTTACTTACCCCACGATTCTTGAG
Hsp26-Nco1-fw	GATCCCATGGGGTCATTTAACAGTCCATTTTTTGAT
Hsp26-Spe1-fw	GATCACTAGTGGTCATTTAACAGTCCATTTTTTGAT
26-S47ET48E-fw	GCAAAGGATGAGGAAGGCAAGG
26-S47ET48E-rev	CCTTGCCTTCCTCATCCTTTGC
26-S144E-fw	GAATGAAGAGGAGAAAGACAAGG
26-S144E-rev	CCTTGTCTTTCTCCTCTTCATTC
S208ES211E-rev	GATCAAGCTTTTAGTTACCCCCTCTTCTTGCTCAGAAACCTC
S4C-fw	GATCCCATGGGGTCATTTAACACTGTCCATTTTTTGAT

2.2 Crosslinks und Massenspektrometrie

2.2.1 Crosslinks

Zum kovalenten Verknüpfen von Aminosäuren und dem damit verbundenen „Einfrieren“ von potentiellen Interaktionsstellen wurden chemische Crosslinker mit unterschiedlichen Spezifitäten und Linkerlängen verwendet (siehe Kapitel

2.1.1). Da einmal gelöste Crosslinker unter physiologischen pH-Werten lediglich eine Halbwertszeit von wenigen Stunden besitzen (Lomant and Fairbanks, 1976) wurden die Crosslinker stets frisch als 50 mM Stocklösung gelöst und anschließend direkt zum Reaktionsansatz (Tabelle 3) in der angegebenen Endkonzentration (in der Regel 50facher Überschuss bezüglich Konzentration des eingesetzten Chaperons) zugegeben.

	—	Lysozym	ADH	MDH	CS
Chaperon	50 μ M	50 μ M	20 μ M	10 μ M	9,6 μ M
Substrat	—	25 μ M	10 μ M	5 μ M	4,8 μ M
Puffer		40 mM Hepes, pH 7,4			
		1 mM TCEP	2 mM DTT	1 mM TCEP	1 mM
		1 mM Phenanthrolin			
Temperatur	RT	RT	45 °C	45 °C	45 °C
Inkubationszeit	—	30 min	45 min	45 min	60 min
Crosslinker	10fach	50fach	50fach	25fach	300fach
Crosslinkzeit		5 beziehungsweise 10 min			

Tabelle 3: Übersicht Chaperon/Substratkomplexe

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Ansätze durch Zugabe eines geeigneten Quenchers (meist 5fach Gelauftragspuffer) gestoppt und anschließend auf einer SDS-PAGE (Kapitel 2.3.1) aufgetrennt.

2.2.2 Gelextraktion und Verdau

Für die Massenspektrometrie interessante Gelbanden wurden aus coomassiegefärbten Gelen (Kapitel 2.3.2) ausgeschnitten und in ca. 1 mm² große Stücke zerlegt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur Aufarbeitung der Proben wurde ein modifiziertes Protokoll nach Schäfer et al. (2001) verwendet.

Zur Entfernung von Pufferrückständen aus den Gelstücken wurden diese zweimal mit 10 mM NH₄HCO₃ Lösung für je 10 min gewaschen. Anschließend wurde der Überstand abgezogen und die Gelstücke wurden mit einer Mischung aus Acetonitril und dem NH₄HCO₃ Puffer für 10 min geschrumpft. Hierbei ist vor allem darauf zu achten, dass das gewählte Volumen deutlich größer als das der gequollenen Gelstücke ist. Um potentielle Disulfidbrücken zu reduzieren und freie Thiolgruppen anschließend mit Iodacetamid (IAA) zu derivatisieren wurden die Gelstücke mit einer 80 mM DTT Lösung bei 37 °C für 30 min reduziert. Anschließend wurden die freien Cysteine durch Zugabe von 1/10 Volumen 0,5 M Iodacetamid in 100 mM Tris pH 8,2 für 15 min bei Raumtemperatur im Dunklen modifiziert. Um die Reaktion zu stoppen wurde der Überstand abgezogen und mit 1 mM β -Mercaptoethanol gestoppt.

Im Anschluss wurden die Gelstücke im Wechsel mit NH_4HCO_3 und Acetonitril Lösung mindestens sechs mal für je 10 min gewaschen. Als letzter Schritt wurde die Acetonitril Lösung abgezogen und die Gelstücke in der SpeedVac (Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) vollständig getrocknet.

Für den Verdau wurde in Abhängigkeit der Menge an getrockneten Gelstücken 2-75 μl der verdünnten Trypsinlösung (25 ng/ μl) auf die Gelstücke pipetiert und über Nacht bei 37 °C verdaut.

2.2.3 Elution, Anreicherung und Fraktionierung der Peptide

Die verdauten Peptide wurden in fünf Schritten aus den Gelstücken eluiert. In einem ersten Schritt wurden die Gelstücke mit 100 μl NH_4HCO_3 Lösung für 15 min im Ultraschallbad versetzt. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 150 μl Acetonitril versetzt und wiederum für 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Der Überstand enthält die Peptide und wurde in ein neues Eppi überführt. Die geschrumpften Gelstücke wurden anschließend für 15 min im Ultraschallbad in 100 μl Wasser mit 0,1 % Ameisensäure gequollen. Durch Zugabe von 100 μl Acetonitril (und 15 min Inkubation im Ultraschallbad) wurden die restlichen Peptide wieder in den Überstand eluiert und zu dem vorher gesammelten Überstand gegeben. Im letzten Schritt wurden die Gelfragmente nochmals mit 100 μl Acetonitril (für 15 min im Ultraschallbad) vollständig geschrumpft und die Peptide im Überstand mit den vorher gesammelten Fraktionen vereint.

2.2.3.1 Unfraktionierte Probenvorbereitung

Um die Peptide ohne zusätzliche Fraktionierung zu messen wurde ein (Teil-) Volumen in der SpeedVac auf 20 μl (mindestens jedoch auf 1/3 des ursprünglichen Volumens) eingengt. Um den Übertrag von kleinen Gelstücken beziehungsweise sonstigen Verunreinigungen auf die Säulen zu vermeiden wurden die Proben durch 0,22 μm Zentrifugenfilter (Ultrafree Durapore PVDF, 0,22 μm , Millipore, Schwalbach, Deutschland) gefiltert und in Autosamplergefäße aus Plastik (Chromacol, Welwyn Garden City, England) luftblasenfrei umgefüllt.

2.2.3.2 Fraktionierte Probenvorbereitung

Um die Peptide vor der Messung zu fraktionieren beziehungsweise stärker geladene Peptide (zum Beispiel Crosslinks) anzureichern wurde starkes Kationenaustauschsäulenmaterial verwendet. Um eine optimale Bindung an das mit pH 2,8

äquilibrierte Säulenmaterial (Puffer A) zu ermöglichen wurden die Peptidlösungen mit einer 2 %igen Ameisensäure-Lösung angesäuert. Da das Acetonitril die pH-Wertbestimmung mit Indikatorpapier beeinflusst, muss das benötigte Volumen separat mit den entsprechenden verwendeten Mengen an Puffer (Trypsinpuffer, NH_4HCO_3 Puffer und Wasser mit Ameisensäure) experimentell bestimmt werden.

- Puffer A: 7 mM Natriumphosphat pH 2,8
30 % (v/v) Acetonitril
- Puffer B: 7 mM Natriumphosphat pH 2,8
1000 mM NaCl
30 % (v/v) Acetonitril

Anschließend wurden die Peptide auf der Säule mit jeweils 100 μl Puffer A gewaschen und in der Regel in vier Salzstufen (75 mM, 150 mM, 300 mM und 1000 mM) eluiert. Die Eluate wurden anschließend, um eine Entsalzung mit Zip-Tips beziehungsweise eine Trennung auf einer *reversed* Phase Säule zu ermöglichen, in der SpeedVac auf mindestens 1/3 des ursprünglichen Volumens beziehungsweise auf ungefähr 20 μl eingeeengt, um das störende Acetonitril abzutrennen. Die Proben wurden anschließend je nach Volumen entweder direkt in die Autosamplergefäße überführt oder an C18 ZipTips gebunden und nach Angaben des Herstellers entsalzt. Da die entsalzten Proben wiederum mindestens 50 % Acetonitril enthielten mussten diese auf mindestens die Hälfte des ursprünglichen Volumens (maximal 20 μl) im Vakuum eingeeengt werden. Die so aufbereiteten Proben wurden ebenfalls in Autosamplergefäße überführt und wie unter Kapitel 2.2.4 beschrieben gemessen.

2.2.4 Orbitrap-Messung

Für die massenspektrometrische Analyse der Peptide wurde eine LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) mit einer ESI Quelle für sehr geringe Flussraten (Nanospray) genutzt. Die Peptidmischungen wurden mit einer HPLC Ultimate 3000 RSLCnano System (Dionex, Idstein, Deutschland) auf eine Acclaim PepMap RSLC C18 trap column mit 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ geladen und anschließend über eine PepMap RSLC C18 column (75 μm x 150 mm, C18, 2 μm , 100 Å) mit einer Flussrate von 0,2 $\mu\text{l}/\text{min}$ in das Massenspektrometer eluiert. Für die Elution wurde ein linearer Gradient von 5 bis 35 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure über 60 min verwendet. Für die Messungen von quervernetzten Peptiden wurden eine sogenannte „*high-high* Strategie“ verwendet, bei der sowohl der Komplettskan (MS), wie auch die einzelnen Fragmentierungen (MS²) in der Orbitrap Messzelle gemessen wurden und somit sehr hohe Auflösungen und

Massengenauigkeiten erzielt werden konnten. Normalerweise wurde jeweils ein Zyklus bestehend aus einem Komplettscan (Auflösung: 60.000, Messbereich: 300-2.000 Da) und sechs abhängigen Scans gemessen. Dabei wurden jeweils die drei intensivsten Massen des Komplettskans mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) (Isolationsbreite: 3 m/z, Aktivierungsenergie: 35 %, Standardladung: 2, Aktivierungs Q: 0,25, Aktivierungszeit: 30 ms, Auflösung: 7.500) und *higher-energy collisional* Dissoziation (HCD) (Isolationsbreite: 2 m/z, Aktivierungsenergie: 40 %, Standardladung: 2, Aktivierungszeit: 30 ms, Auflösung: 7.500) fragmentiert. Einmal fragmentierte Massen wurden innerhalb der nächsten 30 Sekunden nicht mehr für die erneute Fragmentierung berücksichtigt.

Um eine weitere Anreicherung von potentiell quervernetzten Peptiden zu erreichen wurden bei der Auswahl der zu fragmentierenden Massen lediglich mindestens 3fach positiv geladene Peptide berücksichtigt. Diese zusätzliche Selektion ist möglich, da ein mit Trypsin verdautes Peptid im sauren pH-Wert des Laufmittels mindestens zwei Ladungen (eine am N-Terminus und eine durch das Arginin oder Lysin an der Schnittstelle) tragen sollte. Als Konsequenz sollten verbrückte Peptide mindestens eine Ladung von 4⁺ tragen. Wurde ein äquimolare Mischung aus leichten und deuterierten (schweren) Crosslinkern eingesetzt, so wurden bei einem Teil der Messungen lediglich Massen fragmentiert die ein Duplett aus der Differenz von 6 Deuterium zu 6 Wasserstoff Atomen aufwiesen (6,03766 Da), was bei einer Ladung von 3⁺ bis 6⁺ einer Differenz von 2,01255, 1,50942, 1,20753 und 1,00628 Da entspricht.

2.2.5 Datenkonvertierung

Die in *raw* Dateien gespeicherten LC-MS Läufe wurden mit dem Dateikonvertierungsprogramm von MassMatrix in das von vielen Programmen unterstützte, offene mzXML Dateiformat umgewandelt.

2.2.6 Datenanalyse

Für die Auswertung und Identifizierung von Crosslinks wurde die 64 bit Version des MassMatrix Webservers (Version 1.3.2 mit der MassMatrix Suchmaschine Version 2.4.0 bzw. 2.4.2) verwendet (Xu et al., 2008). In der Tabelle 4 sind die Parameter der einzelnen Suchen zusammengefasst. Leider lassen sich bei MassMatrix für jede Suche lediglich ein Crosslinker, mit einer Reaktivität zwischen zwei Aminosäuren definieren. Aus diesem Grund wurden die Datenanalysen in unterschiedliche Datenbankensuchen aufgeteilt und die Ergebnisse kombiniert.

	DSSG _l	DSSG _h	DSSG _{N-Term}	EDC/NHS
Protease			Trypsin	
Decoy Suche			nein	
Fragmentierung			CID/HCD	
Ionenmodus			positiv	
Nicht monoisotopische Ionen			nein	
Variable Modifikationen			Oxidation am Methionin	
	—	—	D ₆ H ₆	—
Fixe Modifikationen			Carbamidomethyl am Cystein	
Max. Anzahl an Modifikationen			2	
Max. Anzahl Misscleavage			3	
Max. Peptidlänge			40	
Min. Peptidlänge			6	
Peptidtoleranz			±10 ppm	
Fragmenttoleranz			±0,02 Da für HCD und CID	
Kleinste Scores			pp = 5, pp ₂ = 5 und pp _{tag} = 1,3	
Max. Anzahl Crosslinks			1	
Crosslink	K/K	K/K	J/K bzw. J/J	K/D bzw. K/E
Massenänderung	96,02	102,06	96,02	-18,01 Da
Anzahl an Proteinen in db	2	2	2	22

Tabelle 4: Suchparameter für Crosslinksuche mit MassMatrix Webserver

Die Schwierigkeit für die Identifikation von Crosslinks ist, wie bei allen anderen massenspektrometrischen Ansätzen, die korrekte Verifikation beziehungsweise die statistische Abschätzung der Anzahl der falsch positiven Treffer in den Suchergebnissen. Insgesamt wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Überprüfung potentieller Treffer im Rahmen dieser Arbeit verwendet (siehe auch Kapitel 3.3.1 und 3.3.4).

2.2.6.1 Crosslinker mit Isotopenmarkierung

Bei der Verwendung eines äquimolaren Verhältnis aus leichtem und schwerem Crosslinker wurden zur Verifikation aller potentiellen Crosslinks das Isotopenmuster herangezogen. Je nachdem ob es sich um einen leichten oder einen schweren Crosslink handeln sollte, wurde manuell überprüft, ob es sich bei der fragmentierten Precursormasse tatsächlich um den leichten oder schweren Anteil im Duplett handelt und das Verhältnis der korrespondierenden Masse ungefähr dem Verhältnis des eingesetzten Crosslinkers entsprach (vergleiche Abbildung 44). Wichtig ist vor allem die Abgrenzung gegenüber Peptiden mit einem 1 : 2 : 1 Verhältnis was Peptiden mit 2 Crosslinkern entsprechen würde.

2.2.6.2 Crosslinker ohne Isotopenmarkierung

Die Verifikation von Crosslinks ohne Isotopenmarkierung gestaltet sich deutlich schwieriger, da eine eindeutige Überprüfung an Hand des Isotopenmusters nicht möglich ist. Um eine möglichst geringe Anzahl an falsch positiven Treffern zu erzielen wurde hier eine mehrstufige Suche durchgeführt (Abbildung 62). In der ersten Stufe wurden die in der Tabelle 4 angegebene Suchparameter verwendet. Anschließend wurde anhand der potentiellen Peptidtreffer die Peptidtoleranz auf einen Wert angepasst, der 99 % der Treffer enthielt. Mit der neuen Peptidtoleranz wurde wiederum in der zweiten Stufe auf eine Datenbank, die sowohl das korrekte Crosslinkpaar wie auch 21 falsche Sequenzpaare (eine Sequenz rückwärts gelesen und 20 Sequenzen mit einer vertauschten Aminosäuresequenz) enthält, gesucht (Xu et al., 2010). Durch den deutlich größeren Suchraum der falschen Sequenzen lassen sich als Näherung alle Treffer auf der korrekten Sequenz als richtigpositive Treffer (TP) und alle Treffer in den 21 falschen Sequenzpaaren als falschpositive Treffer (FP) sehen (Huttlin et al., 2007). Nun wurde für jedes Experiment ein Grenzwert für den pp_{tag} -score gewählt, dass maximal ein falschpositiver Treffer je 100 Treffer in der korrekten Sequenz bleibt. Dies entspricht somit einer falschpositiven Trefferrate von ≤ 1 %.

Mit den in den zwei Stufen ermittelten Grenzwerten wurde in der dritten Stufe eine erneute Suche durchgeführt. Suchergebnissen mit unterschiedlichen Spezifitäten wurden dann kombiniert und gemeinsam dargestellt.

2.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden

2.3.1 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der quervernetzten sHsp-Komplexe wurden SDS-PAGEs (SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese) mit Auftragspuffer nach Fling and Gregerson (1986) verwendet. Zur besseren Auftrennung wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE mit einem vorangeschaltetem 5 %igem Sammelgel und einem anschließenden 12,5 %igem Trenngel verwendet (Fling and Gregerson, 1986). Die Polymerisation beider Gele wurde mit 10 %igem APS (100 μ l/Gel) und TEMED (10 μ l/Gel) gestartet. Die Auftrennung der Proteine selbst erfolgte bei etwa 30 mA pro Gel (Größe 10 x 8 x 0,075 cm) für ungefähr 45 min in einer vertikalen SDS-PAGE-Elektrophoreseapparatur (Hoefler/Amersham, Uppsala, Schweden). Zur Größenordnung der Proteinbanden wurde jeweils ein Längenstandard (Kapitel 2.1.1) mit aufgetragen.

Die mit Coomassie gefärbten Gele (Abschnitt 2.3.2) wurden gescannt. Anschlie-

ßend wurden bei Bedarf interessante Bereiche für die Massenspektrometrie ausgeschnitten und bei -80°C gelagert.

Auftragspuffer (5x)	300 mM	Tris pH 6,8
	10 % (w/v)	SDS
	50 % (w/v)	Glycerin
	0,05 %	Bromphenolblau
	5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
Sammelgel	40 %	Acrylamid 29:1
	2x SG	(0,4 % SDS, 0,25 M Tris pH 6,8)
Trenngel	40 %	Acrylamid 29:1
	4x TG	(0,8 % SDS, 1,5 M Tris pH 8,8)
Laufpuffer (10x SDS)	1 % (w/v)	SDS
	0,25 M	Tris pH 8,8
	2 M	Glycin

2.3.2 Coomassie-Färbung

Der Nachweis der einzelnen Proteinbanden erfolgte anschließend durch Coomassiefärbung. Dabei wird der blaue Coomassiefarbstoff unspezifisch an Protein gebunden und das Gel selbst kann durch 10 % Essigsäure wieder entfärbt werden. Dazu wird das Gel zunächst in der Fairbanks Färbelösung A (25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure und 0,05 % (w/v) Coomassie Blau R250) gefärbt und anschließend mit Fairbanks D (10 % (v/v) Essigsäure) entfärbt (Fairbanks et al., 1971). Um schneller ein Färbeergebnis zu erzielen wurde das Gel in den jeweiligen Lösungen kurz aufgeköcht.

2.3.3 Analytische Ultrazentrifugation

Alle analytischen Ultrazentrifugationsläufe wurden in Zusammenarbeit mit Alexander Bepperling durchgeführt und ausgewertet.

2.3.3.1 Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe

Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe wurden in einer ProteomLab XL-I Ultrazentrifuge (Beckmann, Krefeld, Deutschland) mit Absorptions beziehungsweise Interferenz Optik durchgeführt. In der Regel wurden 400 µl Probe and 410 µl Puffer in Zellen mit Quarzfenstern, Epon Doppelsektor Mittelstücken mit einer Pfadlänge von 12 mm geladen. Die Proben wurden, wenn nichts anderes angegeben, in einem vier-Loch Beckman-Coulter AN600-Ti Rotor bei 42.000 Upm sedimentiert. Die Sedimentationsfront wurde bei 280 nm beziehungsweise per Interferenz

beobachtet. Die Daten wurden mit dem kontinuierlichen $c(S)$ -Verteilungs Modus von sedfit (Schuck, 2000) individuell beziehungsweise global gefittet.

2.3.3.2 Sedimentationsgleichgewichtsläufe

Sedimentationsgleichgewichtsläufe wurden in einer ProteomLab XL-I Ultrazentrifuge (Beckmann, Krefeld, Deutschland) mit 3 mm Epon 6-Kanal Mittelstücke bei drei unterschiedlichen Geschwindigkeiten (7.000 Upm, 9.000 Upm und 11.000 Upm) und drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml und 0,3 mg/ml) durchgeführt. Die Daten wurden mit dem globalen-fit Modul von Ultrascan (Borries Demeler, San Antonio, University of Texas, Department of Health Sciences, USA) analysiert und nach dem *single species* Model global gefittet.

2.3.3.3 Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe mit Fluoreszenzdetektor

Für die Analyse der Oligomerisierung von Hsp26_{FLAsH} in $\Delta hsp26$ -Hefelysaten wurde die optische Dichte OD₆₀₀ bestimmt und die entsprechende Anzahl an ODs (50 ODs für stationäre Phase und 12,5 ODs für logarithmische wachsende Hefen) geerntet, mit PBS gewaschen und in 200 μ l PBS resuspendiert. Nach dem Aufschluss mit Hilfe von Glasbeads in einer Retsch Schwingmühle MM 400 (Retsch, Haan, Deutschland) für viermal 2 min wurden weitere 200 μ l PBS und Proteaseinhibitor FY (Promega, Mannheim, Deutschland) zugegeben. Nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Zellfragmente und Glasbeads (14.000 Upm, 10 min) wurde der lösliche Überstand mit 1 mM TCEP (Sigmaaldrich, Schnelldorf, Deutschland) für 10 min reduziert. Nach Zugabe des Farbstoffs FLAsH-EDT₂ (Endkonzentration 0,4 μ M, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) wurden die Proben für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und im Anschluss in einer ProteomLab XL-A Ultrazentrifuge (Beckmann, Krefeld, Deutschland) mit Fluoreszenzdetektor (AVIV Biomedical, Lakewood, USA) bei 35.000 Upm sedimentiert (vergleiche 2.3.3.1). Die Analyse der Daten wurde mit Sedfit (Schuck, 2000) durchgeführt und die Sedimentationskoeffizienten auf PBS korrigiert.

2.3.4 Größenausschlusschromatographie

Größenausschlusschromatographieläufe wurden jeweils auf einem Shimadzu HPLC System (Shimadzu, München, Deutschland) mit temperierbarem Au-

tosampler, Säulenofen (Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) UV- und Fluoreszenzdetektor durchgeführt. Die Proben wurden jeweils in dem angegebenen Puffer mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf den angegebenen Säulen Diol300 (YMC, Dinslaken, Deutschland), TSK400pw (TosoHaas, Stuttgart, Deutschland), Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare, München, Deutschland) aufgetrennt.

Der Größenvergleich von Hsp26 mit in Laufpuffer gelösten HPLC Standardproteinen (Sigmaaldrich, Schnelldorf, Deutschland) wurde auf einer Diol300 Säule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in 40 mM Hepes pH 7,5 aufgetrennt. Für die Analyse der zeitabhängigen Oligomerisierungsänderung wurde mit dem Autosampler ausgehend von einer 10 μ M Stammlösung jeweils 12 μ l alle 30 min injiziert. Die UV-Chromatogramme bei 280 nm wurden exportiert und die Retentionszeit der Peak-Spitzen manuell bestimmt und gegen die Inkubationszeit bei der angegebenen Temperatur im Autosampler aufgezeichnet.

Für die Analyse der Salzabhängigkeit von Hsp26_{S4C} wurden 10 μ M der reduzierten Mutante für 30 min im entsprechenden Puffer (20 mM Hepes +/- 50 mM KCl, pH 7,4) inkubiert um die Oligomerverteilung zu erzeugen. Im Anschluss wurde jeweils 10 mM DTT_{ox} beziehungsweise 10 mM DTT_{red} zugegeben und das Protein über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend wurde jeweils ein 20 μ l Aliquot auf eine TSK4000pw Säule bei 44 °C äquilibriert in 20 mM Hepes pH 7,4 mit steigenden Salzkonzentrationen (0 mM, 50 mM und 150 mM KCl) aufgetrennt.

2.3.5 Statische Lichtstreuung

Größenbestimmungen mit statischer Lichtstreuung (MALS) wurden mit einem Shimadzu HPLC System mit Brechungsindexdetektor und Lichtstreuungsdetektor DAWN HELEOS II (Wyatt, Dernbach, Deutschland) durchgeführt. Die zwei unterschiedlichen Hsp26 Oligomerverteilungen wurden auf zwei seriell verwendeten Superdex 200 5/150 (GE Healthcare, München, Deutschland) in 20 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,4 aufgetrennt. Die mit BSA (Sigmaaldrich, Schnelldorf, Deutschland) normalisierten winkelabhängigen Lichtstreuungsdaten wurden mit dem Programm Astra 5.4.3.14 (Wyatt, Dernbach, Deutschland) in Molekulargewichte umgerechnet.

2.3.6 Temperaturübergänge

Um die thermische Stabilität der einzelnen Oligomerverteilungen zu untersuchen wurden temperaturabhängige Änderungen in der Sekundärstruktur beziehungsweise in der Exposition von hydrophoben Flächen untersucht.

2.3.6.1 Circular dichroismus

Mittels Circular dichroismus wurden temperaturabhängige Änderungen bei einer Wellenlänge von 220 nm untersucht, was hauptsächlich Änderungen im Anteil der β -Stränge entsprechen sollte. Dazu wurden jeweils 10 μM der Hsp26 Oligomerverteilungen im entsprechenden Puffer in einer CD Küvette mit einer Schichtlänge von 0,1 cm von 10 °C bis auf 90 °C mit einer Heizrate von 20 °C/h geheizt. Temperaturübergänge wurden in Origin normalisiert und die Übergangstemperaturen wurden mittels Boltzmannfit bestimmt.

2.3.6.2 Sypro-Orange

Änderungen in der Exposition von hydrophoben Flächen wurden mittels temperaturabhängiger Bindung des Sypro-Orange Farbstoffs (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) an unterschiedliche Hsp26 Oligomerverteilungen gemessen. Dafür wurden 2 μM Hsp26 ausgehend von einer 10 μM Stammlösung in eine 150 μl Fluoreszenzküvette in den entsprechenden Puffer mit Sypro-Orange (1:1000 Verdünnung der DMSO Stammlösung) verdünnt. Die Änderung des Fluoreszenzsignals (490 nm / 575 nm) wurde in einem FP-6500 Fluoreszenzspektrometer mit einem Peltierelement ADP-303 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) in einem Temperaturbereich von 8 °C bis 80 °C aufgenommen (Response 4 sek, Sensitivität mittel, Abstanddatenpunkte 0,2 °C, Heizrate 30 °C/h). Um die Bildung von Kondenswasser zu vermeiden wurde die Küvette mit einem konstanten Stickstoffstrom bedampft.

2.3.7 Elektronenmikroskopie und Größenabschätzung

Negativ kontrastierte Transmissionselektronenmikroskopie Aufnahmen wurden in der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie an der Technischen Universität München nach etabliertem Routineprotokoll durchgeführt.

Hsp26 wt beziehungsweise Mutanten wurden ausgehend von jeweils 10 μM Stammlösungen an kohlebeschichtete Kupfernetzchen adsorbiert und anschließend mit 2 % Uranylacetat beziehungsweise Ammoniummolybdat kontrastiert. Getrocknete Proben wurden an einem JEOL JEM 100CX TEM, das mit einer Wolfram-Kathode ausgestattet ist, bei 100 kV und 50000facher Vergrößerung auf Kodak SO-163 Negativ-Filme aufgenommen. Einzelne Partikel wurden von den an einem Flextight X5 Scanner (Hasselblad, Schweden) digitalisierten Negativen mit dem Programm Boxer des EMAN Softwarepakets semiautomatisch ausge-

schnitten. Die Verteilung der Partikelgrößen wurde mit ImageJ anhand der mit dem Programm IMAGIC erstellten Mittelungsbilder ausgemessen.

2.4 Präparative Methoden

2.4.1 Expression Hsp26 wt und Mutanten

Expressionskulturen in LB₀ (in der Regel 2 l) wurden ausgehend von einer 50 ml Übernacht Vorkultur in *E. coli* HB101 (für pQE60 Vektoren) beziehungsweise *E. coli* BL21 DE3 (für pET28 Vektor) angeimpft und bei 37 °C mit dem entsprechenden Antibiotika bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ ≈ 0,6 inkubiert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurde Hsp26 beziehungsweise die korrespondierenden Mutanten über Nacht bei 37 °C exprimiert. Geerntete *E. coli* Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Zellaufschluss

In Puffer A (20 mM Hepes, 5 mM EDTA, 50 mM KCl, pH 7,5) resuspendierte Zellen wurden in Gegenwart eines Protease Inhibitor Mix G (Promega, Madison, USA) in einer Zellaufschlussmaschine BasicZ (Constant Systems, Daventry, England) bei 1,8 kBar aufgeschlossen. Anschließend wurden Zellfragmente und unlösliche Bestandteile bei 18000 Upm bei 4 °C für 45 min abgetrennt.

2.4.3 Reinigung Hsp26 und Vollängen-Mutanten

Hsp26 beziehungsweise Vollängen-Mutanten wurden über drei Säulen (Q-Sepharose, Superdex 200, Resource Q) nach einem modifiziertem Protokoll (Franzmann et al., 2005) gereinigt. Das geklärte Zelllysate wurde in Puffer A (20 mM Hepes, 5 mM EDTA, 50 mM KCl, pH 7,5) auf einen Anionentauscher (Q-Sepharose, ≈ 50 ml Säulenvolumen) geladen, mit ungefähr 10 Säulenvolumen Puffer A gewaschen und anschließend mit einem Salzgradienten auf 50 % Puffer B (20 mM Hepes, 5 mM EDTA, 1 M KCl pH 7,5) in 300 ml eluiert. Hsp26 enthaltende Fraktionen wurden aufkonzentriert (Amicon, 10 kDa, Millipore) und auf eine in Puffer A äquilibrierte Gelfiltrationssäule (Superdex 200, 26/60, GE Healthcare, München, Deutschland) geladen. Fraktionen mit Hsp26 wurden auf eine ebenfalls in Puffer A äquilibrierte Resource Q (6 ml, GE Healthcare, München, Deutschland) geladen und wiederum mit einem Salzgradienten bis

50 % Puffer B eluiert. Fraktionen mit gereinigtem Protein wurden aufkonzentriert und gegen Lagerpuffer (40 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,5) über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die Reinigung von Cysteinmutanten wurde in Gegenwart von DTT durchgeführt und zum Abschluss gegen 40 mM Natriumphosphat-Puffer, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 7,4 dialysiert.

2.4.4 Reinigung Hsp26₃₀₋₁₉₅

Die verkürzte Hsp26 Mutante wurde entsprechend publizierter Protokolle (Chen et al., 2010a) gereinigt.

2.4.5 Herstellung unterschiedlicher Oligomere

Für die Herstellung einheitlicher Oligomere von Hsp26 wurde ausgehend von der Stammlösung (329 µM) Hsp26 in die entsprechenden Zielpuffer verdünnt. Um ein schnelleres Einstellen des Gleichgewichts zu ermöglichen wurden die Proben für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend, um mögliche thermische Veränderungen auszuschließen, über Nacht bei 4 °C gelagert.

Um zwei unterschiedliche Hsp26 Präparationen im identischen Puffer für den UZ-Lauf zu erhalten wurden die zwei Präparationen mit kleinen Oligomeren auf 10 µM Hsp26 in 20 mM Hepes verdünnt und für 30 min bei 37 °C inkubiert wobei anschließend in eine der Proben ausgehend von einer 1 M KCl Lösung eine Endkonzentration von 50 mM KCl zugegeben wurde und die Proben bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert wurden. Für die großen Oligomere wurde Hsp26 im Lagerpuffer für 30 min bei 37 °C äquilibriert, auf Eis abgekühlt und anschließend in 20 mM Hepes beziehungsweise 20 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,4 verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

2.5 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.5.1 Klonierung von Hsp26 Mutanten

Hsp26 Mutationen wurden je nach Lage der Mutation in den DNA Fragmenten in ein oder zwei Stufen amplifiziert. Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Schritt ausgehend von dem pQE60-Hsp26 Plasmid Hsp26 in einem beziehungsweise zwei Fragmenten (vor und hinter der Mutation) mit den in Kapitel 2.1.6 angegebenen Primern und Taq Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland) amplifiziert (in der Regel 30 Zyklen: 45 sek 95 °C, 45 sek 55 °C, 60 sek 72 °C).

Falls notwendig wurden in einer zweiten Stufe die beiden PCR-Produkte gemischt und mit den wt Primern (Kapitel 2.1.6) zu einem Vollängen-Konstrukt vervollständigt. Gereinigte PCR Produkte und Vektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (für pQE60: NcoI und HindIII und für p425GPD mit SpeI und HindIII jeweils von Promega, Mannheim, Deutschland) geschnitten. Die anschließende Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers (Promega, Mannheim, Deutschland) und anschließend wurden *E. coli* Mach 1 mit den Ligationansätzen transformiert.

2.5.2 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis von DNA und Ermittlung der Fragmentgrößen erfolgte mittels 1 %iger Agarosegele in TAE Puffer (50x TAE: 2 M Tris/Acetate, 50 mM EDTA pH 8,0) für 20 min bei 120 V. Um die Größe der mit Auftragspuffer (10x Auftragspuffer: 50 % (v/v) Glycerin, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % (w/v) Xylencyanol) versehenen DNA Fragmente abschätzen zu können wurde jeweils 5 µl 1kb Leiter (peQLab, Erlangen, Deutschland) auf die mit Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, Deutschland) beziehungsweise StainG (Promega, Mannheim, Deutschland) versetzten Gele aufgetragen.

2.5.3 Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben. Die mit Nuklease-freiem Wasser eluierte DNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmid-DNA aus 3 ml Übernacht-Kulturen zu reinigen wurde das Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Kit (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die mit Nuklease-freiem Wasser eluierte DNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.5 Sequenzierung von DNA

Isolierte Plasmide mit einer Konzentration von 30 bis 100 ng/µl wurden zu GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) zum Sequenzieren geschickt.

2.5.6 Chemisch kompetente *E. coli*

Mit 200 bis 400 μl kompetenten *E. coli* Zellen wurde eine 100 ml Kultur angeimpft. Diese wurde bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,5 - 1 bebrütet. Bei Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurden die Zellen mit 2 ml einer 1 M MgCl_2 -Lösung für weitere 10 min versetzt und anschließend pelletiert (5.000 Upm, 5 min, 4 °C). Nach dem Resuspendieren in 20 ml der Lösung A (40 mM Natriumacetat, 100 mM CaCl_2 , 70 mM MnCl_2) wurden die Zellen für 60 min auf Eis gelagert und nochmals abgeerntet (3.000 Upm, 5 min, 4 °C). Dieses Pellet wurde in 4 ml der Lösung A-Glycerin (69 ml Lösung A und 331 ml 87 % (v/v) Glycerin) aufgenommen und aus der Zellsuspension wurden 200 μl Aliquots erstellt, welche mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert wurden.

2.5.7 Chemische Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden 200 μl kompetente *E. coli* Zellen mit dem jeweiligen Plasmid versetzt, gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschritt bei 42 °C für eine Minute wurden die Zellen wieder auf Eis abgekühlt, mit 1 ml LB_0 versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 5.000 Upm für eine Minute abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen resuspendiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.5.8 Chemische Transformation von *S. cerevisiae*

Für die chemische Transformation von *S. cerevisiae* wurden 1 ml Übernacht-Kultur geerntet und der Überstand verworfen. In dem verbleibenden Volumen wurden die Zellen dann resuspendiert und sowohl mit 2 μl Träger-DNA (9,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Lachssperma, Sigmaaldrich, Schnelldorf, Deutschland) wie auch mit 1 μl Plasmid versetzt. Nach Zugabe von 500 μl *plate*-Mix (10 mM Tris, 2 mM EDTA, 100 mM LiAc, 35 % (w/v) PEG 4000, 5 % (w/v) Ethylenglycol) wurde die Probe gevortext und 20 - 40 μl 1 M DTT zugegeben. Die gemischte Probe wurde dann für 6 - 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Hitzeschritt (10 min bei 42 °C) wurden die Zellen geerntet, ausplattiert und für mehrere Tage bei 30 °C inkubiert bis Kolonien sichtbar waren.

2.6 Bioinformatische Methoden

Alle bioinformatischen Analysen wurden in Kooperation mit Prof. Thomas Rattei (Uni Wien) durchgeführt.

2.6.1 Isolation der Sequenzen

Alle Sequenzen die mindestens eine annotierte Instanz der α -Kristallin-Domäne entsprechend dem Domänenmodell PF00011 der PFAM Datenbank (Finn et al., 2008) enthielten wurden aus der *Similarity Matrix of Proteins* (SIMAP) Datenbank extrahiert. Um eine Verfälschung der Untersuchung zu verhindern wurden alle Sequenzen die als "fragment" annotiert waren ausgefiltert. Die verbleibenden Sequenzen wurden zur detaillierten Untersuchung von taxonspezifischen Unterschieden entsprechend der taxonomischen Annotation in der SIMAP Datenbank in 6 Gruppen untergliedert: Archaeen, Bakterien, Pilze, Pflanzen, Metazoen und "verbleibende Eukaryoten".

Um Untersuchungen auf Genomebene durchführen zu können wurde der Datensatz auf sHsps aus fertiggestellten Genomprojekten, die in der PEDANT Datenbank (Walter et al., 2009) vorhanden waren, reduziert. Gab es zu einer Spezies mehr als ein fertiggestelltes Genom wurde der Durchschnitt an sHsps pro Genom berechnet und der Stamm verwendet der diesem Durchschnitt am nächsten lag.

Informationen über die Pathogenität von Bakterien wurde aus der „*microbial genome information database*“ des NCBI (Sayers et al., 2009) übernommen.

2.6.2 Längenverteilung und Aminosäurehäufigkeit

Die Lage und Sequenz der α -Kristallin-Domäne und der flankierenden Bereiche von allen potentiellen sHsps wurde aus der SIMAP Datenbank übernommen und mit selbstgeschriebenen *python* Skripten analysiert. Die Aminosäurehäufigkeit wurde in dem entsprechenden Teil des sHsps (N-terminale Bereiche, α -Kristallin-Domäne, C-terminale Bereiche) basierend auf der relativen Häufigkeit im Vergleich zu allen Proteinen des entsprechenden Organismus berechnet. Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigem Test nach Fisher mit dem Softwarepaket R berechnet.

2.6.3 Phylogenetische Analyse

Die Alignments der drei Teilbereiche (N-terminale Bereiche, α -Kristallin-Domäne, C-terminale Bereiche) wurden mit MUSCLE 3.7 (Edgar, 2004) mit Standardparametern berechnet. Die Matrix der evolutionären Distanzen zwischen den alignierten Sequenzen wurde mit dem Programm *protdis* aus dem PHYLIP Paket (Felsenstein, 2005) ebenfalls mit Standardparametern berechnet, wobei lediglich Sequenzen mit einer minimalen Längen von zehn Aminosäuren bei den terminalen Bereichen berücksichtigt wurden. Die Signifikanz der unterschiedlichen evolutionären Distanzen wurden mit einem Kolmogorov-Smirnov Test aus dem R Softwarepaket berechnet.

Die Gruppierung der flankierenden Sequenzen in unterschiedliche homologe Klassen wurde mit einer selbstgeschriebenen Implementierung einer *connected component clustering* Methode mit unterschiedlichen evolutionären Distanzen durchgeführt.

Phylogenetische Bäume der ausgewählten α -Kristallin-Domänen wurden mit dem Programm neighbor aus dem PHYLIP Programmpaket mit Standardparametern und RAxML Version 7.0.4 (Stamatakis, 2006) mit der *rapid hill-climbing* Methode (-f d) und 100 bootstrap Wiederholungen durchgeführt.

Die resultierenden Bäume wurden mittels iTOL Webserver (Letunic and Bork, 2007) visualisiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Bioinformatische Analyse von sHsps ¹

In der Vergangenheit wurden potentielle sHsps lediglich auf Grund der Homologie zu α -Kristallin als Mitglied der Proteinsuperfamilie annotiert (Caspers et al., 1995). Da die Größen der Genomdatenbanken in den letzten Jahren sehr stark zugenommen haben, sollten in Zusammenarbeit mit Prof. Thomas Rattei (Uni Wien) und mit Hilfe eines Domänenmodells der α -Kristallin-Domäne alle potentiellen sHsps in der „*Similarity Matrix of Proteins*“ (SIMAP), einer großen Sammlung an Sequenzdatenbanken mit nichtredundanten Sequenzen, gesucht und anschließend näher charakterisiert werden.

3.1.1 PFAM Modell PF00011

Zur Extraktion aller potentiellen sHsps aus der SIMAP Datenbank (Rattei et al., 2008) wurde das in öffentlichen Datenbanken verfügbare PFAM Modell PF00011 (Version 23.0) gewählt. Dieses Hidden-Markov-Modell wurde ausgehend von einem Startalignment aus 37 bekannten, zu α -Kristallin homologen Proteinen aus allen Bereichen des Lebens erstellt (vergleiche Abbildung 9). Auf Grund der sehr starken Konservierung und der funktionellen Bedeutung des IXI/V-Motives für die Chaperonaktivität der meisten bisher näher charakterisierten sHsps wurde für die bioinformatischen Analysen ein Modell gewählt, welches dieses Motiv beinhaltet. Möglicherweise fallen dadurch einige Sequenzen, die dieses Motiv nicht enthalten aus der Datenanalyse heraus, was jedoch lediglich einen geringen Prozentsatz betreffen sollte (Poulain et al., 2010). Die Suche nach potentiellen sHsp-Sequenzen in der SIMAP Datenbank resultierte in insgesamt 8714 potentiellen, nicht als „Fragment“ beziehungsweise „unvollständig“ annotierten Sequenzen aus allen Bereichen des Lebens. Im Vergleich zu früheren Studien mit einigen wenigen sHsps (Kappé et al., 2002; de Jong et al., 1993; Waters et al., 2008) beziehungsweise zeitgleich publizierten Untersuchungen (Poulain et al., 2010) mit 4478 Sequenzen stellt dies eine deutlich größere Datenbasis da.

¹Dieser Teil der Arbeit wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit publiziert (Kriehuber et al., 2010) und wird mit Genehmigung der Federation of American Societies for Experimental Biology wiedergegeben.

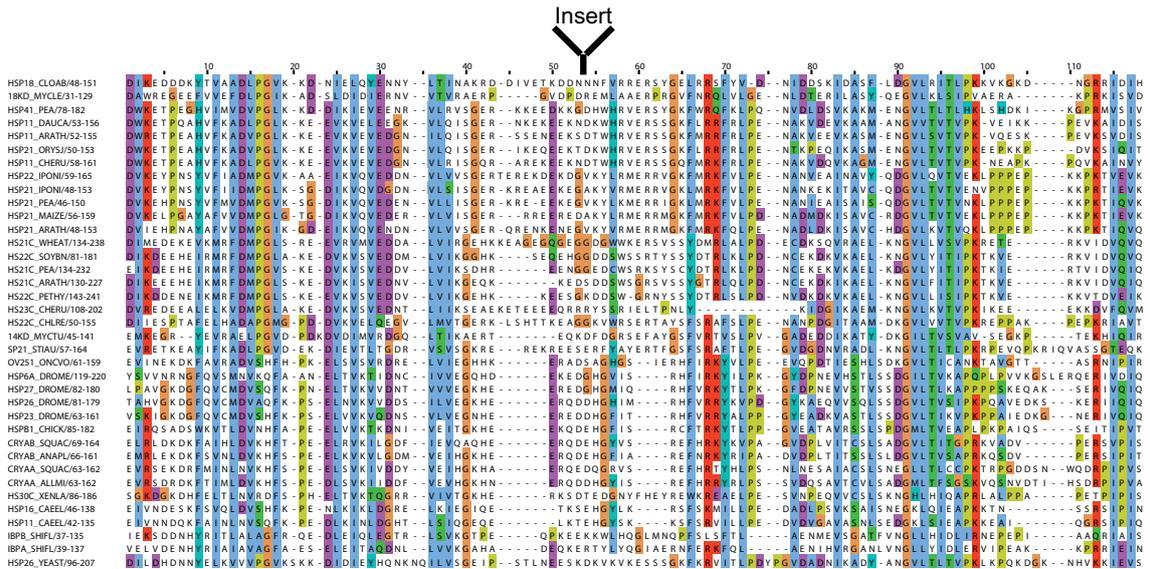


Abbildung 9: Das Startalignment, welches für das Training des PFAM Modell PF00011 verwendet wurde. Das clustal Farbschema hebt konservierte Positionen mit ähnlichen Eigenschaften farblich hervor (alle G (orange) und P (hell grün) sind farblich hervorgehoben; alle anderen Aminosäuren sind abhängig von deren Häufigkeit farblich markiert: hydrophob (blau), basisch (rot), sauer (lila), hydrophil (grün), nicht konserviert (weiß)). Die Position der möglichen Inserts in Pilzen ist markiert.

3.1.2 Analyse der Primärsequenz

In einem ersten Schritt wurden die Eigenschaften der potentiellen sHsps, die sich direkt aus den Sequenzen ableiten lassen, näher untersucht. Um differenzierte Aussagen treffen zu können, wurden die Sequenzen zum einen entsprechend der vorhergesagten Domänengrenzen in N-terminale Bereiche, α -Kristallin-Domäne und C-terminale Erweiterung untergliedert. Zum anderen wurden die Sequenzdaten, um mögliche taxonspezifische Unterschiede detektieren zu können, in sechs taxonomische Gruppen aufgeteilt: Bakterien, Archaeen, Pilze, Metazoen, Pflanzen und „andere Eukaryoten“. Wie in Tabelle 5 gezeigt, entfallen annähernd die Hälfte aller potentieller sHsp Sequenzen auf Bakterien (45 %) gefolgt von Metazoen (22 %) und Pflanzen (19 %). Diese Verteilung spiegelt, neben der Anzahl an sHsps je Genom auch die sequenzierten (und daher in den Datenbanken zu findenden) Organismen wieder.

Eigenschaft	Gesamt	Bakterien	Archaeen	Pilze	Metazoen	Pflanzen	Rest
Proteine	8714	4004	352	469	1935	1658	296
Länge	160.9 (74.8)	145.8 (42.9)	150.1 (50.7)	217.0 (200.0)	166.8 (53.5)	168.8 (70.7)	205.3 (126.9)
Länge α Krist.	94.0 (18.7)	95.4 (15.7)	89.3 (19.6)	99.7 (29.6)	90.8 (17.8)	93.5 (20.5)	92.8 (22.8)
Länge N-term.	55.9 (56.5)	44.6 (31.2)	55.9 (49.6)	93.1 (154.8)	60.9 (32.6)	60.0 (52.0)	93.0 (111.0)
Länge C-term.	10.2 (42.5)	5.7 (19.4)	5.0 (15.5)	20.3 (126.3)	13.2 (28.0)	14.8 (47.3)	16.0 (65.4)

Tabelle 5: Übersicht der Sequenzeigenschaften mit dem PFAM Modell PF00011 identifizierter sHsps. Längenangaben in Anzahl an Aminosäuren. Alle Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung.

Untersucht man nun die gesamte Längenverteilung der extrahierten sHsps, so besitzen sie eine relativ breite Verteilung mit einem Mittelwert von 161 Aminosäuren. Der größte Anteil entfällt dabei auf die konservierte α -Kristallin-Domäne (inklusive IXI/IXV-Motiv) mit durchschnittlich 94 Aminosäuren Länge. Der N-terminal flankierenden Bereich ist mit durchschnittlich 56 Aminosäuren ungefähr fünf mal so lange wie der an das IXI/IXV-Motiv anschließende C-terminale Bereich (vergleiche Abbildung 10 und Tabelle 5). Diese Durchschnittswerte stimmen sehr gut mit früheren Abschätzungen überein (de Jong et al., 1998; Kappé et al., 2002; Waters et al., 1996).

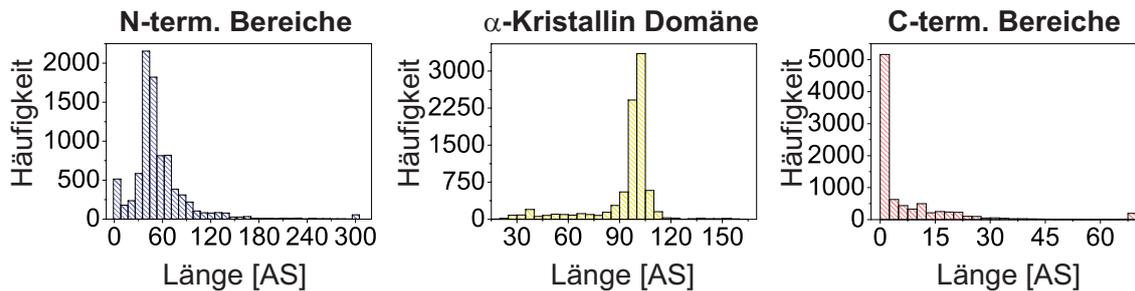


Abbildung 10: Statistische Auswertung der in einzelnen sHsp Bereichen stark variierenden Längenverteilung.

Die Untersuchung der Längenverteilung der α -Kristallin-Domäne untergliedert in die oben beschriebenen sechs taxonomischen Gruppen zeigte, dass für bakterielle sHsps die Längenverteilung mit der geringsten Standardabweichung erhalten wurde (siehe Tabelle 5 und Abbildung 11).

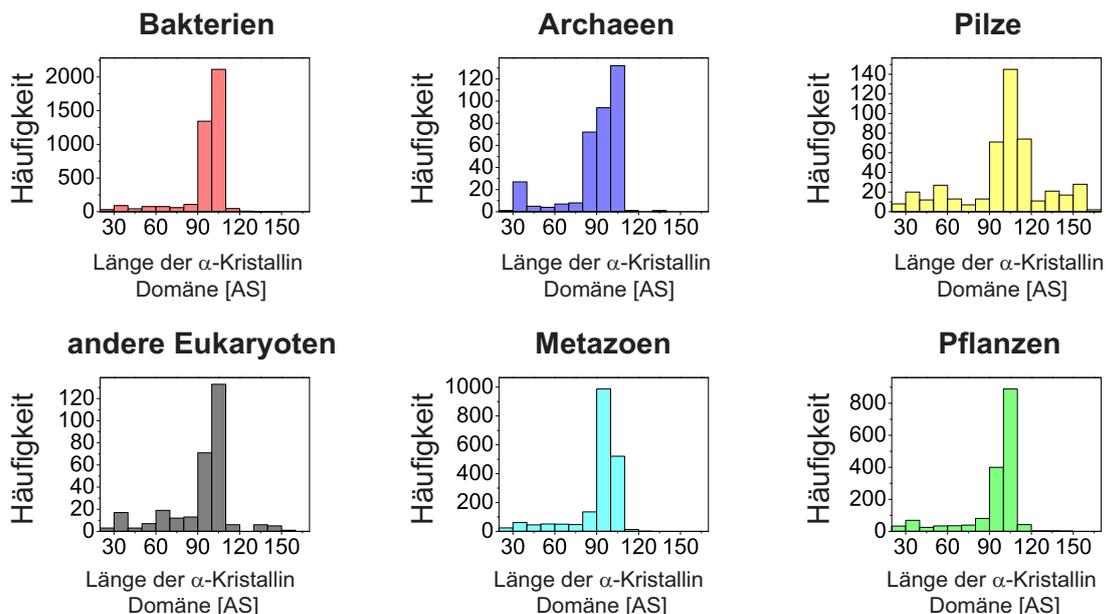


Abbildung 11: Die Längenverteilung der α -Kristallin-Domäne variiert innerhalb der sechs taxonomischen Gruppen unterschiedlich stark.

Mit einer durchschnittlichen Länge von 100 Aminosäuren ist die α -Kristallin-Domäne hingegen in Pilzen am längsten. Die Verschiebung der mittleren Sequenzlänge hin zu größeren Werten wurde hier zum Teil durch Insertionen zwischen den Positionen 40 und 50 des Startalignments (siehe Abbildung 9) begünstigt (Plesofsky-Vig et al., 1992). Bei der Längenverteilung der flankierenden Bereiche erhält man wiederum für Bakterien die Verteilung mit der geringsten Standardabweichung.

Klassifiziert man nun die Bereiche außerhalb der α -Kristallin-Domäne in „normal“ und „ungewöhnlich lang“, wobei „ungewöhnlich lang“ ab einer Länge von mehr als 100 Aminosäure für die N-terminalen Bereiche beziehungsweise mehr als 50 Aminosäuren für die C-terminalen Sequenzen (\approx Durchschnitt + Standardabweichung) gewählt wurde, so fiel auf, dass in Pilzen, Pflanzen und in der Gruppe „andere Eukaryoten“ 21 bis 28 % der Sequenzen ungewöhnlich lang sind (siehe Abbildung 12). Die tatsächliche biologische Relevanz der langen Sequenzen außerhalb der α -Kristallin-Domäne ist bis jetzt jedoch unklar. Eine mögliche Erklärung wurde von Narberhaus (2002) vorgeschlagen. Er postulierte, dass eine funktionale Differenzierung bei steigender Anzahl von sHsps je Genom in höheren Organismen stattfindet (siehe auch Abbildung 14). Ein Beispiel für eine solche funktionelle Weiterentwicklung könnten zum Beispiel Vertreter der Hsp12 Gruppe aus *C. elegans* sein, welche fast ausschließlich aus der konservierten α -Kristallin-Domäne bestehen und keine Oligomere bilden (Leroux et al., 1997a; Kokke et al., 1998). Da sie auch keine Chaperonaktivität aufweisen, ist die biologische Funktion allerdings noch unbekannt (Leroux et al., 1997b,a; Kokke et al., 1998).

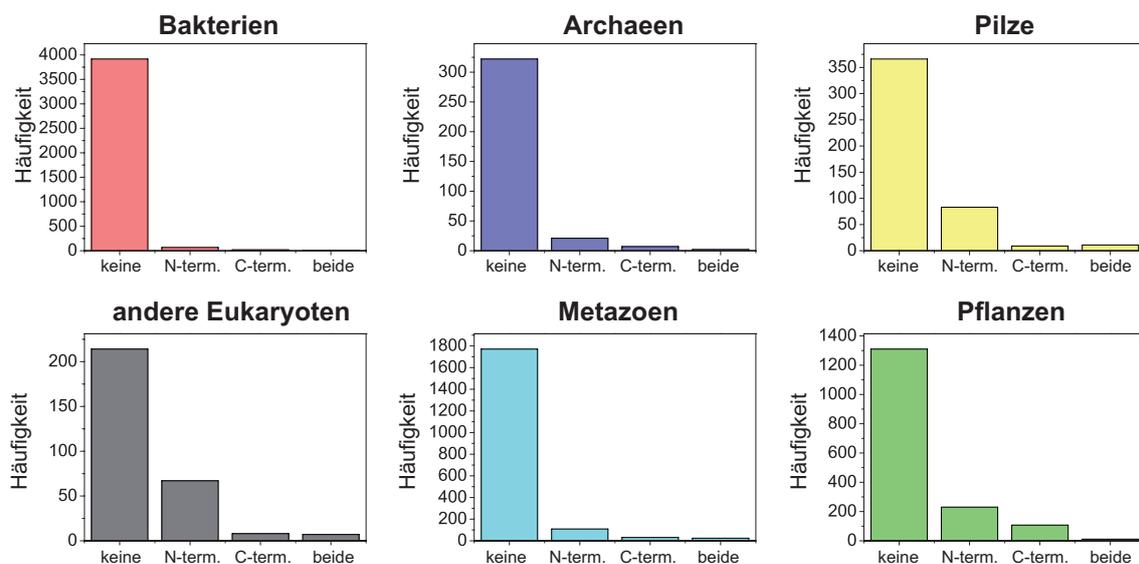


Abbildung 12: Die Anzahl an „ungewöhnlich langen“ terminalen Sequenzen variiert innerhalb der sechs taxonomischen Gruppen.

Um Auffälligkeiten bei den Aminosäurehäufigkeiten festzustellen, wurde der Datensatz auf jeweils ein repräsentatives Genom je Spezies reduziert, so dass eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine unterschiedliche Anzahl an Genomen verhindert wird. So wurde bei der Analyse zum Beispiel lediglich ein Proteom der 23 komplett sequenzierten, in der „pedant-Datenbank“ verfügbaren *E. coli* Stämme verwendet. Diese Einschränkung auf insgesamt 1762 Sequenzen aus vollständigen Genomprojekten ermöglichte zugleich eine Normalisierung der Aminosäurehäufigkeit auf die entsprechende Hintergrundwahrscheinlichkeit im jeweiligen Proteom, wie auch eine detaillierte Analyse der sHsp Häufigkeiten (siehe Kapitel 3.1.3). So wird durch diese Normalisierung auf die unterschiedlichen Stoffwechsel der einzelnen Organismen Rücksicht genommen (Swire, 2007).

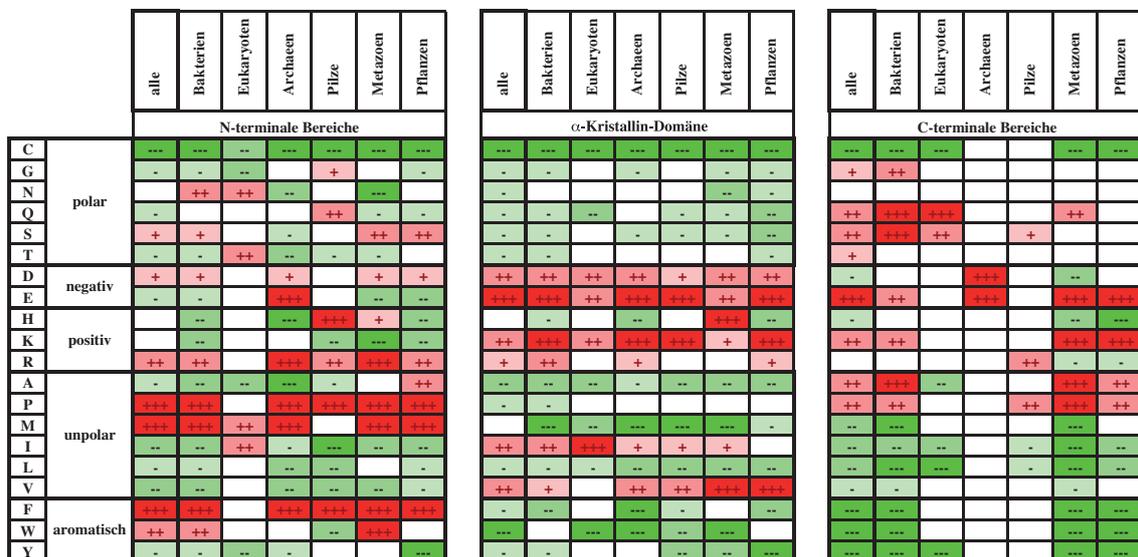


Abbildung 13: Die Verteilung von hydrophoben und polaren Aminosäuren variiert zwischen den einzelnen sHsp Bereichen. Signifikante Abweichungen ($p < 0.001$) der relative Aminosäurehäufigkeit (im Vergleich zum gesamten Genom) sind mit + (rot) beziehungsweise - (grün) gekennzeichnet. Abweichungen $\geq 25\%$ beziehungsweise 50% sind mit ++/-- beziehungsweise +++/-- gekennzeichnet.

Wie die Abbildung 13 zeigt, werden in sHsps im Vergleich zu anderen Proteinen signifikant ($p < 0,001$) weniger Cysteine kodiert. Außerdem sind in der α -Kristallin-Domäne und in den C-terminalen Sequenzen aromatische und polare Aminosäuren unterrepräsentiert. Im Gegensatz dazu sind in den N-terminalen Bereichen Phenylalanine und Tryptophane überrepräsentiert. Interessanterweise werden innerhalb der α -Kristallin-Domäne positiv oder negativ geladene Aminosäuren häufiger als im Durchschnitt verwendet, wohingegen ungeladene polare Aminosäuren unterrepräsentiert sind. Da die Deletion der N-terminalen Bereiche zu einem Verlust der Chaperonaktivität führt, wurde die Überreprä-

sentation von unpolaren/hydrophoben Aminosäuren (insbesondere Phenylalanine) in N-terminalen Sequenzen mit der Substratbindung in Verbindung gebracht (Haslbeck et al., 2004b; Lindner et al., 2000). Das gehäufte Auftreten von Prolinen außerhalb der α -Kristallin-Domäne kann mit den im Allgemeinen reduzierten Sekundärstrukturelementen, beziehungsweise unstrukturierten Bereichen, außerhalb der α -Kristallin-Domäne in Verbindung gebracht werden (van Montfort et al., 2001; Kim et al., 1998; Kappé et al., 2002; Haslbeck et al., 2004a). Insgesamt müssen alle diese Auffälligkeiten bei der Aminosäurehäufigkeit über einen entsprechenden evolutionären Druck entstanden sein. So spielt die reduzierte Anzahl an Cysteinen möglicherweise in dem Kontext der hohen Plastizität der sHsps eine wichtige Rolle und verhindert unter oxidierenden Bedingungen eine Verbrückung von Untereinheiten und die daraus folgende eingeschränkte Dynamik (Franzmann et al., 2005; Bova et al., 2002, 1997).

3.1.3 Anzahl sHsps je Genom

Um die Expansion der Anzahl an sHsps in den Genomen näher zu untersuchen, wurden die mit dem PFAM Modell identifizierten sHsps in je einem repräsentativen vollständigen Genom gezählt. Wie in Abbildung 14 gezeigt besitzen über 90 % der untersuchten Bakterien weniger als fünf sHsps je Genom. In Pilzen hingegen ist der Durchschnitt an sHsps, im Vergleich zu Bakterien und Archaeen, von zwei auf drei sHsps gestiegen.

In den vier fertiggestellten Pflanzengenomen (*Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* und *Arabidopsis thaliana*) hat die Anzahl an sHsps noch weiter zugenommen. So konnten in den entsprechenden Genomen 21, 22, 45 und 50 potentielle sHsps identifiziert werden. Der Grund für diese starke Expansion ist bis jetzt nicht geklärt. Möglicherweise gab es einen evolutionären Druck für die Entwicklung der hohen Anzahl an paralogen beziehungsweise Organellen-spezifischen sHsps. Insgesamt lassen sich die entsprechenden sHsps in mehrere Klassen untergliedern, was auf eine schrittweise Expansion hindeutet (Waters et al., 2008, 1996).

Im Allgemeinen konnte außerdem gezeigt werden, dass, wie für viele andere Proteinfamilien auch, die Anzahl der sHsps mit der Genomgröße korreliert (Archaeen: $r = 0,64$; Bakterien: $r = 0,52$ und Eukaryoten: $r = 0,49$). Dementsprechend besitzen die meisten kleinen Genome (siehe Abbildung 15 für Bakterien) lediglich eine geringe Anzahl an sHsps. Eine Ausnahme dieses Trends ist *Rickettsia felis*. Der ursprüngliche Katzenparasit, welcher aber auch schwerwiegende Krankheiten im Menschen hervorrufen kann, kodiert in seinen 1512 Genen für insgesamt

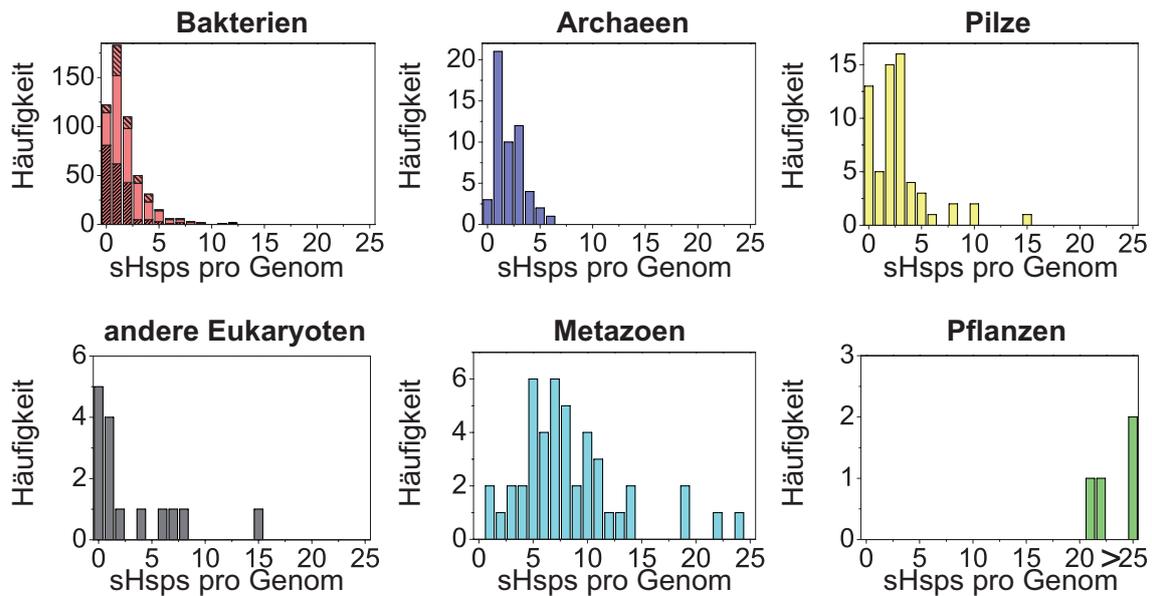


Abbildung 14: Statistische Auswertung der Anzahl an sHsps in komplett sequenzierten Genomen für 6 taxonomische Gruppen: Bakterien (rosa), Archaeen (blau), Pilze (gelb), andere Eukaryoten (grau), Metazoen (türkis) und Pflanzen (grün). Die Anzahl der sHsps in Bakterien ist weiter untergliedert nach pathogen (rosa, stark schattiert), nicht pathogen (rosa) und unbekannt (rosa, leicht schattiert).

sechs sHsps (Perlman et al., 2006).

Untersucht man die Anzahl an potentiellen sHsps in Bakterien näher, so fallen zwei weitere grundsätzliche Tendenzen auf: Zum einen ist die Anzahl an sHsps in pathogenen Bakterien im Allgemeinen geringer als in nicht-pathogenen Vertretern (siehe Abbildung 14: rosa, stark schattiert im Vergleich zu rosa), zum anderen scheint die Anzahl der sHsps weitestgehend gattungsspezifisch zu sein. So weisen zum Beispiel die *Mycoplasmen* (mit insgesamt zwölf pathogenen Arten) keine sHsps auf. Im Gegensatz dazu findet man in *Burgholderien* (mit ebenfalls elf pathogenen Arten) beziehungsweise in *Bradyrhizobien* (mit drei Arten, die endosymbiontisch leben) fünf beziehungsweise acht sHsps.

Eine ähnliche Tendenz ist auch für die Gruppe der „anderen Eukaryoten“ zu beobachten. In dieser Gruppierung fehlen lediglich in pathogenen Organismen sHsps im Genom.

3.1.4 Evolutionäre Entwicklung der sHsps

Als erstes wurde die Konservierung der drei Teilbereiche näher untersucht. Entsprechend der PFAM Klassifizierung wurden in fast allen Sequenzen keine weiteren, nicht sHsp verwandten, Domänen gefunden. Lediglich in 0,6 % der Sequenzen aus den fertiggestellten Genomprojekten wurden weitere Domänen vorher-

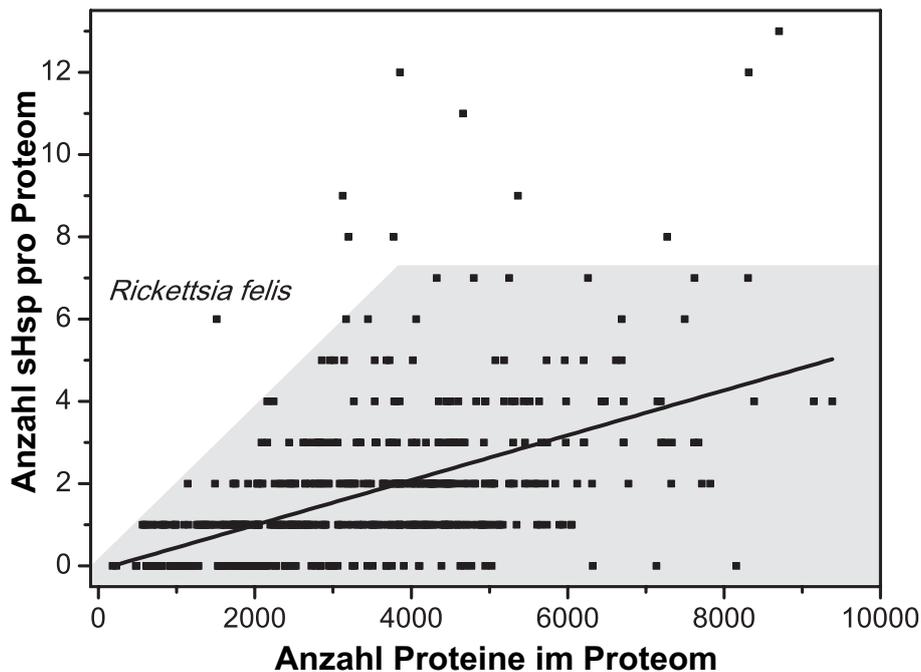


Abbildung 15: Die Anzahl der sHsps in Bakterien korreliert mit der Proteomgröße ($r = 0.52$; $P < 0.00005$; Kendall-Test). Für 532 komplett sequenzierte bakterielle Genome ist die Anzahl der sHsps gegen die Anzahl der kodierten Proteine aufgetragen.

gesagt, die jedoch typischerweise nicht über EST-Daten verifiziert werden konnten und daher vermutlich Artefakte der Genomannotationen darstellten.

Diese Beobachtung hebt den evolutionären Hintergrund relativ stark von anderen Proteinfamilien mit mehreren Domänen ab. Typischerweise differenzieren diese durch die Rekrutierung zusätzlicher, zum Beispiel regulatorischer Domänen, wie es zum Beispiel bei der Entwicklungsgeschichte von Kinasen und Phosphatasen geschehen ist (Vogel et al., 2004; Kannan et al., 2007; Moorhead et al., 2009).

Um die Divergenz der drei sHsp Teilbereiche näher zu untersuchen, wurde ausgehend von einem multiplen Sequenzalignment die durchschnittliche paarweise evolutionäre Distanz berechnet und nach sechs taxonomischen Gruppen aufgeschlüsselt (Abbildung 16). Die evolutionäre Distanz ist dabei ein Maß für die Anzahl an Mutationen innerhalb einer Sequenz. Hierbei bedeutet eine evolutionäre Distanz von „1“ insgesamt 100 Mutationen in 100 Aminosäuren (PAM 100) was auf Grund möglicher Mehrfachmutationen eine Sequenzidentität von 50-60 % bedeutet (Dayhoff et al., 1978).

Insgesamt ergab die Analyse, dass die beiden Bereiche außerhalb der α -Kristallin-Domäne signifikant schwächer konserviert sind als die α -Kristallin-Domäne ($p < 10^{-15}$). Außerdem divergierten die beiden terminalen Sequenzen mit einer signifikant unterschiedlichen Geschwindigkeit ($p < 10^{-13}$). Für Pilze und Archaeen ist

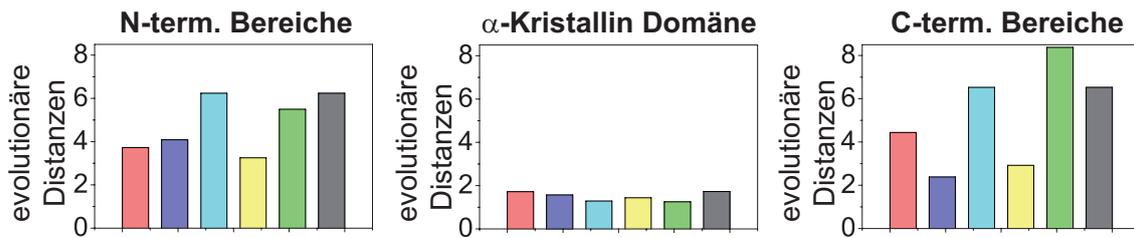


Abbildung 16: Histogramm der evolutionären Distanzen für die sechs taxonomischen Gruppen (Farbcode wie in Abbildung 14: Bakterien (rosa), Archaeen (blau), Pilze (gelb), andere Eukaryoten (grau), Metazoen (türkis) und Pflanzen (grün)).

die Konservierung in den C-terminalen Bereichen höher, wohingegen für alle anderen taxonomischen Gruppen die N-terminalen Sequenzen stärker konserviert sind. Die unterschiedlich starke Konservierung der einzelnen Teilbereiche weist auf einen unterschiedlich starken evolutionären Druck hin und deutet an, dass sich sHsps über die flankierenden Bereiche differenziert haben.

3.1.5 Phylogenetische Entwicklung der α -Kristallin-Domäne

Nachdem oben gezeigt wurde, dass die α -Kristallin-Domäne die stärkste Konservierung und somit den größten evolutionären Druck aufweist, sollte sie geeignet sein, um die Entwicklungsgeschichte der sHsps zu rekonstruieren. Daher wurde auf Basis der annotierten α -Kristallin-Domänen aus den 1762 repräsentativen sHsp Sequenzen ein großer *neighbor-joining*-Baum berechnet. Um eine Darstellung des gesamten Baums überhaupt zu ermöglichen, wurde dieser auf eine schematische Darstellung mit unterschiedlichen Farbcodes (Abbildung 17, 19, 20 und 21) reduziert. Die Einfärbung des phylogenetischen Baums entsprechend der zugrundeliegenden taxonomischen Gruppen (Abbildung 17) zeigt, dass viele Äste von einer Farbe (respektive Taxon) dominiert werden. Diese Beobachtung lässt sich prinzipiell über Spezifizierung und Duplikationsereignisse erklären.

Die Präsenz von zusätzlichen Farben in einzelnen Ästen deutet auf eine Vielzahl von horizontalen Gentransferereignissen zu unterschiedlichen Zeitpunkten hin. Obwohl die Größe des Baums für eine statistische Analyse ungeeignet ist, konnten detailliertere Untersuchungen für ausgewählte Organismen diese Beobachtung bestätigen (Ventura et al., 2007).

Besonders auffällig im Baum (Abbildung 17) ist die Gruppe der Metazoen. Hier findet man alle sHsps in einem Ast des Baums. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass sich alle dazugehörigen sHsps ausgehend von einem einzelnen Vorläufer entwickelt haben und somit die Expansion auf zum Beispiel neun mit dem PFAM Modell identifizierten humanen sHsps (HspB1-HspB9) durch wiederholte

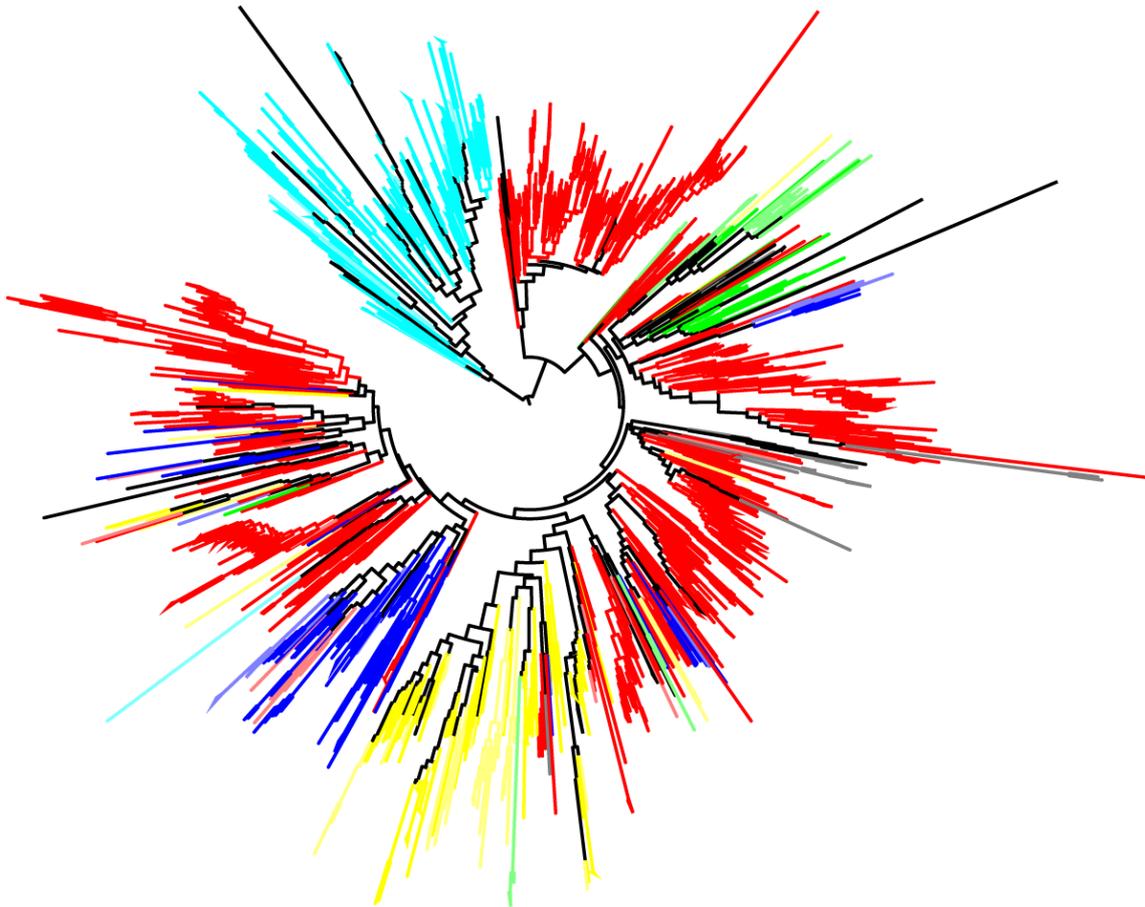


Abbildung 17: Die Entwicklungsgeschichte der α -Kristallin-Domäne spiegelt zum Teil die Entwicklungsgeschichte der Spezies wieder. In einem phylogenetischen Baum der konservierten α -Kristallin-Domäne (gleicher Baum wie in Abbildung 19, 20 und 21) sind Bakterien (rot), Archaeen (blau), Pilze (gelb), Metazoen (türkis), Pflanzen (grün) und andere Metazoen (grau) hervorgehoben. Bereiche mit gemischten Taxa sind schwarz dargestellt.

Genduplikation stattgefunden haben muss (vergleiche auch Abbildung 18). Diese Beobachtung konnte zusätzlich in einem detaillierteren Stammbaum für 382 ausgewählte Sequenzen der Metazoen näher untersucht werden (Abbildung 18).

Die farbliche Hervorhebung von einzelnen Spezies (*C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus*, *R. rattus* und *H. sapiens*) zeigt, dass die meisten Duplikationsereignisse erst nach der Separation in die einzelnen Stämmen der *Bilateria* (Zweiseitertiere) während der sogenannten Kambriums-Explosion stattgefunden haben muss (Bowring et al., 1993). Diese beobachtete späte Duplikation der sHsp Gene stimmt mit der von Waters and Rioflorido (2007) durchgeführten Analyse einiger Algengenome überein. Konsistenterweise gruppieren die humanen sHsps mit den orthologen Sequenzen aus anderen Wirbeltieren. Untersucht man nun die Exonstruktur der neun identifizierten humanen sHsps näher, so lassen sich die Sequenzen in drei Klasse (keine Introns, eine Exongrenze ist Grenze der α -Kristallin-Domäne, keine Exongrenze entspricht der α -Kristallin-Domänen Grenze) entsprechend der Exongrenzen innerhalb der α -Kristallin-Domäne untergliedern (Abbildung 18), was auf eine stufenweise Expansion hindeutet. Ob diese Klassifizierung der humanen sHsps auch *in vivo* eine Relevanz besitzt, beziehungsweise eine strikte funktionelle Untergliederung erlaubt, müssen Experimente in Zukunft zeigen. Für die relativ gut untersuchten Vertreter α B-Kristallin (HspB5) und α A-Kristallin (HspB4) lassen sich zum Beispiel innerhalb der Klasse Heterooligomere beobachten (Horwitz, 2003). Wohingegen zwischen HspB1 (Hsp27) und α B-Kristallin deutliche Unterschiede bei der Assemblierung der Oligomere und dem Verhalten bei der Phosphorylierung existieren (Vos et al., 2008; Ehrnsperger et al., 1999; Braun et al., 2011; Hayes et al., 2009).

Neben den neun in dem aktuellen Stammbaum gezeigten humanen sHsps gibt es noch zwei weitere, zum Teil sehr kontrovers diskutierte potentielle humane sHsps (HspB10/ODF1 und HspB11), die von dem hier verwendeten PFAM Modell jedoch nicht annotiert worden sind (Vos et al., 2008; Kappé et al., 2010; Hayes et al., 2009). Für HspB11/Hsp16.2 ist die fehlende Annotation wohl gerechtfertigt, da in einer NMR Studie gezeigt wurde, dass dieses Protein keine klassische α -Kristallin-Domäne besitzt sondern Ähnlichkeit zu einer Discoidin-Domäne oder zu einer Galaktose-bindenden Domäne aufweist (Ramelot et al., 2009; Kappé et al., 2010).

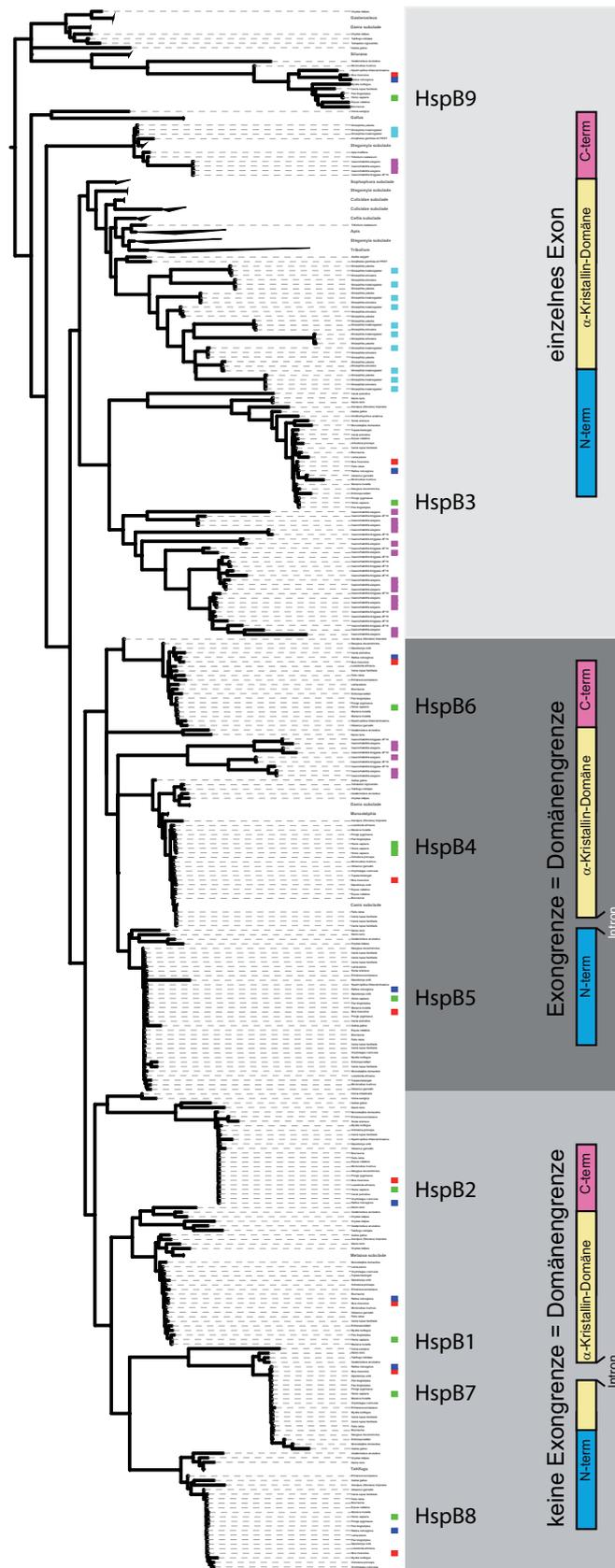


Abbildung 18: Die Evolution der α -Kristallin-Domäne ist durch viele Genduplikationsereignisse geprägt. Der phylogenetische Baum ausgewählter α -Kristallin-Domänen aus Metazoen. Die Spezieszugehörigkeit ist farblich hervorgehoben: Mensch (grün), Maus (rot), Ratte (blau), *D. melanogaster* (rosa), *C. elegans* (türkis). Die humanen sHsps (HspB1 - HspB9) sind entsprechend des vorliegenden Genmodells untergliedert.

3.1.6 Phylogenetische Entwicklung der terminalen Bereiche

Die phylogenetische Untersuchung der an die α -Kristallin-Domäne angrenzenden Bereiche gestaltet sich wegen der sehr heterogenen Länge (siehe Tabelle 5) und der geringen Konservierung (siehe Abbildung 16) schwieriger. Um eine Aussage treffen zu können ob eine gleichzeitige Evolution der flankierenden Bereiche und der α -Kristallin-Domäne selbst stattgefunden hat, wurden ungewöhnliche Sequenzeigenschaften auf einem Stammbaum der konservierten α -Kristallin-Domäne dargestellt (Abbildung 19 in türkis und gelb).

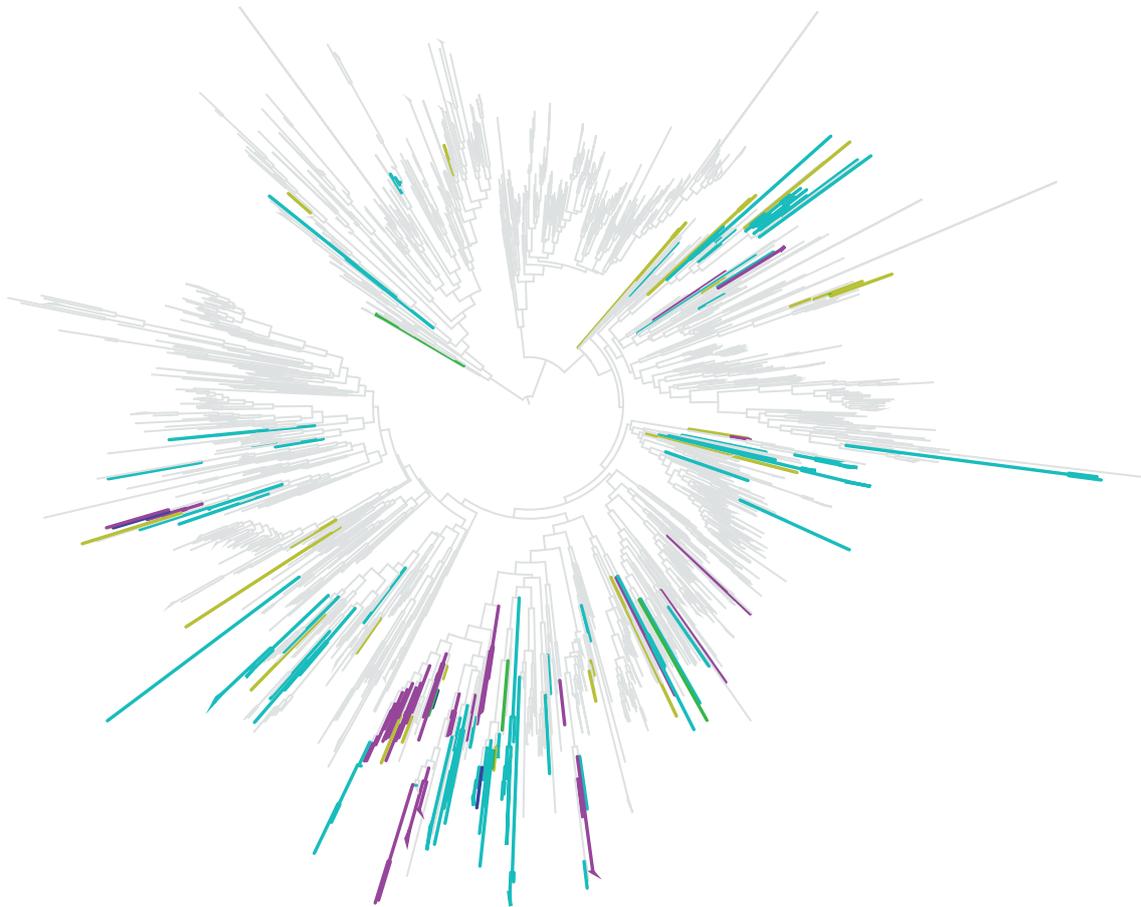


Abbildung 19: Ungewöhnliche Sequenzeigenschaften haben sich nicht parallel zur α -Kristallin-Domäne entwickelt. In einem Stammbaum der konservierten α -Kristallin-Domäne (gleicher Baum wie unter Abbildung 17, 20 und 21) sind ungewöhnlich lange N-terminale Sequenzen (> 100 AS in türkis), C-terminale Sequenzen (> 50 AS in gelb) und α -Kristallin-Domänen (> 120 AS in lila) dargestellt. In der Projektion sichtbare Kombinationen davon sind in grün (ungewöhnlich lange N- und C-terminale Sequenzen) und blau (ungewöhnlich lange N-terminale Sequenzen und α -Kristallin-Domänen) dargestellt.

Das Auftreten von ungewöhnlich langen terminalen Erweiterungen innerhalb des gesamten Baums deutet daraufhin, dass eine unabhängige Entwicklung der α -Kristallin-Domäne und der flankierenden Bereiche stattgefunden haben muss. Hingegen sind ungewöhnlich lange α -Kristallin-Domänen hauptsächlich in ei-

nem Bereich des Baums mit einer Vielzahl von Pilz Sequenzen zu finden (vergleiche Abbildung 19 in lila mit Abbildung 17 gelb). In einem nächsten Schritt wurden die bakteriellen Sequenzen der flankierenden Bereiche nach Sequenzähnlichkeit mit der Hilfe eines Gruppierungsverfahrens in Klassen mit einer maximalen evolutionären Distanz von 100 PAM zusammengefasst (siehe Kapitel 3.1.4). Wie in Abbildung 20 gezeigt, verteilen sich die zwei größten Klassen von ähnlichen N-terminalen Sequenzen auf dem auf der α -Kristallin-Domäne basierenden Stammbaum gleichmäßig. Diese Beobachtung unterstützt die oben begründete These von der unabhängigen Entwicklung der α -Kristallin-Domäne und den N-terminalen Bereichen.

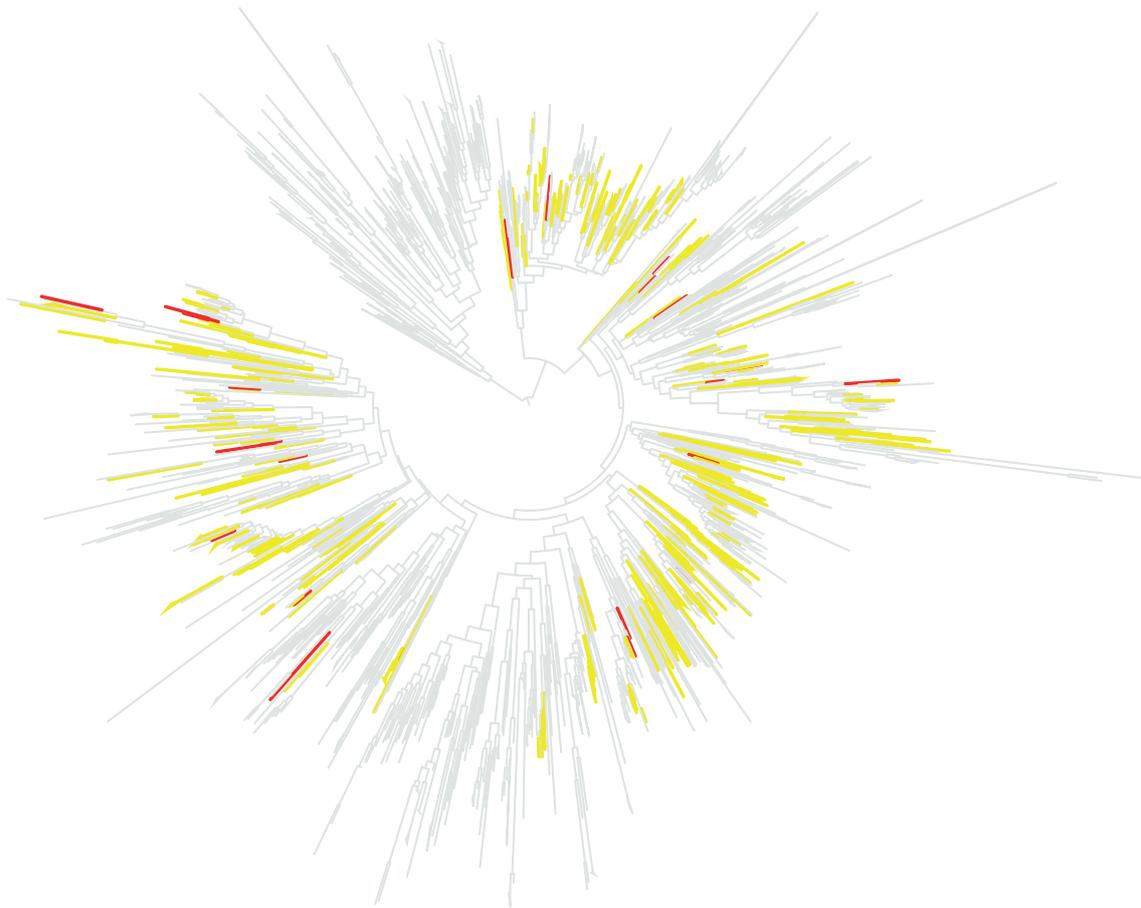


Abbildung 20: Ähnliche N-terminale Sequenzen sind über den gesamten phylogenetischen Baum verteilt. Auf einem Stammbaum der konservierten α -Kristallin-Domäne (gleicher Baum wie unter Abbildung 17, 19 und 21) sind die zwei größten Cluster (rot und gelb) bakterieller N-terminaler Sequenzen eingezeichnet. Die Bereiche außerhalb der α -Kristallin-Domäne wurden unabhängig mit einer maximalen evolutionären Distanz ≤ 100 PAM zusammengefasst.

Da auch die evolutionären Distanzen zwischen N- und C-terminalen Sequenzen signifikant unterschiedlich sind (Abbildung 16), sollte in einer weiteren Untersuchung der Zusammenhang zwischen der Entwicklung der beiden flankierenden Bereiche untersucht werden. In Abbildung 21 wurde daher die größte bakterielle

N-terminale Klasse (vergleiche Abbildung 20) zusammen mit dem größten bakteriellen C-terminalen Cluster auf einem Stammbaum der α -Kristallin-Domäne farblich hervorgehoben. Auch hier zeigt sich eine weitgehend gleichmäßige Verteilung der beiden terminalen Cluster über den gesamten Stammbaum, wobei der Überlapp zwischen den beiden Klassen (Abbildung 20 in grün) nicht von einer statistischen Verteilung abweicht.

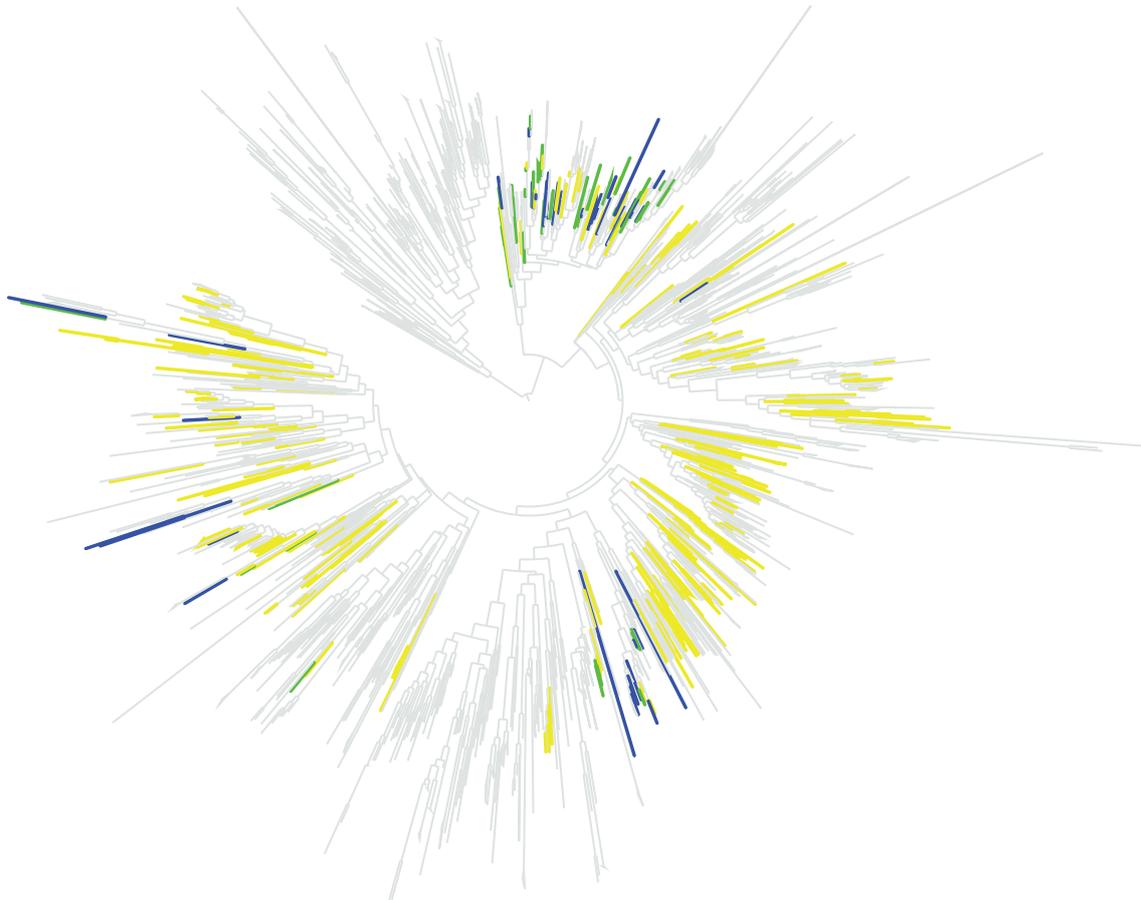


Abbildung 21: N- und C-terminale Sequenzmerkmale haben sich nicht parallel entwickelt. Auf einem Stammbaum der konservierten α -Kristallin-Domäne (gleicher Baum wie unter Abbildung 17, 19 und 20) sind ein Cluster von ähnlichen N-terminalen Sequenzen (gelb) und C-terminalen Sequenzen (blau) gezeigt. Das Auftreten beider Cluster in einer Sequenz ist in grün gekennzeichnet.

Diese Beobachtungen lassen zusammen mit den unterschiedlichen evolutionären Distanzen (vgl. Abbildung 16) auf eine unabhängige Evolution der flankierenden Bereiche und der konservierten α -Kristallin-Domäne schließen. Diese Schlussfolgerung ist interessant, da die flankierenden Bereiche für die Oligomerisierung und Chaperonfunktion der sHsps essentiell sind (Chen et al., 2010a; van Montfort et al., 2001; Haslbeck et al., 2004b). Nachdem ähnliche flankierende Sequenzen in allen Bereichen des Baums gefunden werden konnten und es keine Indizien für ein gehäuftes Auftreten von horizontalen Gentransfers gibt, deutet dies darauf hin, dass die flankierenden Sequenzen mehrfach parallel „erfunden“ wurden. Zusammen mit den Genduplikationsereignissen sind so möglicherweise unterschiedliche spezialisierte sHsps selektiert worden.

3.1.7 Zusammenfassung bioinformatische Analyse von sHsps

Um die evolutionäre Vergangenheit der sHsps näher zu untersuchen, wurden insgesamt mehr als 8000 potentielle sHsps mit dem PFAM Modell PF00011 aus der SIMAP Datenbank extrahiert. Eine Analyse des großen Datensatzes zeigte, dass viele Beobachtungen wie zum Beispiel Längenverteilung, Aminosäurehäufigkeiten oder Anzahl der sHsps je Genom, die früher bereits an isolierten Sequenzen/kleinen Gruppen untersucht wurden, auch für den großen Datensatz ihre Gültigkeit besitzen.

Besonders auffällig ist dabei, dass sich die Bereiche außerhalb der α -Kristallin-Domäne unabhängig von dieser entwickelt haben. Dies ist vor allem im Bezug auf die Oligomerisierung beziehungsweise der damit eng verknüpften Chaperonaktivität interessant. Die flankierenden Sequenzen scheinen auf Grund evolutionären Drucks mehrfach parallel entwickelt und bezüglich ihrer Funktion selektiert worden zu sein.

3.2 Oligomerisierung von Hsp26

Die Chaperonfunktion von kleinen Hitzeschockproteinen ist sehr eng mit deren Oligomerisierung gekoppelt (Haslbeck et al., 2005a; Studer et al., 2002; Leroux et al., 1997b; Narberhaus, 2002). Auch für Hsp26 wurde gezeigt, dass die Aggregationsunterdrückung mit verkürzten, nicht mehr oligomeren Varianten *in vitro* nicht mehr möglich ist (Stromer et al., 2004). Zusätzlich zu dem Oligomer wird, für eine vollständige Aktivität *in vitro*, eine thermische Aktivierung benötigt (Franzmann et al., 2005, 2008; Haslbeck et al., 1999), die unabhängig von der Destabilisierung der Oligomere beschrieben ist (Franzmann et al., 2005).

3.2.1 Oligomerisierung *in vivo*

Um die Oligomerisierung von Hsp26 in der Zelle beziehungsweise unter möglichst nativer Umgebung näher zu untersuchen wurde in einem $\Delta hsp26$ Hefestamm ein C-terminal mit einem Tetracystein-*tag* (Griffin et al., 1998) modifiziertes Hsp26 Konstrukt (Hsp26_{FIA_{SH}}) konstitutiv exprimiert. Diese Modifikation erlaubt das Einbringen eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs in lebende Zellen beziehungsweise Zelllysaten und ermöglicht so mit Hilfe einer analytischen Ultrazentrifuge mit Fluoreszenzdetektor eine Größenabschätzung unter annähernd nativen Bedingungen in Hefelysat. Wie in Abbildung 22 gezeigt konnte für Hsp26_{FIA_{SH}} im Vergleich zu einem Kontrollplasmid mit Hsp26_{wt} in Zelllysaten aus stationären Hefezellen nach Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs ein Oligomer mit einem korrigiertem Sedimentationskoeffizient von $S_{20W} \approx 24$ S detektiert werden.

Da Viskosität und Dichte des verdünnten Zelllysats nicht experimentell bestimmt werden konnten, wurden für die Normalisierung des Sedimentationskoeffizienten Werte des Puffers (PBS) verwendet. Obwohl der gemessene Sedimentationskoeffizient somit nur die Untergrenze darstellt, ist er größer als der ursprünglich für das gereinigte Protein gemessene Sedimentationskoeffizient von ≈ 22 S (Franzmann et al., 2005; Franzmann, 2008). Der größere Sedimentationskoeffizient kann grundsätzlich durch Zunahme der molekularen Masse (entspricht Zunahme der Anzahl an Untereinheiten im Oligomer) beziehungsweise Änderung der Form/Oberfläche des Oligomers entstanden sein. Aus vergleichbaren Experimenten für logarithmisch wachsende Hefezellen beziehungsweise hitzestressierten Zelllysaten konnten keine eindeutigen Spezies isoliert werden. Die hier beobachteten Sedimentationsläufe deuteten auf deutlich größere, sehr heterogene Oligomere, Substratkomplexe oder Aggregate hin.

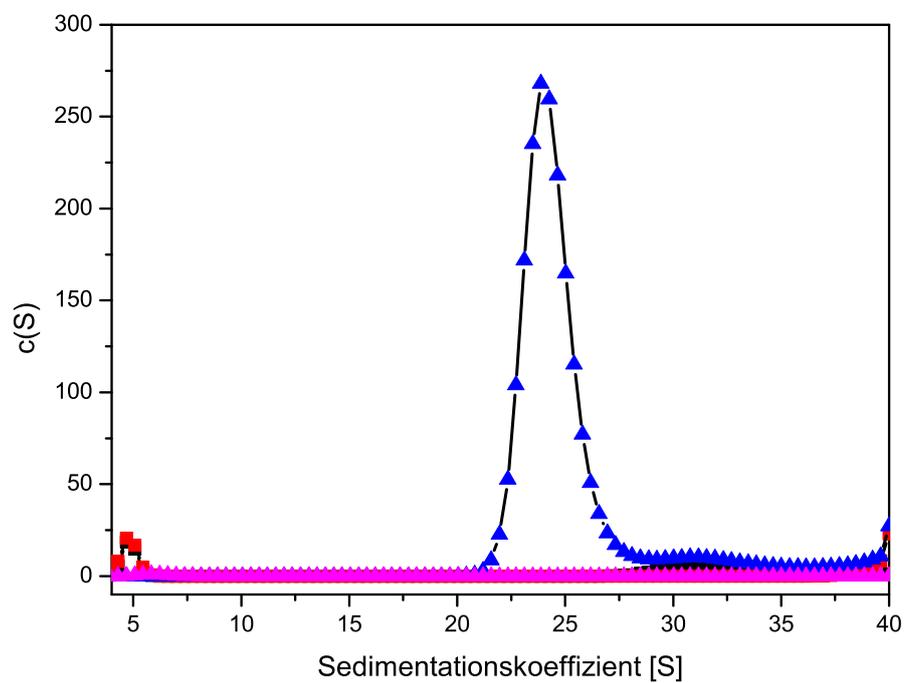


Abbildung 22: Relative $c(S)$ Verteilung von fluoreszenzmarkiertem Hsp26 in Hefelysaten: stationär gewachsene $\Delta hsp26$ Hefelysate mit Expression von p425-GPD-Hsp26 (schwarz) beziehungsweise p425-GPD-Hsp26-FlAsH (magenta). Nach Zugabe von EDT₂: Hsp26_{wt} (rot) und Hsp26_{FlAsH} (blau).

3.2.2 Oligomerisierung *in vitro*

Um die oben beschriebene Diskrepanz zwischen dem Sedimentationsverhalten von Hsp26 in Zellysats und als gereinigtes Protein näher zu untersuchen, wurde Hsp26 in unterschiedlichen etablierten Lager- und Assaypuffern (40 mM Hepes und 40 mM Hepes, 50 mM KCl) (Franzmann et al., 2005; Haslbeck et al., 1999) sedimentiert (Abbildung 23). In dem Lagerpuffer (40 mM Hepes, 50 mM KCl, pH = 7,4) beziehungsweise Puffer mit höheren Salzkonzentrationen (40 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH = 7,4; Daten nicht gezeigt) bildete Hsp26 eine zu Abbildung 22 vergleichbare Oligomerverteilung mit einem Sedimentationskoeffizienten von $S_{20W} \approx 24$ S.

Wurde jedoch Hsp26 in einen salzfreien Puffer (40 mM Hepes) verdünnt, entstand während des UZ Laufs im geringen Maße eine zusätzliche Spezies mit einem Sedimentationskoeffizienten von $S_{20W} \approx 15$ S. Durch Verlängerung der Inkubationszeit in salzfreiem Puffer beziehungsweise Erhöhung der Temperatur während der Inkubation (30 min bei 37 °C) vor dem UZ Lauf ließ sich das Oligomergleichgewicht vollständig zur kleineren Spezies verschieben. Da dieser Prozess bei höheren Temperaturen in einem kurzen Zeitraum (≤ 30 min) stattfand, und fast alle Aktivitätsassays mit denaturierten Modells substraten und Untereinheitenaustauschraten für Hsp26 (wie für viele andere Chaperone auch) in salzfreiem Puffer gemessen wurden (Franzmann et al., 2005; Haslbeck et al., 1999; Stromer et al., 2004), müssen die Einflüsse des gewählten Puffersystems auf die Oligomerisierung und damit zusammenhängende Einflüsse auf die Chaperonaktivität geklärt werden.

Im Allgemeinen werden sHsps ausgehend von einem Dimer zu höheren Oligomeren assembliert, wobei neben dem vollständigen Oligomer auch Oligomere mit zusätzlichen beziehungsweise fehlenden „Bausteinen“ beobachtet werden können. (Braun et al., 2011; Stengel et al., 2010; Benesch et al., 2010). Die Möglichkeit das Oligomerisierungsgleichgewicht zwischen verschiedenen stabilen Zuständen verschieben zu können, wirft auch bei Hsp26 die Frage nach potentiellen Zwischenstufen bei der Assemblierung des Oligomers auf. Bis jetzt konnten lediglich zwei Zustände mit einer unterschiedlichen Anzahl an Untereinheiten, das Dimer und Oligomere aus potentiell 24 Untereinheiten (Haslbeck et al., 1999; White et al., 2006) näher charakterisiert werden. Auch wenn in dem Oligomer von White et al. (2006) eine gewisse Dynamik beschrieben wurde, ist man dabei bis jetzt von einer konstanten Anzahl an Untereinheiten ausgegangen. Neuere massenspektroskopische Untersuchungen deuten jedoch auf eine deutlich breitere Verteilung hin (Benesch et al., 2010).

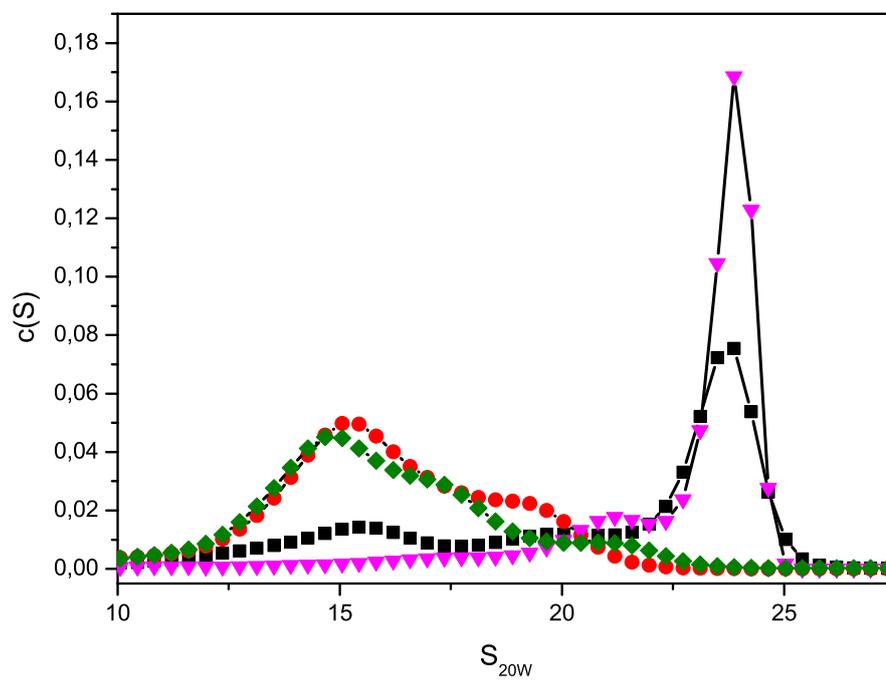


Abbildung 23: Relative $c(S)$ Verteilung von je $10 \mu\text{M}$ Hsp26 in Standardaggregationsassypuffern: Lagerpuffer (40 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,4: rosa), 40 mM Hepes (schwarz), 40 mM Hepes über Nacht (grün) und in 40 mM Hepes bei 37°C für 30 min äquili-
briert (rot).

Da die Verteilung des Sedimentationskoeffizienten in Abwesenheit von Salz relativ breit ist (Abbildung 23), sollte zusätzlich zur Salzkonzentration die pH-Abhängigkeit der Oligomerisierung untersucht werden. Der aus historischen Gründen im sHsp Feld etablierte Hepes-Puffer besitzt einen pK_S -Wert von 7,55 bei 20 °C (Good et al., 1966) und puffert somit in dem für biologische Systeme wichtigen Bereich von ungefähr 6,8 bis 8,2. Die Analyse der analytischen Ultrazentrifugationsdaten (Abbildung 25) deutete darauf hin, dass sich das Oligomerisierungsgleichgewicht, ähnlich wie mit Salz, durch Erhöhen des pH-Werts zu größeren Oligomeren verschieben ließ. Eine ähnliche Beobachtung konnte für α B-Kristallin gemacht werden. Unter physiologischen Bedingungen ist dort das C-terminale IXI-Motiv fast vollständig an die durch β 4 und β 8 Strang gebildete hydrophobe Fläche gebunden und stabilisiert so das Oligomer. Wohingegen bei einer Erniedrigung des pH Werts diese Kontakte geschwächt werden und Änderungen im Oligomer auftreten (Jehle et al., 2010).

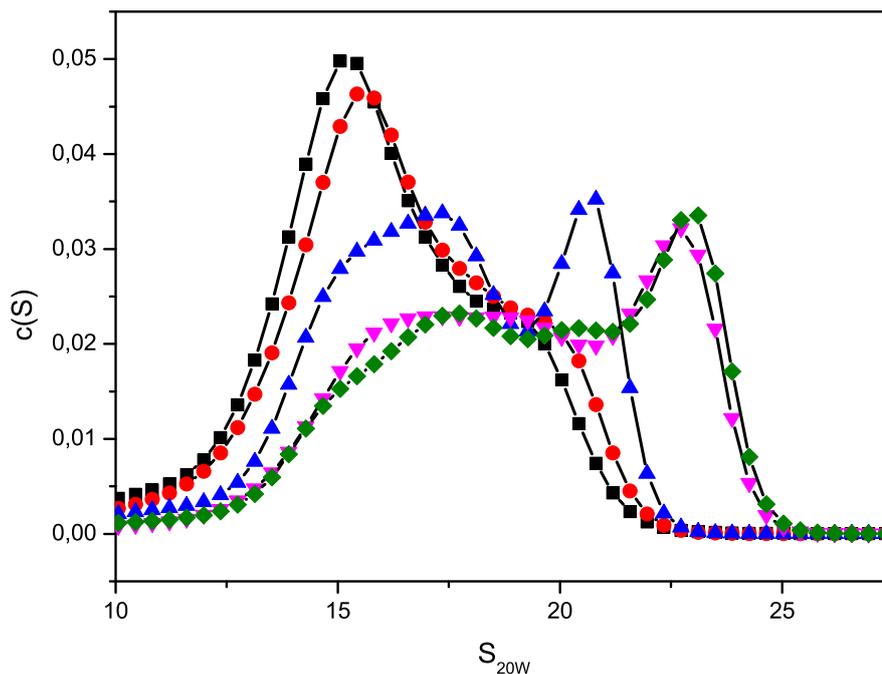


Abbildung 24: Relative $c(S)$ Verteilung von je 10 μ M Hsp26 in 40 mM Hepes bei unterschiedlichen pH-Werten: pH 7,4 (schwarz), pH 7,6 (rot), pH 8,0 (blau), pH 8,2 (rosa) und pH 8,5 (grün)

Um zu testen, ob sich die Oligomerverteilung weiter in Richtung kleinerer Spezies verschieben lässt wurde Hsp26 ausgehend vom Lagerpuffer (40 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,4) in destilliertes Wasser mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen (0 mM, 10 mM, 25 mM und 50 mM KCl) verdünnt, für 30 min bei 37 °C

inkubiert und anschließend in der analytischen Ultrazentrifuge sedimentiert. Die resultierenden Verteilungen zeigten, dass das Oligomerisierungsgleichgewicht von Hsp26 zwischen $S_{20W} \approx 9$ und 26 S (Abbildung 25) verschoben werden konnte.

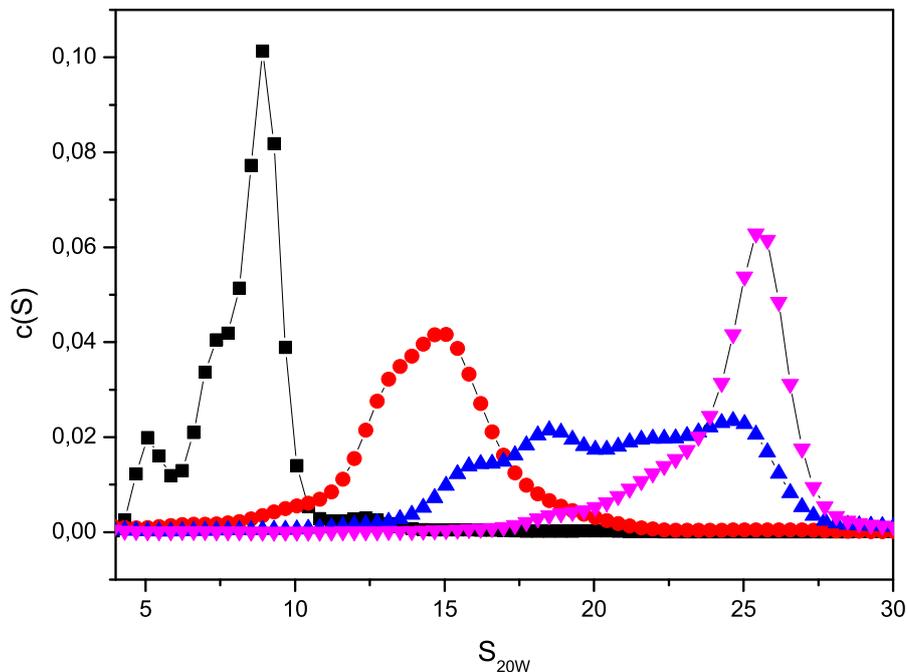


Abbildung 25: Relative $c(S)$ Verteilung von je 10 μM Hsp26 mit steigenden Konzentrationen an KCl: 0 mM (schwarz), 10 mM (rot), 25 mM (blau), 50 mM (magenta).

Die in den bisherigen Experiment beobachteten unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten deuten darauf hin, dass sich das Oligomerisierungsgleichgewicht (oder die Form) durch Zugabe von unterschiedlichen Salz- beziehungsweise Pufferkonzentrationen über einen sehr weiten Bereich beeinflussen lässt. Die zunehmende Stabilisierung größerer Oligomere bei steigenden Salzkonzentrationen deutet grundsätzlich auf die Stabilisierung hydrophober Interaktionen hin. Da die Chaperonaktivität jedoch bei sHsps mit der Freisetzung von hydrophoben Flächen einhergeht (Narberhaus, 2002; Lindner et al., 2000, 1998; Yang et al., 1999) sollte der Einfluss der geänderten Oligomerisierung auf die Chaperonaktivität getestet werden.

Um die Chaperonaktivität *in vitro* zu testen, muss auf die Untersuchung der Aggregationsunterdrückung eines Modellsstrats zurückgegriffen werden. Da die Aggregation der Modellsstrate jedoch sehr sensitiv für Änderungen der Assayparameter sind (Buchner et al., 1998), müssen die Vergleiche in einem ein-

heitlichen Puffersystem durchgeführt werden. Dies setzt jedoch voraus, dass die unterschiedlichen Oligomere hinreichend lange stabil in dem entsprechenden Reaktionspuffer sind.

Daher wurde die Änderung der Oligomerisierung über die Zeit mit Hilfe einer analytischen Größenausschlusschromatographiesäule gemessen. Dabei wurde Hsp26 jeweils in dem entsprechenden Startpuffer äquilibriert und anschließend entweder mit 50 mM Salz versetzt beziehungsweise in den entsprechenden salzfreien Puffer verdünnt und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde dann jeweils ein Aliquot entnommen, auf der Größenausschlusschromatographiesäule aufgetrennt und die Retentionszeit der Peakspitze analysiert (Abbildung 26).

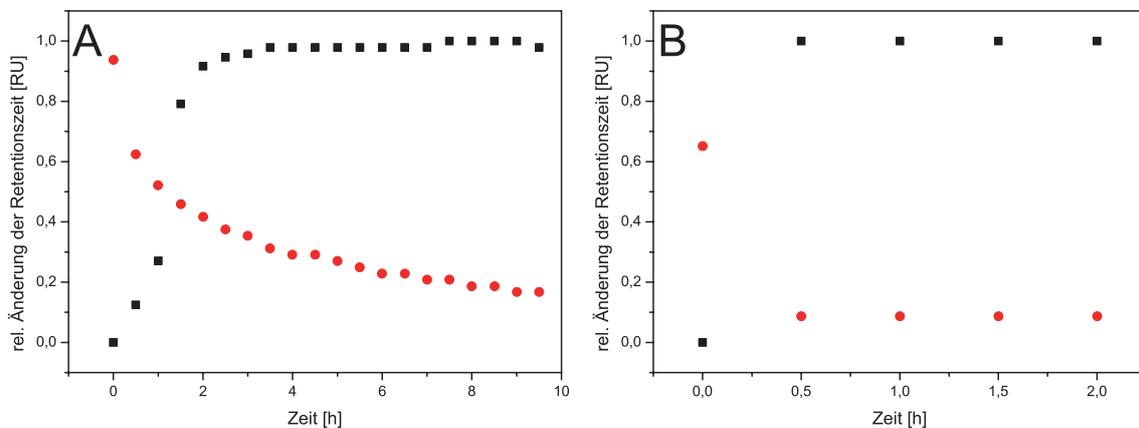


Abbildung 26: Größenausschlusschromatographielauf auf einer Superdex 200 10/30 in 20 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,4: Die Änderung der Retentionszeit der Peakspitze bei 25 °C (A) beziehungsweise bei 37 °C (B) von kleiner Spezies nach großer Spezies (schwarz) beziehungsweise von großer Spezies nach kleiner Spezies (rot).

Bei niedrigen Temperaturen (Abbildung 26 A) war die beobachtete Umwandlung zwischen den beiden Oligomerverteilungen relativ langsam mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} \approx 1$ h. Die vollständige Umwandlung der großen in die kleine Verteilung dauerte deutlich länger und erreichte nie die Ausgangswerte der Retentionszeit, da hier der identische Laufpuffer mit Salz (20 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,4) für beide Reaktionsrichtungen möglicherweise eine Reassoziaton zu größeren Spezies begünstigte. Bei höheren Temperaturen (Abbildung 26 B) war die Umwandlung innerhalb von 30 min vollendet. Die benötigten Zeiten für die Umwandlung zwischen den einzelnen Oligomerverteilungen stimmte in guter Näherung mit den Halbwertszeiten überein, die per FRET-System für die Austauschraten der Untereinheiten gemessen wurden ($t_{1/2} \approx 23$ min bei 25 °C und $t_{1/2} \approx 158$ sek bei 40 °C) (Franzmann et al., 2005). Ebenso stimmen diese Werte sehr gut mit den mittels Massenspektrometrie bestimmt Raten überein (Benesch et al., 2010).

Zusätzlich wurde die Möglichkeit, zwei unterschiedlich Oligomerverteilungen in einem identischen Puffer zu erzeugen, auch in der analytischen Ultrazentrifuge getestet. So wurde durch unterschiedliche Reihenfolgen von Hitzeschritt, Verdünnung und Zugabe von Salz (vergleiche Kapitel 2.4.5) erreicht, dass sowohl in Puffer ohne (Abbildung 27 A) wie auch in Puffer mit Salz (Abbildung 27 B) zwei unterschiedliche Verteilungen an Oligomeren im Rahmen des Experiments detektiert werden konnten. Der Sedimentationskoeffizient der jeweils nicht stabilen Verteilung („groß“ in Puffer ohne Salz, „klein“ in Puffer mit Salz) zeigte aber bereits eine leichte Verschiebung in Richtung stabiler Verteilung. Da jedoch die komplette Konversion bei 20 °C beziehungsweise 25 °C mehrere Stunden dauert (Abbildung 26) dürfte dies für Vergleiche der Chaperonaktivität (siehe Kapitel 3.2.3) keine Rolle spielen.

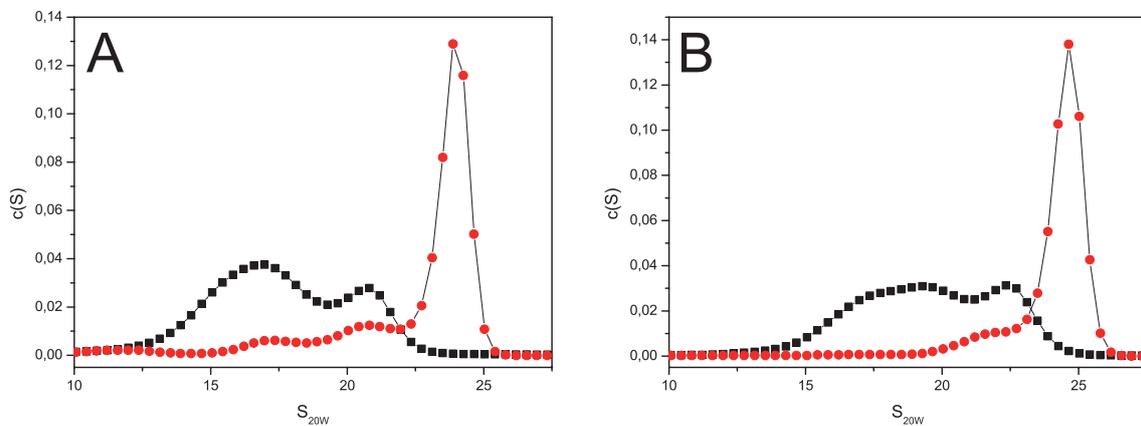


Abbildung 27: Relative $c(S)$ Verteilungen von Hsp26 zeigten, dass sich das Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen Oligomerisierungsformen bei niedriger Temperatur sehr langsam einstellt: In 40 mM Hepes, pH 8,0 (schwarz) und in 40 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 8,0 (rot) äquilibriertes Hsp26 wurde in 40 mM Hepes, pH 8,0 (A) beziehungsweise 40 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 8,0 (B) sedimentiert.

3.2.3 Einfluss der Oligomerisierung auf die Chaperonaktivität

Die Aktivität von sHsps ist sehr eng mit der Oligomerisierung verknüpft. So gibt es zum einen viele Berichte über Aktivitätsverluste bei oligomerisierungsinkompetenten sHsp Varianten (Stromer et al., 2004; Studer et al., 2002; Leroux et al., 1997b; Narberhaus, 2002), zum anderen wird die Aktivität zum Teil über posttranslationale Modifikationen und den damit einhergehenden Änderungen in der Oligomerisierung reguliert (Ecroyd et al., 2007; Garrido, 2002). Daher sollten die unterschiedlichen stabilen Oligomerverteilungen auf ihre Chaperonaktivität untersucht werden. Da alle Versuche in einem identischen Puffersystem durchgeführt werden sollten, eignen sich lediglich Chaperonassays, die bei maximal 25 °C durchgeführt werden können und damit nicht auf die thermische

Aggregation von Substraten angewiesen sind, weil ansonsten die unterschiedlichen Oligomerverteilungen nicht ausreichend lange im Reaktionspuffer stabil sind (vergleiche Abbildung 26). Daher wurde die Aggregationsunterdrückung der chemisch denaturierten Citratsynthase bei Rückfaltung in 40 mM Hepes pH 7,4 untersucht (Abbildung 28) (Buchner et al., 1998). Wurde bei dem Assay das Chaperon bei 25 °C vorinkubiert, so unterdrückte lediglich Hsp26 äquiliibriert in destilliertem Wasser (Abbildung 28 A rot) die Aggregation der Citratsynthase. Um einen ähnlichen Effekt mit dem in 20 mM Hepes äquiliibriertem Protein zu erzielen wurde eine thermische Aktivierung (43 °C für 10 min) (Abbildung 28 B blau) benötigt. Unter diesen Bedingungen war jedoch die Oligomerverteilung mit Salz immer noch nicht aktiv. Damit dieser Pool die Aggregation der chemisch denaturierten Citratsynthase unterdrücken konnte, war eine Vorinkubation bei 50 oder 55 °C (Abbildung 28 C) notwendig.

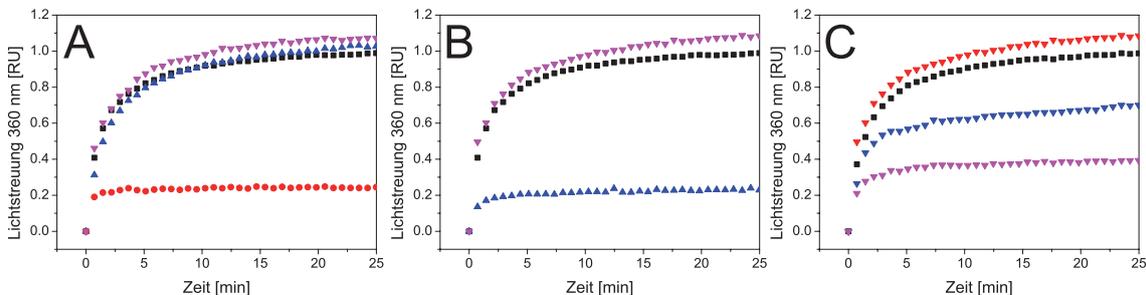


Abbildung 28: In Assays mit chemisch denaturierten Citratsynthase hing die Aktivität von Hsp26 von der vorliegenden Salzkonzentration ab: 300 nM chemisch denaturierte Citratsynthase (schwarz) wurde bei 25 °C in 40 mM Hepes pH 7,4 in Gegenwart von jeweils 600 nM wt Hsp26 (äquiliibriert in unterschiedlichen Puffern) rückgefaltet. (A) Ohne zusätzliche thermische Aktivierung: Hsp26 in destilliertes Wasser äquiliibriert (rot), Hsp26 äquiliibriert in 20 mM Hepes (blau), Hsp26 äquiliibriert in 20 mM Hepes + 50 mM NaCl (magenta); (B) Nach thermischer Aktivierung (10 min bei 43 °C): Hsp26 äquiliibriert in 20 mM Hepes (blau), Hsp26 äquiliibriert in 20 mM Hepes + 50 mM NaCl (magenta); (C) Hsp26 in 20 mM Hepes mit 50 mM NaCl bei unterschiedlichen Temperaturen aktiviert: 43 °C (rot), 50 °C (blau) und 55 °C (magenta).

Besonders interessant waren die Ergebnisse der kleinen Oligomerverteilung, da Hsp26 nach Franzmann et al. (2005) die Aggregation der chemisch denaturierten Citratsynthase lediglich nach thermischer Aktivierung unterdrücken kann, die mit einer Konformationsänderung in der Mitteldomäne einhergeht (Franzmann et al., 2008) und nicht auf die vorher von Haslbeck et al. (1999) beschriebene Destabilisierung des Oligomers zurückzuführen ist (Franzmann et al., 2005). Die bisher gemessenen Daten lassen sich mit der von Franzmann et al. (2008) gemessenen Konformationsänderung der Mitteldomäne nach thermischer Aktivierung als aktivitätsbestimmenden Faktor vereinbaren, wenn man davon ausgeht, dass sich die für diese Messung verwendete Oligomerverteilung

in einem Puffer mit geringerem Salzgehalt aktiviert wurde. Da nach den von Franzmann et al. (2005) gezeigten Experimenten eine Aktivierung keine Änderung des Oligomerisierungszustandes benötigt, würden jedoch die Daten dann auf eine weitere von der thermischen Aktivierung/Konformationsänderung unabhängige Möglichkeit der Aktivierung hindeuten. Um zu überprüfen welche Veränderungen nach/während der Hitzeaktivierung der einzelnen Oligomere in den unterschiedlichen Puffern auftreten, wurden die entsprechenden Proteine in der analytischen Ultrazentrifuge bei 40 °C sedimentiert (Abbildung 29 B). Bei diesen Temperaturen sedimentiert lediglich das inaktive Protein (+ 50 mM Salz) als großes Oligomer, wohingegen die beiden salzfreien Präparationen (in destilliertem Wasser beziehungsweise 20 mM Hepes) in den entsprechenden Puffern im Vergleich zu 20 °C (siehe Abbildung 29 A) in kleinere Spezies mit einem Sedimentationskoeffizienten in dem Bereich von $S_{W20} \approx 5$ bis 8 S zerfielen.

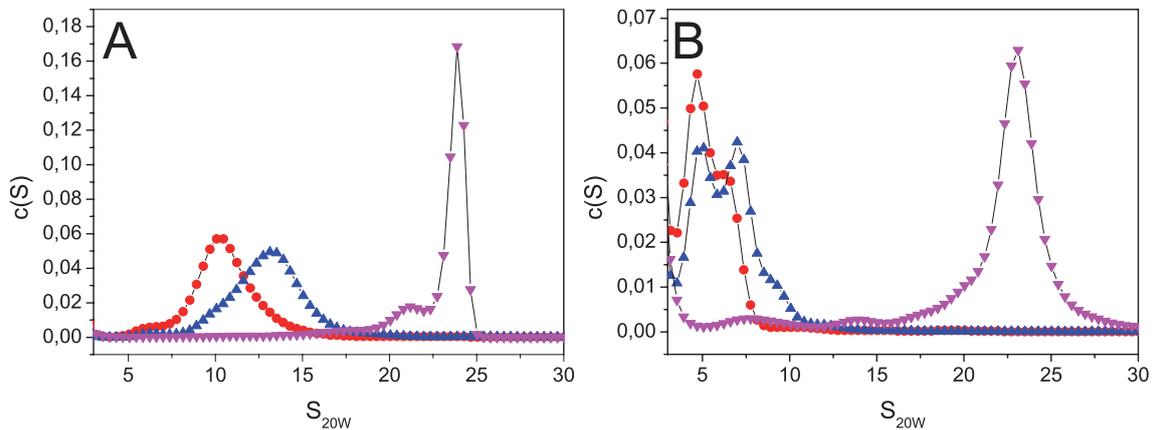


Abbildung 29: Relative $c(S)$ Verteilung von je 10 μM Hsp26 bei 20 °C beziehungsweise 40 °C: (A) Hsp26 äquilibriert in destilliertes Wasser (rot), 20 mM Hepes (blau) und 20 mM Hepes, 50 mM KCl (magenta) zeigte bei 20 °C eine von der Ionenstärke des Puffers abhängige Größe der Oligomere. (B) Im Vergleich zu Hsp26 äquilibriert in destilliertes Wasser (rot) oder 20 mM Hepes (blau) dissoziierte Hsp26 bei 40 °C nur in Gegenwart von 20 mM Hepes, 50 mM KCl (magenta) nicht in suboligomere Fraktionen.

Da in den Citratsynthase-Assays die Salzabhängigkeit der Chaperonaktivität sehr gut mit der salzabhängigen Dissoziation des Oligomers bei 40 °C korrelierte, sollte in einem nächsten Experiment die Salzabhängigkeit der Dissoziation auf einer Größenausschlusschromatographiesäule von Hsp26_{S4C} unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen getestet werden. Hsp26_{S4C} lässt sich unter reduzierenden Bedingungen nicht von wt Protein unterscheiden und lässt unter oxidierenden Bedingungen zwischen benachbarten N-terminalen Bereichen Disulfidbrücken ausbilden und so Untereinheiten im Oligomer kovalent verknüpfen (Franzmann et al., 2005). Da sowohl die disulfidverbrückte wie auch die reduzier-

te Mutante (Abbildung 31) Chaperonaktivität aufweisen, sich jedoch die Laufprofile der oxidierten und reduzierten Variante auf der Größenausschlusschromatographiesäule (40 mM Hepes, 150 mM KCl, 5 mM EDTA, pH 7.5) unterscheiden, folgerte Franzmann et al. (2005), dass eine Dissoziation in suboligomere Spezies für die Aktivität von Hsp26 nicht notwendig sei. Die Untersuchung der Salzabhängigkeit (Abbildung 30) zeigte jedoch, dass im Laufpuffer ohne Salz (Abbildung 30 A und D) Hsp26 zu kleinen Spezies dissoziierte. Da die oxidierten Proben etwas früher eluieren als die reduzierten Proben, ist die Vermutung, dass es sich hierbei um ein Dimer (reduziert, Abbildung 30 A rot) beziehungsweise einer Mischung aus Dimeren und Tetrameren (oxidiert, Abbildung 30 A schwarz) handeln könnte, naheliegend.

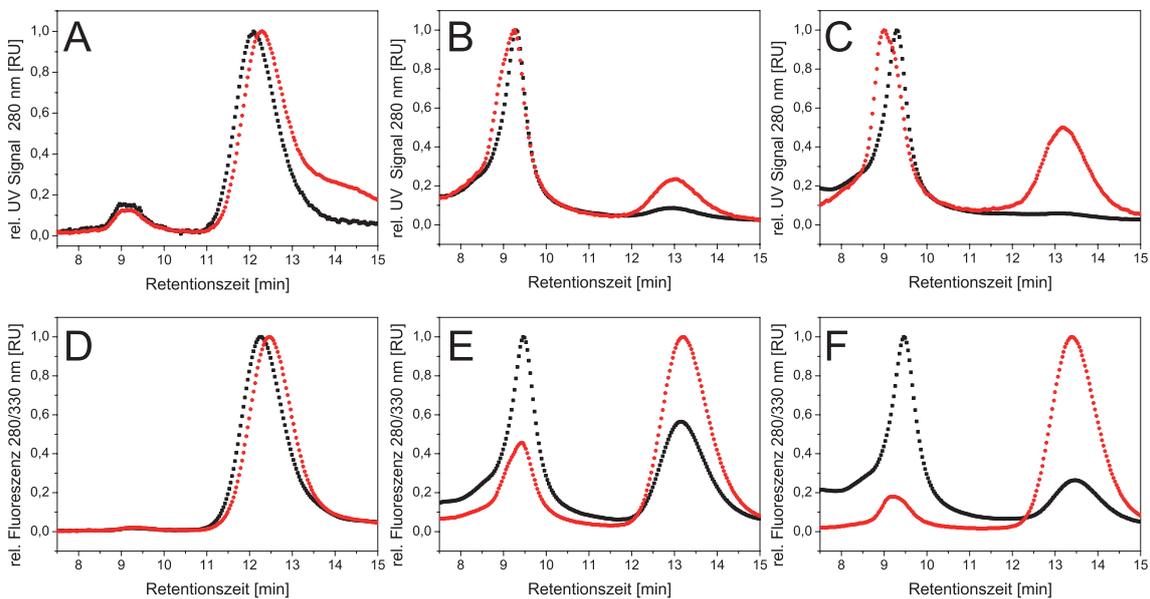


Abbildung 30: Größenausschlusschromatographieläufe von Hsp26_{S4C} auf einer TSK4000pw zeigten salzabhängige Unterschiede zwischen oxidiertem und reduziertem Mutant: UV-beziehungsweise Fluoreszenzsignal von oxidiertem (schwarz) und reduziertem (rot) Hsp26_{S4C} in 40 mM Hepes, pH 7,4 (A, D), 40 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7,4 (B, E) und 40 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7,4 (C, F) mit jeweils einer Flussrate von 0,5 ml/min.

Mit steigenden Salzkonzentrationen verschob sich das Elutionsprofil in Richtung größerer Oligomere. Insgesamt konnte der Trend, dass das Oligomer im oxidierten Zustand weiter stabilisiert wurde, bestätigt werden. Sehr interessant war bei diesem Versuch auch der Vergleich zwischen den UV- und Fluoreszenzdetektoren. So zeigte sich, dass das Fluoreszenzsignal der kleineren Spezies im Vergleich zum UV-Signal und somit der tatsächlichen Konzentration eine deutlich höhere Intensität besaß. Dies deutet auf ein Quenchen der Tryptophanfluoreszenz im Oligomer hin. Da die C-terminalen Sequenzen und das darin enthaltene IXV-Motiv für die Oligomerisierung (mit)verantwortlich gemacht werden

(Braun et al., 2011; Kim et al., 1998; van Montfort et al., 2001), ist die Beobachtung schlüssig, dass sich hier die Fluoreszenzeigenschaften ändern und lässt sich mit den Beobachtungen aus früheren Fluoreszenzstudien in Einklang bringen (Franzmann et al., 2008). Die Auftrennung der mittels Größenausschlusschromatographie analysierten Proben auf einem nicht reduzierenden SDS-Gel zeigte, dass sich die Menge an disulfidverbrücktem Protein zwischen den beiden Oligomerverteilungen (20 mM Hepes +/- Salz) nicht unterschied. Insgesamt war die Verbrückung mit lediglich etwa 45 % deutlich geringer als erwartet (Franzmann et al., 2005), was möglicherweise das leicht unterschiedliche Laufverhalten im Vergleich zur früheren Studien erklären könnte. Da beide Oligomerverteilungen ein ähnliches Verhältnis aus oxidiertem und reduziertem Protein aufwiesen, deutet es darauf hin, dass sich die Geometrie der N-Termini in den beiden unterschiedlichen Oligomerverteilungen nicht entscheidend änderte.

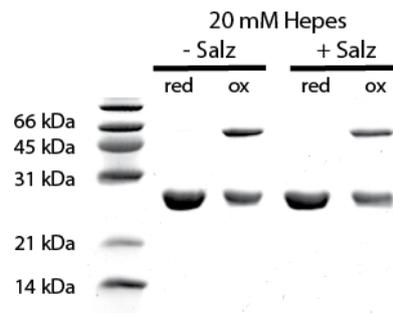


Abbildung 31: Nichtreduzierendes SDS-Gel von Hsp26_{S4C} äquilibriert in 20 mM Hepes beziehungsweise 20 mM Hepes und 50 mM NaCl unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen.

Da die bisherigen Experimente einen Zusammenhang zwischen Chaperonaktivität und Oligomerisierung vermuten lassen, sollte mit den nächsten Experimenten nun geklärt werden, ob es, neben den unterschiedlichen Oligomerverteilungen, weitere salzabhängige Unterschiede zwischen den einzelnen Hsp26 Präparationen gibt, die eine unterschiedliche Aktivität erklären könnten. In einem ersten Versuch wurde die thermische Stabilität mittels Circular dichroismus (Abbildung 32) von Hsp26 in drei unterschiedlichen Puffern getestet. Die gewählte Wellenlänge (220 nm) zeigt vor allem Veränderungen im β -Faltblattanteil an. In allen drei getesteten Puffern wies Hsp26 zwei getrennte thermische Übergänge auf die grundsätzlich mit den früheren experimentellen Daten übereinstimmen (Haslbeck et al., 2004b). Der zweite Übergang zwischen 55 °C und 80 °C, welcher der Entfaltung der α -Kristallin-Domäne entspricht (Chen et al., 2010a), ist nicht reversibel und unter allen drei Pufferbedingungen identisch. Der erste gemessene Übergang war zwischen 20 °C und 50 °C reversibel und wurde mit steigenden Salzkonzentrationen stabilisiert. So verschoben sich die Schmelztemperatu-

ren von 34 °C über 37 °C hin zu 43 °C. Da dieser erste Übergang bei 220 nm in dieser Deutlichkeit lediglich in Hsp26-Konstrukten (wt, Hsp26 Δ ₃₀) gemessen worden ist (Haslbeck et al., 2004b), die noch Oligomere ausbilden können, wohingegen in dem Dimerkonstrukt Hsp26₃₀₋₁₉₅ (Abbildung 32 B) beziehungsweise Monomerkonstrukt Hsp26₈₈₋₁₉₅ dieser Übergang nur schwach beziehungsweise gar nicht (Chen et al., 2010a) sichtbar ist, deutet dies auf einen Vorgang im Oligomer hin. Auf Grund der unterschiedlichen Stabilitäten ließe sich das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten von Hsp26 in 20 mM Hepes +/- Salz über die Unterschiede bei 40 °C (analytische Ultrazentrifuge) beziehungsweise 43 °C (Chaperonassay) erklären. Die unterschiedliche Chaperonaktivität bei 25 °C kann jedoch dadurch nicht erklärt werden.

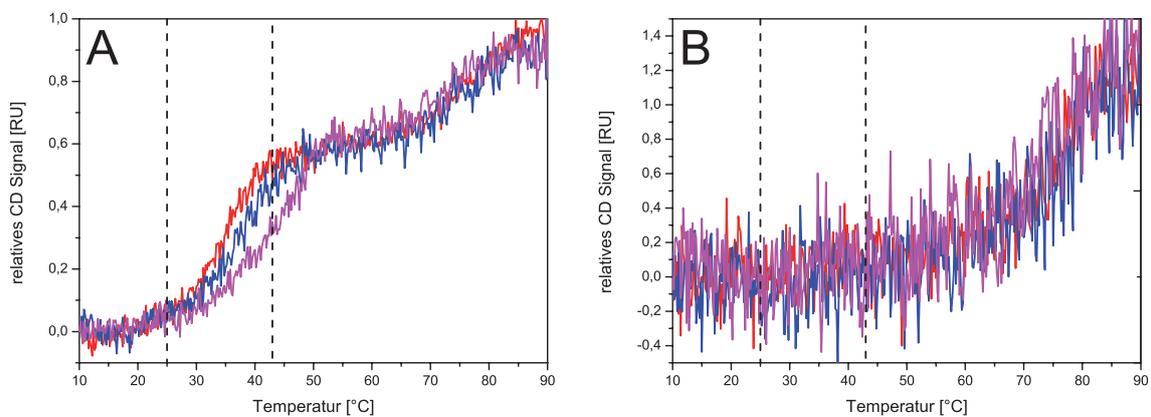


Abbildung 32: Temperaturübergänge bei 220 nm im CD gemessen: 10 µM Hsp26 (A) beziehungsweise Hsp26₃₀₋₁₉₅ (B) äquilibriert in destilliertes Wasser (rot), in 20 mM Hepes pH 7,4 (blau) und 20 mM Hepes + 50 mM KCl pH 7,4 (magenta). Für die Chaperonassays relevante Temperaturen (25 °C und 43 °C) sind als senkrechte Linien eingezeichnet.

Desweiteren sollte getestet werden, ob sich die einzelnen Oligomerverteilungen in der Hydrophobizität unterscheiden, da in der Literatur bereits sehr früh ein Zusammenhang zwischen Chaperonaktivität und Exposition von hydrophoben Flächen hergestellt wurde (Narberhaus, 2002; Lindner et al., 2000, 1998; Yang et al., 1999). Im Gegensatz zu dem mit Circular dichroismus gemessenen Temperaturübergang unterschied sich der mit Sypro-Orange gemessene Übergang bereits bei 25 °C sehr stark zwischen Hsp26 in den drei unterschiedlichen Puffern (destilliertes Wasser, 20 mM Hepes +/- 50 mM KCl). Da Sypro-Orange an hydrophobe Bereiche im Protein bindet und dabei seine Fluoreszenzeigenschaften ändert (Hawe et al., 2008; Niesen et al., 2007), deuteten die Messungen darauf hin, dass die kleinste Oligomerverteilung bereits ab etwa 20 °C mit der Freisetzung von hydrophoben Flächen beginnt (Abbildung 33). Die durch Salz stabilisierten Proben zeigten ein ähnliches Verhalten erst bei höheren Temperaturen. Mit diesem Übergang ließen sich die unterschiedlichen Aktivitäten im Chaperonassay

(Abbildung 28) sehr gut über eine unterschiedliche Zugänglichkeit hydrophober Oberflächen erklären.

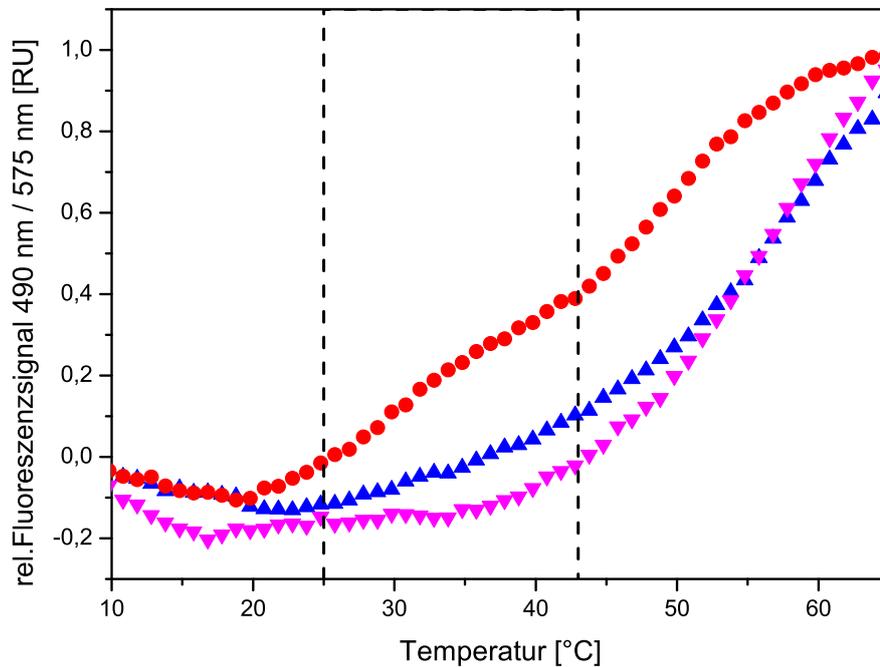


Abbildung 33: Temperaturübergang über Sypro-Orange Fluoreszenz verfolgt: 2 μ M Hsp26 äquiliert in destilliertes Wasser (rot), 20 mM Hepes (blau) und 40 mM Hepes + 50 mM KCl (magenta). Für die Chaperonassays relevante Temperaturen (25 °C und 43 °C) sind als senkrechte Linien eingezeichnet.

Der Vergleich zwischen den beiden Temperaturübergängen (Abbildung 32 und 33) zeigt jedoch, dass die beiden Übergänge vermutlich nicht den identischen Prozess (im Oligomer) beobachten. So zeigt sich, dass für den Übergang der Sekundärstrukturelemente unabhängig vom Puffer der zweite Übergang identisch war. Für die Freisetzung hydrophober Flächen zeigte Hsp26 in den einzelnen Puffer aber deutliche Unterschiede in dem vergleichbaren Temperaturbereich. Unabhängig von der Art der beobachteten Effekte scheint jedoch die Chaperonaktivität mit der Destabilisierung des Oligomers zu korrelieren.

3.2.4 Bestimmung der Anzahl an Untereinheiten

Wie in Kapitel 3.2.2 gezeigt werden konnte lässt sich die Anzahl der Untereinheiten beziehungsweise die hydrodynamische Form von Hsp26 über einen sehr weiten Bereich verschieben. Historisch wurde Hsp26 immer als Paradebeispiel eines monodispersen sHsps mit einem von der Konzentration unabhängigen Oligo-

mer aus 24 Untereinheiten beschrieben (Bentley et al., 1992; Haslbeck et al., 1999; Franzmann et al., 2005; White et al., 2006). Ursprünglich wurde mittels kalibrierter Größenausschlusschromatographiesäulen die Masse mit 550 kDa geschätzt (Haslbeck et al., 1999; Bentley et al., 1992). Wiederholt man das ursprüngliche Experiment (Abbildung 34), so zeigte sich, dass auch die große Oligomerverteilung von Hsp26 (in 40 mM Hepes 50 mM KCl äquilibriert) zwischen Thyroglobulin (669 kDa) und Apoferritin (443 kDa) von der Säule, mit einem geschätzten Masse des Oligomers von 613 kDa, eluiert wurde.

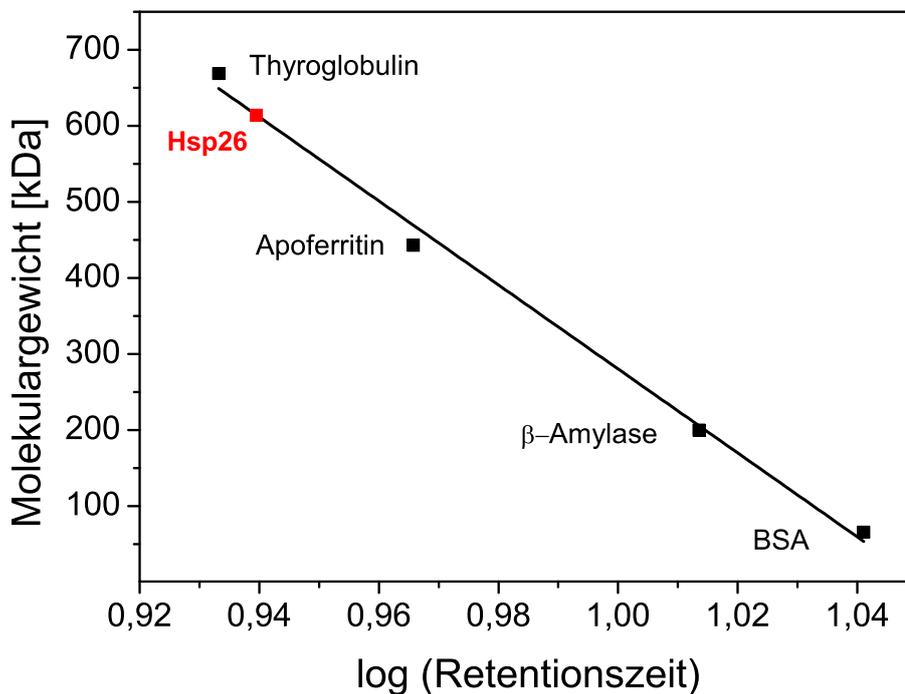


Abbildung 34: Größenausschlusschromatographielauf von Hsp26 auf einer Diol300 Säule in 40 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,4: Auftragung des Logarithmus der Retentionszeit von Thyroglobulin (669 kD), Apoferritin (443 kDa), β-Amylase (200 kDa) und BSA (66 kDa) gegen das Molekulargewicht.

Messungen mittels analytischer Ultrazentrifugation stützten diese Daten (Franzmann et al., 2005; Franzmann, 2008). Neuere Untersuchungen unter Verwendung von Lichtstreuung und Massenspektrometrie zeigten jedoch eine deutlich breitere Verteilung mit Oligomeren, die auch deutlich mehr Untereinheiten enthalten (könnten) (Benesch et al., 2010). Um das Molekulargewicht von Hsp26 äquilibriert in 20 mM Hepes +/- Salz genauer zu bestimmen, wurde deshalb statische Lichtstreuung verwendet, da hier das Molekulargewicht durch winkelabhängige Messung der Lichtstreuung unabhängig der hydrodynamischen Eigenschaften bestimmt werden kann. Das Molekulargewicht der größten Oligomerverteilung

(Abbildung 35, magenta) lag gemittelt über den Elutionspeak bei 943 kDa, wohingegen die Verteilung für Hsp26 in 20 mM Hepes über einen deutlich breiteren Bereich zwischen 400 und 575 kDa aufgetrennt wurde. Diese etwas breitere Verteilung des Molekulargewichts mag durch eine beginnende Umwandlung der in 20 mM Hepes vorherrschenden Oligomere in größere Spezies in dem salzhaltigen Laufpuffer künstlich etwas verbreitert worden sein.

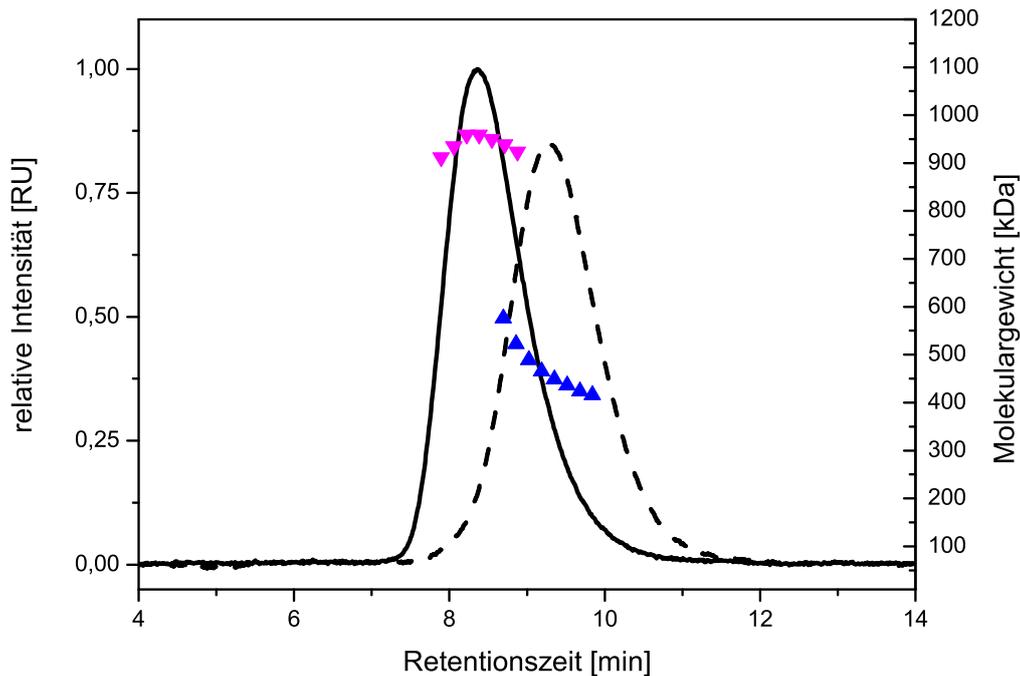


Abbildung 35: Größenausschlusschromatographielauf von Hsp26 äquilibriert in unterschiedlichen Puffern zeigte auf zwei kombinierten Superdex200 5/15 Säulen in 20 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,4 distinkte Größenverteilungen: Hsp26 äquilibriert in 20 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,4 (durchgezogene Linie: Signal des Brechungsindexdetektors, Berechnung des Molekulargewichts: magenta) und Hsp26 äquilibriert in 20 mM Hepes, pH 7,4 (gestrichelte Linie: Signal des Brechungsindexdetektors, Berechnung des Molekulargewichts: blau).

Umgerechnet in Anzahl an Monomeren würden die beiden unterschiedlichen Verteilungen im Mittel 20 beziehungsweise 40 Untereinheiten umfassen. Die hier gemessenen Werte lassen sich sehr gut mit den veröffentlichten MALS und Massenspektrometriedaten in Einklang bringen (Benesch et al., 2010). Der publizierte MALS Lauf besitzt über den gesamten Peak eine Größenverteilung von 580 kDa bis 950 kDa, was im Prinzip einer Mischung aus den hier beobachteten Größenverteilungen von Hsp26 mit und ohne Salz (Abbildung 35) entsprechen würde. Zusätzlich ließe sich die von Benesch et al. (2010) beobachtete Temperaturabhängigkeit erklären. Bei niedrigen Temperaturen wurde mittels Massenspektrome-

trie eine sehr breite Verteilung von unterschiedlichen Oligomerisierungsformen aus 12 bis 21 Dimeren gemessen. Bei 43 °C hingegen verschob sich jedoch das Oligomerisierungsmuster zu Oligomeren mit hauptsächlich 40 Untereinheiten. Dieses Phänomen ließe sich über die zuvor beschriebenen salzabhängigen Einflüsse auf die Oligomerisierung erklären. Ausgehend vom Lagerpuffer (25 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 (Basha et al., 2004)) wurde Hsp26 in dieser Untersuchung anschließend in unterschiedlichen Puffern mit höherer Ionenstärke (PBS beziehungsweise 200 mM Ammoniumacetat) verdünnt und innerhalb kurzer Zeit gemessen oder bei 6 °C weiterverarbeitet (Benesch et al., 2010). Die bei 25 °C langsame, salzabhängige Umwandlung der unterschiedlichen Oligomere trug hier vermutlich zu den breiten Verteilungen bei. Erst nach einem Temperatursprung auf 43 °C wurde der Prozess innerhalb der Dauer des Experiments abgeschlossen und daher die Verteilung um 40 Untereinheiten deutlich schärfer.

Für die Bestimmung des Molekulargewichts aus Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen benötigt man zur Umrechnung der Sedimentationskoeffizienten in ein Molekulargewicht Informationen über die geometrischen Eigenschaften des Moleküls. Der sogenannte *frictional coefficient* gibt dabei die Abweichung des Moleküls von einer perfekten Kugel wieder. Im Prinzip lassen sich diese Werte aus einzelnen Ultrazentrifugationsläufen bestimmen. Da jedoch für Hsp26 mit einem Sedimentationskoeffizienten von $S_{W20} \approx 22$ (Franzmann et al., 2005; Franzmann, 2008) nie gegen ein Oligomer aus 24 Untereinheiten widersprochen wurde konnte diese Masse lediglich mit sehr kleinen f/f_0 Werten realisiert worden sein (vergleiche Tabelle 6). Physikalisch wäre das Limit für die einzelnen beobachteten Hsp26 Oligomerverteilungen (unter der Annahme von $f/f_0 = 1$) die in Tabelle 6 angegebenen Werte. Da jedoch die Geometrie von Proteinen in der Regel von Kugeln abweicht und zusätzlich die Oberfläche nicht glatt ist, sondern zum Beispiel eine Hydrathülle besitzt, wurde für globuläre Proteine kein f/f_0 kleiner als etwa 1,2 beobachtet (Erickson, 2009). Somit würde die oben beobachtete Oligomerverteilung von $S_{W20} = 24$ S einem Oligomer von mindestens 30 Untereinheiten entsprechen. Die aktiven Spezies von Hsp26 äquilibriert in destilliertes Wasser (Abbildung 25) würde aus mindestens 7 Untereinheiten bestehen.

Um das Molekulargewicht und damit die mittlere Anzahl an Untereinheiten von Hsp26 experimentell exakter zu bestimmen, wurden die große Oligomerverteilungen von Hsp26 (in 40 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,5) bei mehreren unterschiedlichen Geschwindigkeiten (12.000 Upm, 22.000 Upm, 32.000 Upm und 50.000 Upm) in Replikaten bestimmt und für die Sedimentationsdaten individuelle $c(S)$ -Verteilungen mit den dazugehörigen f/f_0 -Werten gefittet. Der aus den

S_{W20}	$f/f_0 = 1,0$	$f/f_0 = 1,2$
9	126 kDa $\hat{=}$ 5 UE	165 kDa $\hat{=}$ 7 UE
15	270 kDa $\hat{=}$ 11 UE	355 kDa $\hat{=}$ 15 UE
21	448 kDa $\hat{=}$ 19 UE	588 kDa $\hat{=}$ 25 UE
24	547 kDa $\hat{=}$ 23 UE	719 kDa $\hat{=}$ 30 UE
26	617 kDa $\hat{=}$ 26 UE	810 kDa $\hat{=}$ 34 UE

Tabelle 6: Umrechnung von unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten S_{W20} in Massen in Abhängigkeit von f/f_0 .

14 individuellen Sedimentationsdaten berechnete Mittelwert von f/f_0 von 1,45 stimmt genau mit dem für Abbildung 36 berechneten Werten des globalen Fits zweier unterschiedlicher Geschwindigkeiten überein. Die Hauptspezies (84 %) besitzt hier einen Sedimentationskoeffizienten S_{W20} von 25,5 S wobei sich daraus mit dem oben angegebenen f/f_0 -Wert eine molekulare Masse von 1150 kDa errechnet, was 48 Untereinheiten im Oligomer entsprechen würde.

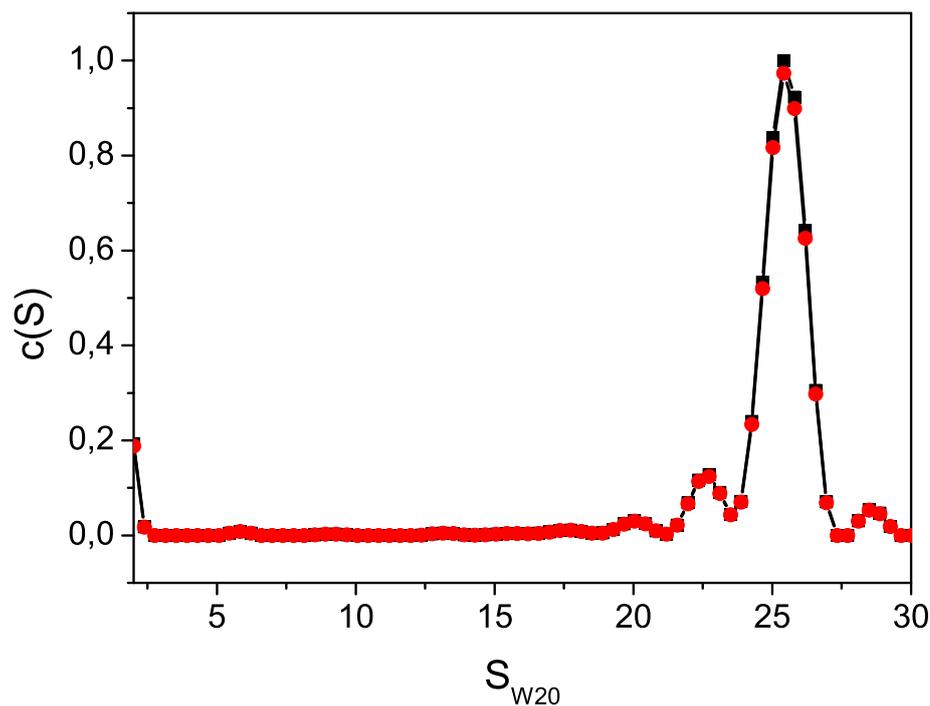


Abbildung 36: Normalisierte $c(S)$ Verteilung von global gefitteten Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen bei 12.000 Upm (rot) und 50.000 Upm (schwarz) von Hsp26 in 40 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7,4.

Die restlichen 16 % der Verteilung ließen sich unter der Annahme eines vergleichbaren f/f_0 zu einem 32mer, 36mer und 64mer annotieren.

Integriert man die gesamte $c(S)$ -Verteilung, so erhält man ein mittleres Molekulargewicht von 880 kDa, was etwas niedriger als die im MALS gemessenen Vertei-

lung von 943 kDa ist. Diese Differenz mag über die in der c(S)-Verteilung vorhandenen 2 S Spezies stammen (Abbildung 36). Diese Spezies spielt, unabhängig ob realistisch oder ein Artefakt beim Fitten, bei der Bestimmung der mittleren Masse mittels statischer Lichtstreuung keine Rolle, da so kleine Bestandteile auf der Größenausschlusschromatographiesäule vom Oligomerpeak abgetrennt werden würden und somit bei der Bestimmung der mittleren Masse das Ergebniss nicht beeinflussen würden. Bei den für die drei unterschiedlichen Oligomerverteilungen von Hsp26 (destilliertes Wasser, 20 mM Hepes, 20 mM Hepes + 50 mM KCl) durchgeführten Gleichgewichtsläufen ergibt sich, im Vergleich zu den Sedimentationsläufen, für das große Oligomer eine kleinere mittlere Masse von 767 kDa. Diese Abweichung könnte über das, aus Mangel an detaillierterem Wissen, angenommenen *single species* Modell entstanden sein. Für die beiden anderen Verteilungen wurden Massen von 396 kDa und 190 kDa berechnet, was in etwa 16 beziehungsweise 8 Untereinheiten im Oligomer entsprechen würde.

Da die bisherigen Messungen darauf hindeuteten, dass die durchschnittliche Anzahl an Untereinheiten in einem Oligomer von der in der 3D Rekonstruktion verwendeten Anzahl abweicht (White et al., 2006), sollten neue elektronenmikroskopische Aufnahmen für die einzelnen Oligomerverteilungen in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Kastenmüller und Prof. Dr. Sevil Weinkauff (TUM AK Elektronenmikroskopie) angefertigt werden. Mit Hilfe dieser Aufnahmen sollte zum einen die Form der Partikel abgeschätzt und zum anderen versucht werden, ob die oben beschriebenen funktionellen Unterschiede (siehe Abbildung 28) mit strukturellen Unterschieden korreliert werden können. Die mit Ammoniummolybdat negativ kontrastierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 37) zeigten für alle drei unterschiedliche Pufferbedingungen globuläre Partikel mit einer heterogenen Größenverteilung.

Die statistische Auswertung (Abbildung 38) der Aufnahmen zeigte, dass die Größenverteilung der Probe mit Salz (Abbildung 37 C) mit 13 bis 21 nm sehr gut vergleichbar zu früheren Untersuchungen war (Haslbeck et al., 1999; Bentley et al., 1992).

Die Verteilungen der beiden Hsp26 Präparationen in destilliertes Wasser beziehungsweise in 20 mM Hepes unterschieden sich deutlich von der Verteilung in 40 mM Hepes, 50 mM NaCl. Jedoch unterschieden sich die beiden Größenverteilungen ohne Salz nur geringfügig voneinander, obwohl die Unterschiede in den Sedimentationskoeffizienten (Abbildung 25) einen ausgeprägtere Differenz erwarten lassen würden. Dieser Effekt könnte zum einen durch eine geänderte Form der Oligomere durch die Probenvorbereitung, zum anderen durch Diskrimination zu kleiner Partikel bei der für die statistische Auswahl notwendigen

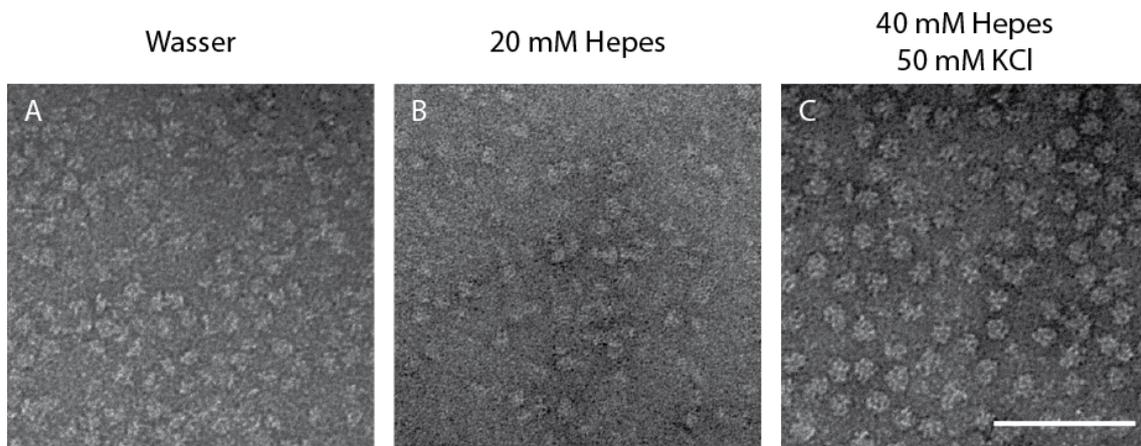


Abbildung 37: Negativ kontrastierte TEM Aufnahmen unterschiedlicher Hsp26 Präparationen zeigten eine unterschiedliche Größenverteilung: Hsp26 wurde in den jeweiligen Puffern (destilliertes Wasser (A), 20 mM Hepes (B) und 40 mM Hepes, 50 mM NaCl) äquilibriert. Die Größe des Bildausschnitts ist jeweils identisch (Längenstandard 100 nm).

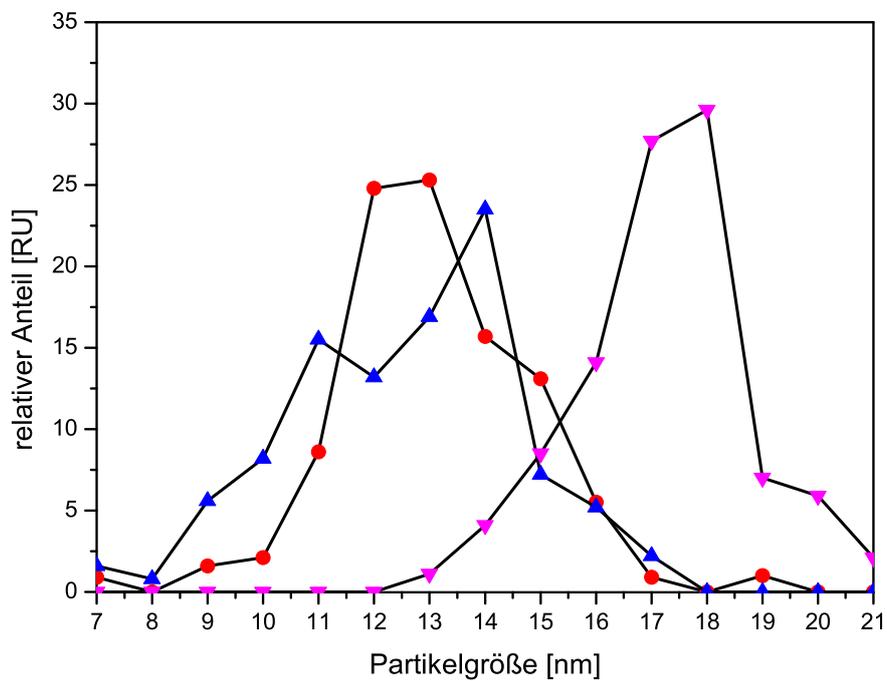


Abbildung 38: Statistische Auswertung der in Abbildung 37 gezeigten TEM Aufnahmen: Hsp26 äquilibriert in destilliertes Wasser (4806 Partikel, rot), 20 mM Hepes (3476 Partikel, blau), 40 mM Hepes mit Salz (6402 Partikel, magenta). (Daten von Dr. Andreas Kastenmüller)

semiautomatischen Auswahl der Partikel entstanden sein, da sich Oligomere mit nur einigen wenigen Untereinheiten möglicherweise nicht ausreichend vom Hintergrund abheben.

Um einen direkten Vergleich zu dem von White et al. (2006) publizierten 3D Modellen ziehen zu können, wurde begonnen, vergleichbare Cryo- elektronenmikroskopische Aufnahmen anzufertigen. Eine vorläufige Analyse der Daten zeigte, dass die Größenverteilung der gesammelten Partikel mit den publizierten Daten übereinstimmten (persönliche Mitteilung Dr. Andreas Kastenmüller). Die Partikel wiesen jedoch, ähnlich wie α B-Kristallin (Braun et al., 2011), eine deutlich größere Heterogenität auf als ursprünglich angenommen und somit sind vermutlich neben den publizierten weitere Oligomere enthalten. Ob die publizierte Elektronendichte jedoch tatsächlich, wie bisher angenommen, nur 24 Untereinheiten enthält, müssen zukünftige Modellierungsversuche zeigen.

3.2.5 Posttranslationale Modifikationen von Hsp26

Für viele kleine Hitzeschockproteine ist in der Literatur eine Regulation der Chaperonaktivität durch Phosphorylierung beschrieben (Ecroyd et al., 2007; Shashidharamurthy et al., 2005). Dabei geht man davon aus, dass kleine Hitzeschockproteine unter physiologischen Bedingungen in einer Art inaktiven Lagerzustand vorliegen. Bei Bedarf werden die Chaperone dann phosphoryliert und durch die dadurch induzierte Änderung in der Oligomerisierung aktiviert. Auch für Hsp26 sind einige Phosphorylierungstellen in proteomweiten Untersuchungen identifiziert worden (Ficarro et al., 2002; Smolka et al., 2007; Albuquerque et al., 2008). Da man bei Hsp26 jedoch von einer thermischen Regulation über ein Konformationsänderung in der Mitteldomäne ausgegangen ist (Franzmann et al., 2008, 2005), wurden diese bisher nicht näher untersucht.

3.2.5.1 Phosphoproteom Analysen in *S. cerevisiae*

Im Rahmen proteomweiter Analysen der Phosphoregulation von *S. cerevisiae* (Schreiber et al., 2012; Soroka et al., 2012) wurden neben den fünf für Hsp26 bereits in öffentlichen Datenbanken (expasy) hinterlegten Phosphorylierungstellen vier weitere Stellen mit posttranslationalen Modifikationen identifiziert (Tabelle 7). Interessanterweise wurden zusätzlich zu den jeweils einfach phosphorylierten Peptiden auch zwei zweifach phosphorylierte Peptide (S47/T48 und S208/211) experimentell nachgewiesen. Diese Beobachtung lässt eine zusätzliche Regulation an diesen Positionen zu.

Position	Expsy	Hsp90	$\Delta ppt1$
S1		A	
T42	P	P	P
S47			P ₁
T48			P ₁
S90	P	P	P
S144			P
T163	P		P
S208	P	P ₂	P ₂
S211	P	P ₂	P ₂

Tabelle 7: Übersicht über bekannte oder neu identifizierte Modifikationen von Hsp26. Die bereits in der Expsy Datenbank hinterlegten Phosphorylierungsstellen (P) stammen aus proteomweiten Phosphostudien (Ficarro et al., 2002; Smolka et al., 2007; Albuquerque et al., 2008). Die neu identifizierten Phosphorylierungsstellen wurden bei SILAC Experimenten von Hsp90 *pull-downs* beziehungsweise beim Vergleich $\Delta ppt1$ /wt Hefestamm identifiziert (Schreiber et al., 2012; Soroka et al., 2012). Indizes geben an, dass die entsprechenden Peptide auch als Diphosphopeptide beobachtet wurden. Zusätzlich zu den Phosphorylierungsstellen wird der N-Terminus des Proteins posttranslational acetyliert (A).

Auffällig war hierbei, dass die meisten Phosphorylierungsstellen in dem als Miteldomäne bezeichneten Bereich liegen. Interessanterweise liegen keine potentiellen Regulationsstellen innerhalb der ersten 30 Aminosäuren, die von Hsp26 abgeschnitten werden können, ohne größere Einflüsse auf die Oligomerisierung und Chaperonaktivität zu besitzen (Haslbeck et al., 2004b). Zusätzlich zu den Phosphorylierungsstellen wurde gezeigt, dass posttranslational das Startmethionin in der Zelle abgespalten und anschließend das N-terminale Serin von Hsp26 acetyliert wurde (Bossier et al., 1989).

3.2.5.2 Phosphomimetische Mutanten

Um die Einflüsse der Phosphorylierung von Hsp26 auf die Oligomerisierung und Chaperonaktivität näher zu untersuchen, wurden drei phosphomimetische Mutanten in jedem strukturellen Abschnitt von Hsp26 (Hsp26_{S47E/T48E}, Hsp26_{S144E} und Hsp26_{S208E/S211E}) (vergleiche Abbildung 42), bei denen, wie für andere sHsps auch (Ahmad et al., 2008; Ito et al., 2001; Koteiche and McHaourab, 2003; Shashidharamurthy et al., 2005) die entsprechenden Positionen durch ein negativ geladenes Glutamat ersetzt werden, kloniert und gereinigt. Um die Chaperonaktivität dieser drei Mutanten zu untersuchen (Abbildung 39), wurde deren Fähigkeit die Aggregation von chemisch denaturierter Citratsynthase zu unterdrücken unter gleichen Bedingungen wie das wt Protein (Abbildung 28) getestet. Im Vergleich zum wt Protein waren die phosphomimetischen Mutanten unter Bedingungen (20 mM Hepes pH 7,4) chaperonaktiv, bei denen das wt Protein erst thermisch ak-

tiviert werden musste. Bei höheren Ionenstärken war lediglich Hsp26_{S47E/T48E} aktiv, wohingegen die beiden anderen Mutanten (Hsp26_{S144E} und Hsp26_{S208E/S211E}) erst thermisch aktiviert werden mussten, um einen Teil der Chaperonaktivität zu erzielen.

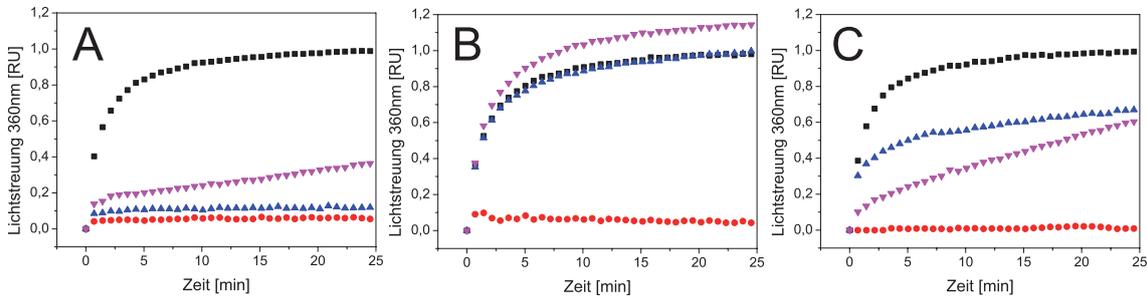


Abbildung 39: In chemisch denaturierten Citratsynthase Assays zeigten die phosphomimetischen Mutanten von Hsp26 Aktivität unter Bedingungen in denen das entsprechende wt Protein inaktiv war: 300 nM chemisch denaturierte Citratsynthase (schwarz) wurde bei 25 °C in 40 mM Hepes pH 7,4 in Gegenwart von jeweils 600 nM Hsp26-Mutante (äquibriert in unterschiedlichen Puffern rückgefaltet). (A) Ohne zusätzliche thermische Aktivierung äquibriert in 20 mM Hepes: Hsp26_{S47E/T48E} (rot), Hsp26_{S144E} (blau) und Hsp26_{S208E/S211E} (magenta) (B) Ohne zusätzliche thermische Aktivierung äquibriert in 20 mM Hepes, 50 mM NaCl: Hsp26_{S47E/T48E} (rot), Hsp26_{S144E} (blau) und Hsp26_{S208E/S211E} (magenta) (C) Nach thermischer Aktivierung (10 min bei 43 °C) äquibriert in 20 mM Hepes, 50 mM NaCl: Hsp26_{S47E/T48E} (rot), Hsp26_{S144E} (blau) und Hsp26_{S208E/S211E} (magenta).

Auffällig bei all diesen Messungen war, dass das Lichtstreuungssignal bei Hsp26_{S208E/S211E} langsam, aber kontinuierlich linear anstieg. Dies könnte bedeuten, dass die an die Mutante gebundenen Substrate nicht stabil in Lösung gehalten werden konnten, sondern kontinuierlich losgelassen wurden und aggregierten. Da die Aktivitätsdaten zeigten, dass die Phosphomutanten entweder unter allen getesteten Bedingungen aktiv waren (Hsp26_{S47E/T48E}) beziehungsweise im Vergleich zu dem wt Protein bei höheren Salzkonzentrationen noch thermisch aktivierbar (Hsp26_{S144E}, Hsp26_{S208E/S211E}) waren und die Aktivität des wt Proteins mit der Stabilität des Oligomers korrelierte (siehe Kapitel 3.2.3), würde dies auf eine Destabilisierung der oligomeren Struktur der Mutanten hindeuten. Um die Oligomerverteilungen der einzelnen Mutanten näher zu untersuchen, wurden analytische Ultrazentrifugationsläufe der drei Mutanten in 20 mM Hepes \pm Salz durchgeführt (Abbildung 40).

In 20 mM Hepes äquibriert zeigten alle drei Mutanten Oligomerverteilungen mit einem $S_{W20} \approx 6$ S beziehungsweise $S_{W20} \approx 8$ S (Abbildung 40 A) was im Vergleich zu der Verteilung für wt Hsp26 (Abbildung 25) eine zu kleineren Oligomeren verschobene Größenverteilung bedeutet. Interessant hierbei war, dass Hsp26_{S47E/T48E} und Hsp26_{S208E/S211E} unter diesen Bedingungen annähernd identische Verteilungen zeigten, jedoch nach Zugabe von Salz unterschiedliche Ver-

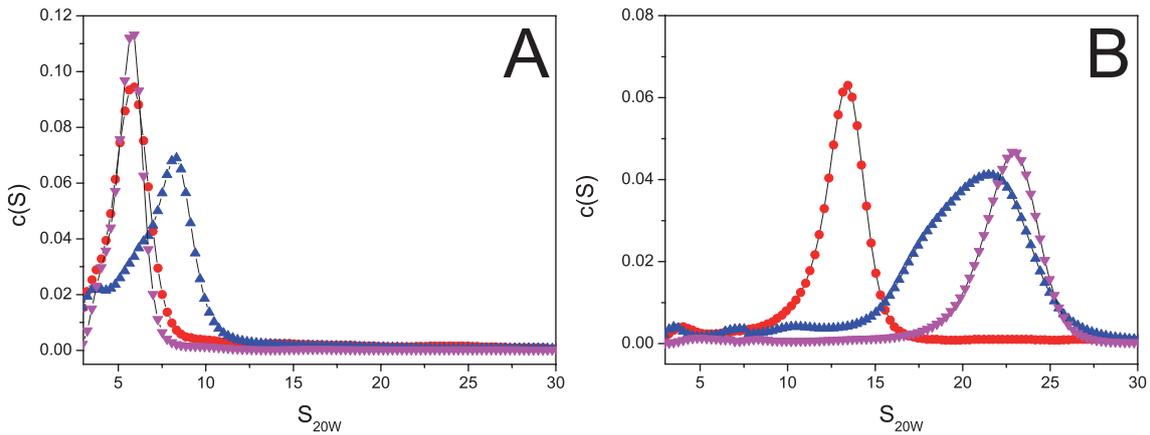


Abbildung 40: Relative $c(S)$ Verteilung von je 10 μ M Mutante äquilibrierte in 20 mM Hepes (A) beziehungsweise 20 mM Hepes, 50 mM NaCl (B): Hsp26_{S47E/T48E} (rot), Hsp26_{S144E} (blau) und Hsp26_{S208E/S211E} (magenta).

teilungen und Aktivitäten aufwiesen (Abbildung 40 B). Die Größe und Aktivität von Hsp26_{S144E} und Hsp26_{S208E/S211E} stimmten mit den Daten für wt Protein in 20 mM Hepes überein. Beide Proteine ließen sich thermisch aktivieren. Die Größenverteilung für die unter diesen Bedingungen ohne zusätzlichen Temperatursprung aktive Mutante Hsp26_{S47E/T48E} war mit $S_{W20} \approx 13$ S etwas größer im Vergleich zu Hsp26 wt in destilliertem Wasser. Eine sehr ähnliche Größenverteilung ergab sich in den mit Uranylacetat negativ kontrastierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen der drei Mutanten. In 20 mM Hepes ergaben sich für alle drei Mutante sehr kleine und heterogene Partikel. Für die Aufnahmen in 20 mM Hepes, 50 mM NaCl (Abbildung 41) gab es eine Korrelation zu den Aktivitätsdaten. Für die beiden thermisch aktivierbaren Mutanten wurden große, heterogene, meist globuläre Partikel gefunden. Wohingegen für die unter diesen Bedingungen aktive Mutante (Hsp26_{S47E/T48E}) kleine, heterogene Partikel gefunden wurden.

Insgesamt deuten die bisherigen Daten darauf hin, dass die Aktivität von Hsp26 über die Stabilität/Größe des Oligomers reguliert werden kann. Es scheint, dass (unter den hier getesteten Bedingungen) Hsp26 Spezies mit einem Sedimentationskoeffizienten ≤ 13 S aktiv sind. Dies würde jedoch für Hsp26 in der Lagerform bedeuten, dass ein Loslösen einzelner Untereinheiten, wie es zum Beispiel beim Untereinheitenaustausch statt findet, nicht ausreichend für maximale Chaperonaktivität wäre, sondern eine weitere Destabilisierung des Oligomers zum Beispiel über Phosphorylierung benötigt wird.

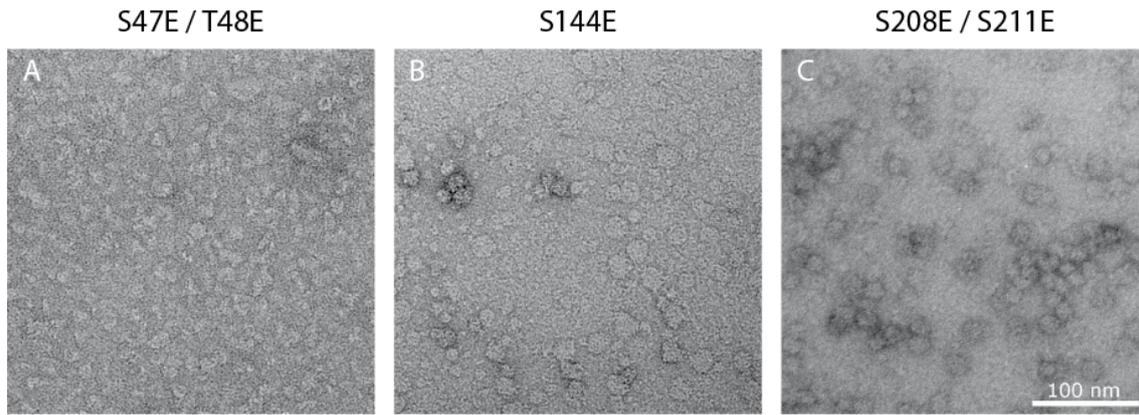


Abbildung 41: Negativ kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hsp26 phosphomimetische Mutanten. Mit Uranylacetat kontrastierte, in 20 mM Hepes, 50 mM NaCl äquilibrierte Präparationen: Hsp26_{S47E/T48E} (A), Hsp26_{S144E} (B) und Hsp26_{S208E/S211E} (C). Die Größe des Bildausschnitts ist jeweils identisch (Längensstandard 100 nm).

3.2.6 Zusammenfassung Oligomerisierung von Hsp26

Die Oligomerisierung und Chaperonaktivität von kleinen Hitzeschockproteinen ist sehr eng miteinander verbunden. Bis jetzt ist man für Hsp26 aus der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) davon ausgegangen, dass die Chaperonaktivität des sehr stabilen Oligomers aus 24 Untereinheiten (Bentley et al., 1992; Haslbeck et al., 1999; White et al., 2006) durch eine Konformationsänderung in der Mitteldomäne aktiviert werden kann (Franzmann et al., 2008), ohne dass dafür die Organisation des Oligomers verändert werden muss (Franzmann et al., 2005).

Die hier präsentierten Daten deuten darauf hin, dass die Population von einzelnen Oligomerezuständen von Hsp26 über sehr weite Bereiche verschoben werden kann und die Verteilungen deutlich heterogener sind als bisher angenommen. Unter physiologischen Salzkonzentrationen scheint die Hauptspezies der Oligomerverteilung im Mittel deutlich mehr als 24 Untereinheiten zu besitzen, was im Einklang zu neueren massenspektroskopischen Daten steht (Benesch et al., 2010). Die Auswertung der salz- und temperaturabhängigen Chaperonaktivität deutet jedoch darauf hin, dass unter diesen Bedingungen eine thermische Aktivierung der Chaperonaktivität im physiologisch relevanten Temperaturbereich (zum Beispiel Hitzeschritt bei 43 °C für 10 min) nicht möglich ist. Ferner deuten die Daten darauf hin, dass für eine vollständige Chaperonaktivität Hsp26, ausgehend von seinem Lagerform, mit im Mittel ca. 48 Untereinheiten, in suboligomere Spezies dissoziieren muss.

Die für die Aktivität notwendige temperaturabhängige Dissoziation konnte *in vitro* durch die Wahl von salzfreien Puffersystemen so weit verschoben werden, dass bereits bei 25 °C aktive Oligomere generiert wurden. Da *in vivo* diese Art von

Beeinflussung der Oligomerstabilität nicht möglich ist, wird dort die Aktivität von Hsp26 (wie bei andere sHsps auch) vermutlich durch posttranslationale Modifikationen reguliert, die zu einer Destabilisierung des Oligomers führen können und somit den für die thermische Aktivierung/Dissoziation benötigten Temperaturbereich herabsetzen. So lies sich Hsp26 durch unterschiedliche Phosphorylierungsstellen (zumindest *in vitro*) von inaktiv (unphosphoryliert), über aktivierbar (zum Beispiel Hsp26_{S144E}) bis hin zu aktiv (zum Beispiel Hsp26_{S47E/T48E}) regulieren.

3.3 Analyse von sHsp/Substrat-Interaktionen durch chemische Quervernetzung

Die über das beschreibende hinausgehende Untersuchung der Interaktion zwischen kleinen Hitzeschockproteinen und ihren (Modell-)Substraten ist grundsätzlich sehr schwierig, da die resultierenden, nicht kovalent verknüpften, heterogenen Komplexe sehr groß sind (Stromer et al., 2003; Stengel et al., 2010). Zusätzlich ist die direkte analytische Zugänglichkeit von Protein Komplexen ≥ 1 MDa nahezu unmöglich. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit Methoden zur kovalenten Modifikation der Chaperon/Substratkomplexe etabliert werden, um die Interaktionsstellen im Oligomer zu verbinden und somit die anschließende Analyse/Identifikation der Substratbindestellen zu ermöglichen.

3.3.1 Etablierung der Methoden

Grundsätzlich eignen sich für die kovalente Verknüpfung von Proteinen die in den Aminosäureseitenketten vorhandenen funktionellen Gruppen wie Sulfhydryl-, Amin- und Carboxylgruppen (Rappsilber, 2011; Petrotchenko and Borchers, 2010). Da die beiden vergleichend zu untersuchenden Modellchaperone (Hsp26 und α B-Kristallin) keine Cysteine enthalten kann ohne die Einführung zusätzlicher Mutationen lediglich auf Amino- und Carboxylgruppen zurückgegriffen werden. Leider ist jedoch die Verteilung der crosslinkbaren Aminogruppen von sHsps, vor allem außerhalb der α -Kristallin-Domäne, sehr inhomogen. Daher wurden neben isopenmarkiertem Di- Sulfo- Succinimid- Gluterat (Amin-Amin, 7,7 Å Linker (Nowak et al., 2005), siehe 2.2.6.1) auch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid/ N-Hydroxysuccinimid (EDC/NHS: Carboxyl- und Aminogruppe, 0 Å) verwendet. Beide Crosslinker besitzen eine hohe Reaktivität und definierte Endprodukte, jedoch ist für die Verknüpfung von Carboxylgruppen und Aminen keine Wahl von unterschiedlichen Linkerlängen beziehungsweise das Einbringen von Isotopenmarkierungen möglich.

Grundsätzlich gäbe es noch die Möglichkeit, beobachtete Seitenreaktionen von Succinimidestern mit Alkoholen (Mädler et al., 2009; Leavell et al., 2004; Swaim et al., 2004; Kalkhof and Sinz, 2008) bei der Analyse mit einzuschließen (Braun et al., 2011). Dies würde jedoch längere Reaktionszeiten und höhere Konzentrationen von Crosslinkern benötigen, da die Reaktivität mit Alkoholen abhängig von der chemischen Umgebung deutlich geringer sein kann (Kurosky et al., 1993; Miller and Kurosky, 1993; Mädler et al., 2009). Die zusätzlichen kombinatorischen Möglichkeiten würden die Datenanalyse weiter verkomplizieren und den Such-

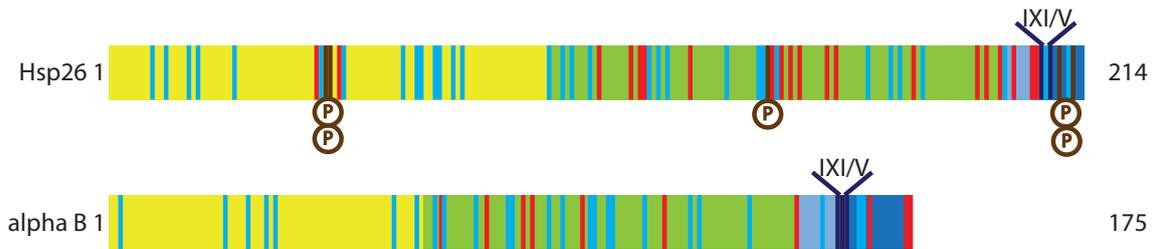


Abbildung 42: Die Verteilung der freien primären Aminogruppen in kleinen Hitzeschockproteinen ist nicht gleichmäßig. Übersicht der crosslinkbaren Positionen in Hsp26 und α B-Kristallin: N-terminaler Bereich (gelb), α -Kristallin-Domäne (grün), C-terminaler Bereich (blau), Lysine (rot), Carboxylgruppen (blau). Lage der in Kapitel 3.2.5.2 diskutierten Phosphomutanten (braun).

raum vergrößern, weshalb zur Etablierung der Methodik bewusst darauf verzichtet wurde. Außerdem würden die längeren Inkubationszeiten die Möglichkeit der Messung zu definierten Zeitpunkten während der Aggregationskinetiken reduzieren.

Um eine Identifikation der potentiellen Interaktionsstellen durchführen zu können, wurden die Proteinkomplexe nach dem Crosslinken mit Trypsin verdaut, potentielle Crosslinks angereichert (siehe unten) und anschließend mit hochauflösenden massenspektroskopischen Techniken vermessen. Bei der anschließenden Datenanalyse können im Allgemeinen, wenn man nur einfach modifizierte Peptide betrachtet, drei unterschiedliche Arten von Crosslinks unterschieden werden (Schilling et al., 2003): Typ 0 unproduktive Modifikation, *dead end*; Typ 1 intramolekulare Crosslinks; Typ 2 intermolekulare Crosslinks. In mehrfach modifizierten Peptiden gibt es zusätzlich noch jede beliebige Kombination aus den drei oben aufgeführten Crosslinkarten. Da für die Identifikation von Interaktionsstellen zwischen Chaperon und Substrat nur Crosslinks vom Typ 2 interessant sind, wurde für die Etablierung der Analysen jeweils lediglich ein zulässiges Crosslinkermolekül je Molekül berücksichtigt.

Um einen möglichst hohen Anteil an quervernetzten Peptiden zu erhalten, wurden die gebildeten Proteinkomplexe zum Teil mit variierenden Konzentrationen an Crosslinker und unterschiedlichen Inkubationszeiten versetzt (in der Regel 50fach molarer Überschuss Crosslinker über Chaperon für 5 min bei Raumtemperatur). Um eine optimale Analyse zu ermöglichen, wurden anschließend in einem mehrstufigen Prozess die potentiell quervernetzten Peptide angereichert.

In einem ersten Schritt wurden dabei die quervernetzten Proteinkomplexe auf einem reduzierenden SDS-Gel (Abbildung 43, 47, 48 und 61) aufgetrennt. Hierüber ließen sich Proteine ohne intermolekularen Crosslink ausschließen, indem lediglich Banden mit einem Molekulargewicht über dem der einzelnen Monomere weiter analysiert wurden.

In einem zweiten Arbeitsschritt wurden die nach dem Verdau aus dem Gel eluierten Peptide mittels einer starken Kationentauschersäule in einem vier- bis fünf-stufigem Salzgradienten fraktioniert und angereichert. Mit Trypsin verdaute Crosslinks sollten unter sauren Bedingungen an allen vier Termini eine positive Ladung tragen und somit stärker als vergleichbare unmodifizierte Peptide an das Säulenmaterial binden (Chen et al., 2010b; Rinner et al., 2008).

Der dritte Anreicherungsschritt fand bei der Messung der Peptide in der LTQ-Orbitrap statt. Hier wurden lediglich von Peptiden mit einer Ladung $\geq 3^+$ MS²-Spektren angefertigt, da wie oben bereits erwähnt, quervernetzte Peptide eine höhere Ladung tragen sollten als nicht quervernetzte Peptide (Chen et al., 2010b; Rinner et al., 2008; Maiolica et al., 2007). Zur Annotation der Fragmentierungsspektren wurde die „Massmatrix“ Suchmaschine verwendet (Abbildung 62), die neben den üblichen Annotationsmöglichkeiten auch eine Möglichkeit zur automatischen Annotation von quervernetzten oder disulfidverbrückten Peptiden ermöglicht (Xu et al., 2008, 2010). Hierbei annotiert die Software (um die kombinatorischen Möglichkeiten möglichst gering zu halten) jedoch lediglich einfach fragmentierte Peptide (fragmentiert von einem der vier möglichen Termini) und behandelt den nichtfragmentierten Teil als Modifikation des fragmentierten Ions. Zusätzlich wurden, soweit möglich, isotopenmarkierte Crosslinker mit einer äquimolaren Mischung aus leichter und schwerer Variante eingesetzt, die eine abschließende Verifikation der potentiellen Crosslinks zuließen. Eine mögliche Selektion durch sogenannte *masstags* während des LS/MS Laufs, um lediglich Peptide mit irgendeiner Modifikation durch einen Crosslinker zu fragmentieren (Petrotchenko and Borchers, 2010; Rappsilber, 2011), erwiesen sich aber bei der Etablierung als kontraproduktiv, da dadurch andere allgemeine Peptidinformationen (wie zum Beispiel Sequenzabdeckung, mittlere Abweichung der Masse) nicht erfasst werden konnten.

3.3.2 Crosslinks innerhalb der sHsp Oligomere

In einem ersten Satz an Crosslinkexperimenten sollten die Möglichkeiten und Grenzen der zu etablierenden Methoden zunächst an den Oligomeren der beiden Modell-sHsps (Hsp26 und α B-Kristallin) ohne zusätzliche Substrate getestet werden. Dies erlaubt die Kontrolle und Beurteilung der Datenqualität auf Grundlage der publizierten 3D-Struktur im Fall von α B-Kristallin (Braun et al., 2011). In dieser Studie wurden zur Verifikation der in die Cryo-EM-Elektronendichte gemodelten Strukturen der α -Kristallin-Domäne ein Crosslinkansatz verwendet. Für Hsp26, sollten in ähnlicher Weise die gewonnenen Abstände für die

Platzierung und Modellierung der Struktur genutzt werden (siehe Kapitel 3.2.4). Zu diesem Zweck wurden für die Analyse im NMR isotopenmarkierte Dimer-Konstrukte (Chen et al., 2010a) der α -Kristallin-Domäne von Hsp26 gereinigt. Diesen Konstrukten fehlt jedoch die komplette C-terminale Sequenz und Teile des N-terminalen Bereichs wodurch die Informationen über Kontakte in diesem Bereich über andere Methoden erhalten werden müssen.

Beide Modellchaperone ließen sich mit einem 10fachen molaren Überschuss an isotopenmarkiertem DSSG für 10 min crosslinken (Abbildung 43).

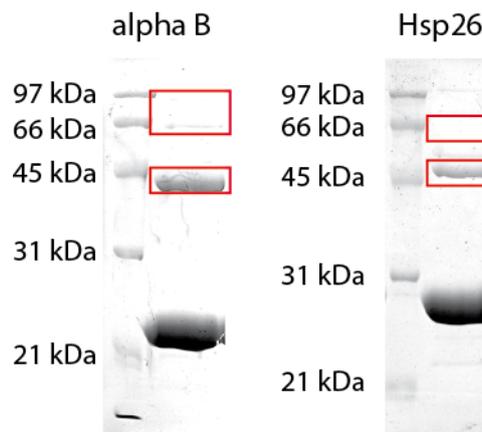


Abbildung 43: SDS-Gel von 50 μ M mit DSSG (10fach molarer Überschuss) quervernetztem α B-Kristallin und Hsp26: Für beide Chaperone waren unter diesen Bedingungen kovalent verknüpfte Dimere und Trimere/Tetramere auf dem Gel sichtbar. Ungefähre Schnittmarken der Gelbanden: rot.

Für die Analyse der Interaktionsstellen wurde von α B-Kristallin die dem Molekulargewicht eines Dimer entsprechende und höhere molekulare Banden aus dem gesamten Gel ausgeschnitten, aufbereitet und in zwei Pools (Dimer und Trimer/Rest) vereinigt. Für die Messung in der Orbitrap wurden diese Proben mittels SCX-ZipTips in jeweils 4 Proben (unfraktioniert und 3 Salzstufen, siehe Kapitel 2.2.3) fraktioniert. Bei den anschließenden drei getrennten Suchen (vergleiche Kapitel 2.2.6) nach potentiellen Crosslinks in einer Datenbank, die lediglich die Sequenz von humanem α B-Kristallin enthielt, wurde insgesamt eine Sequenzabdeckung von 96 % erreicht.

Bei allen von der Datenbanksuche vorgeschlagenen Crosslinks wurde die Anwesenheit des Isotopenmusters manuell verifiziert (Abbildung 44).

Die in Abbildung 45 dargestellten Crosslinks wurden zum großen Teil auch mit einem Crosslinker mit leicht abweichender Linkerlänge bei den Crosslinkexperimenten zur Verifizierung der gemodelten pseudoatomaren α B-Kristallin Struktur gefunden (Braun et al., 2011). Die dort ebenfalls annotierten Seitenreaktionen von Crosslinks zwischen Amino- und Alkoholgruppen wurden hier nicht untersucht.

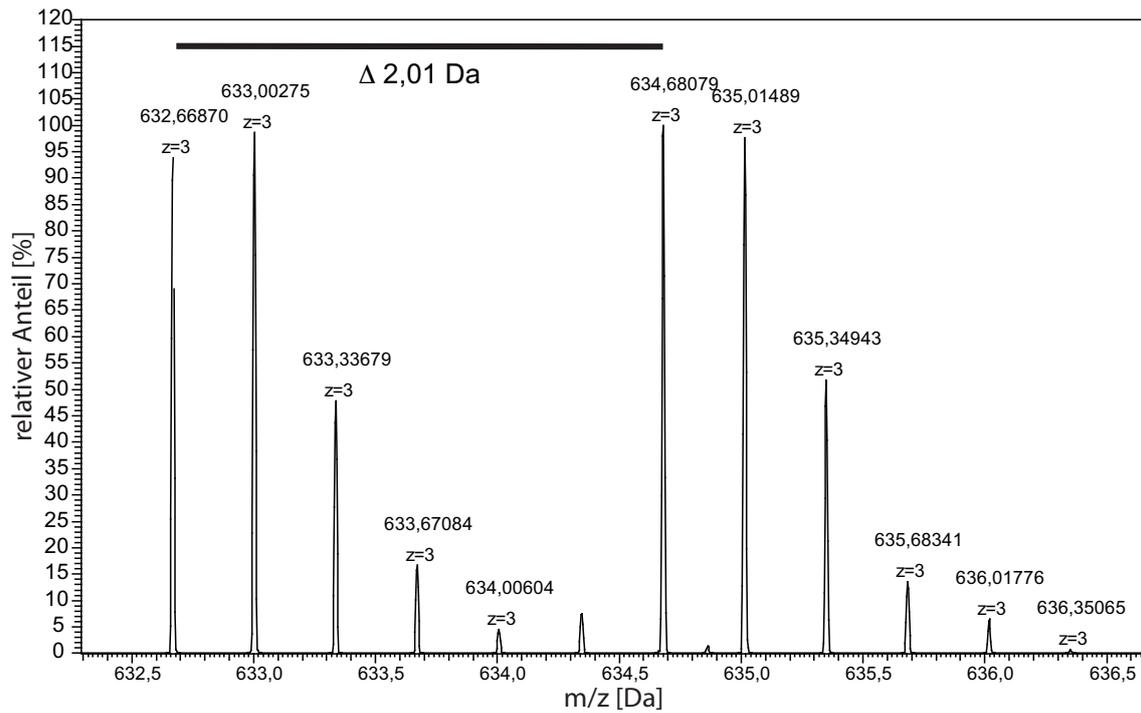


Abbildung 44: Beispiel eines durch „Massmatrix“ annotierten und manuell verifizierten Crosslinks: Das Isotopenmuster der *precursor* Masse 632,66870 Da zeigt das Vorhandensein der durch den Crosslinker eingebrachten 1 : 1 Mischung aus leichter und schwerer Isotopenmarkierung. Differenz zwischen leichtem und schwerem Crosslinker entspricht bei Ladungszahl 3^+ 2,01 Da.

Auffällig ist jedoch, dass in der Studie von Braun et al. (2011) keinerlei Crosslinks für Position 82 beziehungsweise intermolekulare Crosslinks für die Lysine in dem C-terminalen Bereich (K166-K166, K166-K174 und K174-K175) von α B-Kristallin gefunden wurden.

Unabhängig von dem Überlapp der identifizierten Positionen zwischen der früheren Studie und den jetzigen Daten ist die strukturelle Plausibilität der identifizierten Crosslinkpositionen wichtig. Aus diesem Grund wurden für alle hier vorgeschlagenen Interaktionskontakte die Distanzen in der Struktur von α B-Kristallin nachgemessen. Da für die Plausibilität eines Crosslinks lediglich ein mögliches Vorhandensein innerhalb des Oligomers ausreichend ist, wurde jeweils die kürzeste mögliche Distanz zwischen zwei Positionen, unabhängig von der Geometrie der einzelnen α -Kristallin-Domänen, berechnet. Um einen Crosslink direkt mit dem publizierten Modell in Einklang bringen zu können, muss die Distanz zwischen den beiden korrespondierenden C_α der Lysine $\leq 24 \text{ \AA}$ ($7,7 \text{ \AA}$ Linker + 13 \AA für zwei Lysin-Reste + etwa 3 \AA Fehler in der Struktur (Chen et al., 2010b)) sein. Diese Annahme wird für alle beobachteten Crosslinks mit Ausnahme der drei oben beschriebenen intermolekularen Crosslinks im C-terminalen Bereich erfüllt. Da diese C-terminalen Sequenzen jedoch in der Literatur als insgesamt sehr dynamisch und flexibel beschrieben sind (Carver

		alpha B											
		N-term	K72	K82	K90	K92	K103	K121	K150	K166	K174	K175	
alpha B	N-term												
	K72	gelb											
	K82												
	K90	gelb		gelb									
	K92	gelb											
	K103												
	K121												
	K150	gelb	gelb			gelb		gelb	rot				
	K166	gelb	gelb			gelb		gelb	rot	rot			
	K174	gelb	gelb		gelb	gelb		gelb	gelb	rot	rot		
	K175				gelb	gelb					rot		

Abbildung 45: Übersicht der Crosslinks innerhalb des α B-Kristallin Oligomers: Von den Datenbanksuchen vorgeschlagene und manuell verifizierte Crosslinks zwischen zwei primären Aminogruppen (gelb) innerhalb des α B-Kristallin Oligomers. Crosslinks die (auch) überlappende Peptidfragmente aufweisen (rot) wurden als eindeutig intermolekular annotiert. Der spiegelbildliche Bereich oberhalb der Diagonale (dicke Linie) ist in grau dargestellt.

et al., 1992), müssen diese Crosslinks nicht als Artefakte betrachtet werden.

Der zu α B-Kristallin vergleichbare Ansatz mit Hsp26 lieferte ebenfalls Dimere und höhere Oligomerbanden, die insgesamt in drei Pools aufbereitet und anschließend fraktioniert wurden. Die über die Datenbanksuche identifizierten potentiellen Crosslinks (Abbildung 46) wurden ebenfalls manuell verifiziert und zeigen, dass vor allem Bereiche im C-terminalen Bereich der α -Kristallin-Domäne (Position 95-195) sehr viele Crosslinks bilden.

Für die Platzierung der korrekten Anzahl an Monomeren in die von White et al. (2006) publizierte Elektronendichte, dürften vor allem die intermolekularen Distanzen geeignet sein. Da bei den meisten entlang der Diagonale (und somit in räumlicher Nachbarschaft auf der Primärsequenz) liegenden Crosslinks keine zusätzlichen Hinweise auf intermolekulare Kontakte vorhanden sind, handelt es sich vermutlich um Verknüpfungen innerhalb eines Monomers. Betrachtet man die einzelnen Crosslinks genauer im Vergleich zu einem mit I-TASSER erstelltem Homologiemodell für die α -Kristallin-Domäne von Hsp26, so muss es sich bei dem Crosslink Lysin 116 auf Lysin 176 vermutlich um einen intramolekularen Crosslink handeln, wohingegen Lysin 147 auf Lysin 195 einen intermolekularen Crosslink (innerhalb eines Dimers) darstellen dürfte, da unter der Annahme der Dimerbildung über Strangaustausch die beiden Positionen einen sehr großen intramolekularen Abstand haben würden. Mit ähnlicher Begründung handelt es sich bei den in Abbildung 46 als definitiv intermolekular eingezeichneten Crosslinks vermutlich um potentielle Kontaktstellen zwischen zwei benachbarten Dimeren.

		Hsp26																						
		N-term	K45	K50	K107	K114	K116	K117	K127	K145	K147	K149	K151	K157	K159	K176	K190	K192	K195	K198	K202	K203		
Hsp26	N-term																							
	K45																							
	K50		■																					
	K107																							
	K114																							
	K116					■																		
	K117					■																		
	K127																							
	K145																							
	K147										■													
	K149										■													
	K151																							
	K157																							
	K159															■								
	K176							■																
	K190																							
	K192																				■			
	K195												■								■			
	K198																			■	■			
	K202																			■		■		
	K203																				■			

Abbildung 46: Übersicht der Crosslinks innerhalb des Hsp26 Oligomers: Von den Datenbanksuchen vorgeschlagene und manuell verifizierte Crosslinks zwischen zwei primären Aminogruppen (gelb) innerhalb des Hsp26 Oligomers. Crosslinks die (auch) überlappende Peptidfragmente aufweisen (rot) wurden als eindeutig intermolekular annotiert. Der spiegelbildliche Bereich oberhalb der Diagonale (dicke Linie) ist in grau dargestellt.

3.3.3 Substratinteraktionen mit heterobifunktionalem aminreaktiven Crosslinker

Für die Untersuchung von Interaktionen zwischen sHsp und Substraten wurden vier in der Literatur häufig verwendete Modellssubstrate genutzt. Die Ausbildung der Komplexe mit Lysozym aus Hühnereiweiß (P00698) findet bei 25 °C statt und wird durch die Reduktion der Disulfidbrücken im Substrat ausgelöst.

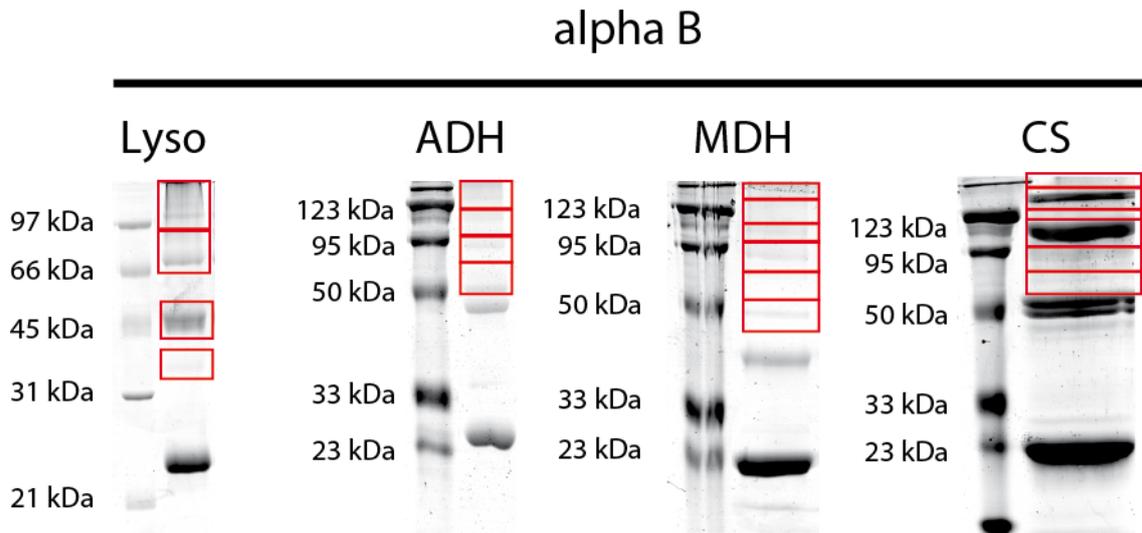


Abbildung 47: Übersicht von Quervernetzungsreaktionen zwischen Substraten und α B-Kristallin: Für die Ausbildung der Chaperonsubstratkomplexe wurde jeweils ein zweifacher molarer Überschuss an Chaperon über Substrat verwendet. Die Crosslinks wurden anschließend bei Raumtemperatur für 5 beziehungsweise 10 min zwischen zweifachem Überschuss an α B-Kristallin und 25 μ M Lysozym (50fach), 10 μ M Alkoholdehydrogenase (50fach), 5 μ M Malatdehydrogenase (25fach) und 4,8 μ M Citratsynthase (300fach) mit DSSG durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte mittels 12,5%iger SDS-PAGE. Ungefähre Schnittmarken der Gelbanden: rot.

Die Aggregation der Alkoholdehydrogenase aus der Bäckerhefe (P00330) wird durch Komplexierung der enthaltenen Zinkionen mit Phenanthrolin bei 45 °C gestartet. Wohingegen die mitochondriale Malatdehydrogenase (P00346) und Citratsynthase (P00889), beide aus Schweineherz, lediglich durch thermischen Einfluss (45 °C) aggregieren.

3.3.3.1 Lysozym

Wie die Abbildungen 47 und 48 im Vergleich zu den Crosslinks ohne Substrat zeigen (Abbildung 43), traten nach einer teilweise notwendigen Optimierung der Crosslinkbedingungen zusätzliche Banden auf, die auf Crosslinks mit Substrat zurückzuführen sind. Abgesehen von den Crosslinks mit Lysozym, wo die zur

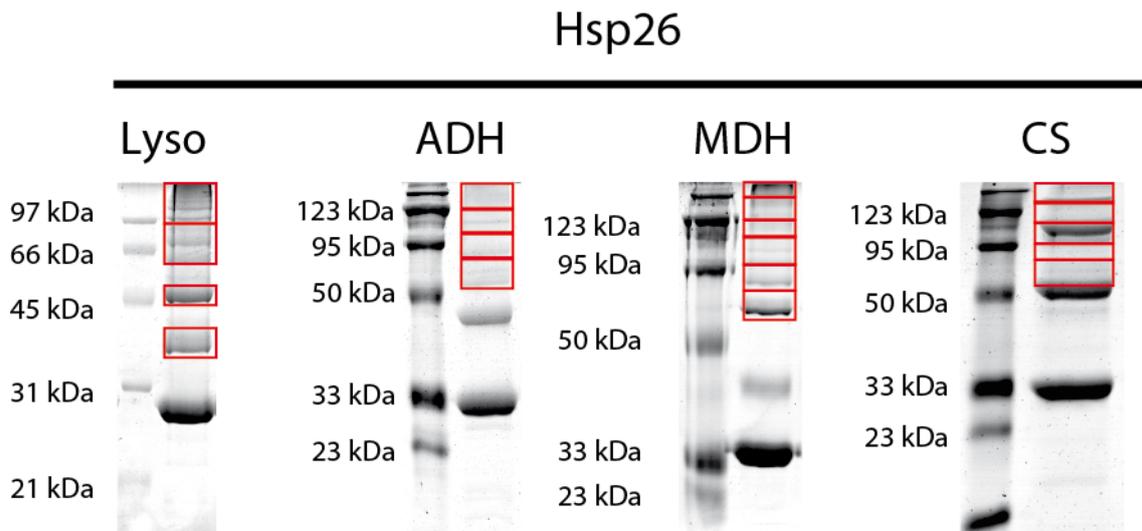


Abbildung 48: Übersicht von Quervernetzungsreaktionen zwischen Substraten und Hsp26: Für die Ausbildung der Chaperonsubstratkomplexe wurde jeweils ein zweifacher molarer Überschuss an Chaperon über Substrat verwendet. Die Crosslinks wurden anschließend bei Raumtemperatur für 5 beziehungsweise 10 min zwischen zweifachen Überschuss an Hsp26 und 25 μ M Lysozym (50fach), 10 μ M Alkoholdehydrogenase (50fach), 5 μ M Malatdehydrogenase (25fach) und 4,8 μ M Citratsynthase (300fach) mit DSSG durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte mittels 12,5 %iger SDS-PAGE. Ungefähre Schnittmarken der Gelbanden: rot.

Interaktion zwischen einem Monomer Chaperon und einem Substratmonomer Bande auf dem SDS-Gel eindeutig bestimmt werden konnte (Bande zwischen 31 und 45 kDa), ist diese Zuordnung bei den anderen Substraten deutlich schwieriger. Ein Grund hierfür mag neben der unterschiedlichen Anzahl an potentiellen reaktiven Positionen (6 für Lysozym gegenüber 25 für ADH und 26 für MDH und CS) auch die von Bova et al. (1997) beschriebene Beobachtung sein, dass größere Substrate vermutlich mehrfach an das Chaperon binden können. Daher wurden zusätzlich zu der definierten Chaperon-Lysozym-Bande jeweils die Bereiche oberhalb der Dimerbande des Chaperons aus den SDS-Gelen ausgeschnitten und in vier bis sechs Gelstücke zerlegt, die jeweils individuell verarbeitet wurden.

Die Auswertung der potentiellen Interaktionsstellen zwischen Lysozym und α B-Kristallin lieferten neben einer 96 % beziehungsweise 100 % Sequenzabdeckung für Lysozym und α B-Kristallin insgesamt 13 manuell verifizierte Verknüpfungsstellen, die im Chaperon in zwei großen Bereichen auftraten (Abbildung 49). Neben dem N-Terminus (Position 1) und Position 72 lieferten auch die Positionen vor und hinter dem IXI-Motiv (Position 159 bis 162) Crosslinks. In Lysozym wurden sowohl die ersten beiden und letzten beiden Positionen mit α B-Kristallin quervernetzt.

Die Datenauswertung in vergleichbaren Experimenten mit Hsp26 zeigte ein sehr ähnliches Bild (Abbildung 50). Mit ebenfalls fast vollständiger Sequenzab-

		alpha B											
		N-term	K72	K82	K90	K92	K103	K121	K150	K166	K174	K175	
Lysozym	K1												
	K13												
	K33												
	K96												
	K97												
	K116												

Abbildung 49: Übersicht der Crosslinks mit DSSG zwischen α B-Kristallin und Lysozym: Von den Datenbanksuchen vorgeschlagene und manuell verifizierte Crosslinks zwischen zwei primären Aminogruppen (gelb).

deckung (99 % beziehungsweise 100 %) wurden 20 unterschiedliche Verknüpfungspunkte gefunden. Im Substrat wurden hier ebenfalls hauptsächlich die ersten beiden Lysine verknüpft. Zusätzlich wurde auch das Lysin an der Position 97 verknüpft. Für das Lysin an Position 116 wurde im Gegensatz zu dem Versuch mit α B-Kristallin (Abbildung 49) kein Crosslink gefunden.

		Hsp26																					
		N-term	K45	K50	K107	K114	K116	K117	K127	K145	K147	K149	K151	K157	K159	K176	K190	K192	K195	K198	K202	K203	
Lysozym	K1																						
	K13																						
	K33																						
	K96																						
	K97																						
	K116																						

Abbildung 50: Übersicht der Crosslinks mit DSSG zwischen Hsp26 und Lysozym: Von den Datenbanksuchen vorgeschlagene und manuell verifizierte Crosslinks zwischen zwei primären Aminogruppen (gelb).

In Hsp26 wurden, wie bei α B-Kristallin, ebenfalls Positionen im N-terminalen Bereich und ein Bereich am Ende der α -Kristallin-Domäne vor dem IXV-Motiv quervernetzt. Zusätzlich wurden Crosslinks zwischen den Positionen 147 bis 159 gefunden, was den β 6 und β 7 Strängen entspricht, die eigentlich für die Bildung des Dimerisierungskontakts verantwortlich gemacht werden (vergleiche Kapitel 1.2.2.3).

Fasst man die in Crosslinks involvierten Positionen im Lysozym zusammen und markiert sie auf der Kristallstruktur (Abbildung 51), so fällt auf, dass die drei, mit beiden Chaperonen quervernetzten Positionen, eine Seite des Moleküls abdecken. Die nicht verknüpfte Position 33 hingegen liegt auf der dazu abgewandten Seite des Moleküls. Dass Position 96 im Vergleich zu Position 97 nicht als potentielle Crosslinkstelle identifiziert wurde, könnte auch an der etwas ungünstigen Verteilung der Trypsinschnittstellen innerhalb des Proteins liegen.

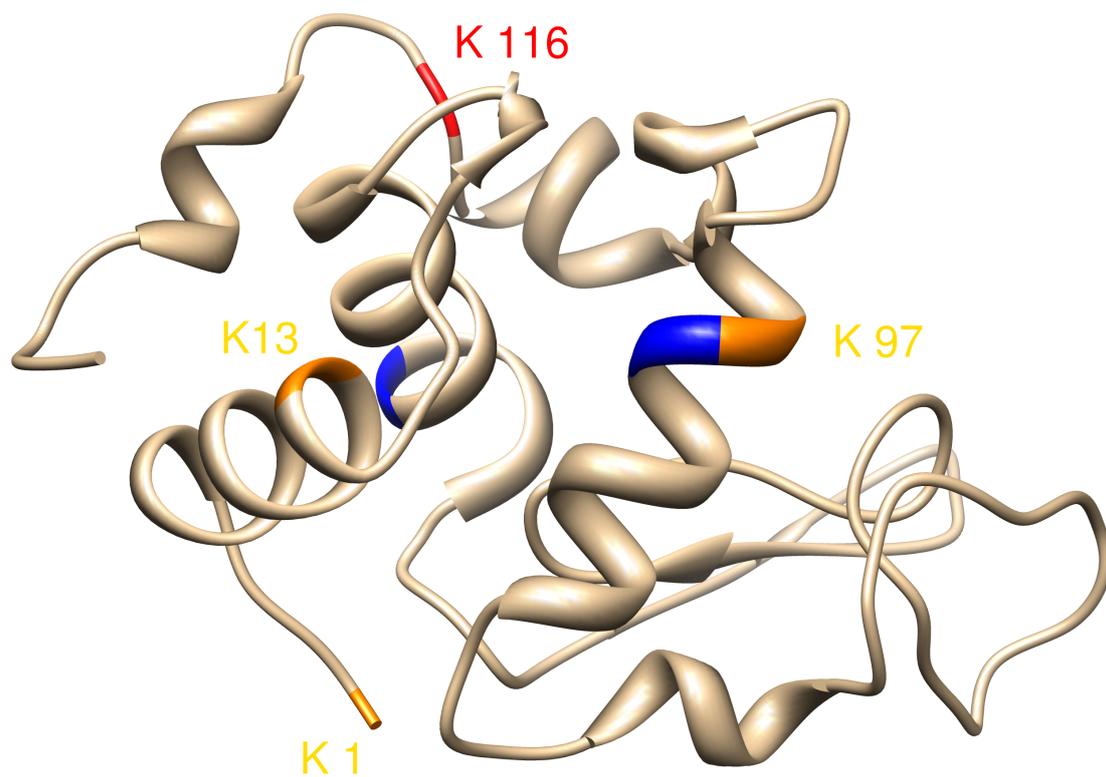


Abbildung 51: Kristallstruktur von Lysozym aus Hühnereiweiß (193L) mit eingezeichneten Lysin Positionen: Positionen die mit α B-Kristallin (rot) beziehungsweise α B-Kristallin und Hsp26 (gelb) oder gar nicht (blau) quervernetzt wurden sind farbig hervorgehoben.

3.3.3.2 Alkoholdehydrogenase

Bei der Analyse der verifizierten Crosslinks zwischen α B-Kristallin und der Alkoholdehydrogenase (Abbildung 52) entstand mit den insgesamt 17 unterschiedlichen Crosslinkpositionen (bei 100 % Sequenzabdeckung von α B-Kristallin und 73 % Sequenzabdeckung der Alkoholdehydrogenase) auf Seite des sHsps ein sehr ähnliches Bild. Die Crosslinks ließen sich auf Grund ihrer Position in insgesamt drei Gruppen untergliedern. Ein Teil der Crosslinks lag in dem N-terminalen Bereich der Alkoholdehydrogenase und crosslinkt mit dem Bereich um das IXI Motiv. Wohingegen der C-terminale Bereich der Alkoholdehydrogenase neben den Crosslinks zum IXI Motiv auch eine Interaktion mit den N-terminalen Sequenzen von α B-Kristallin zeigte.

		alpha B										
		N-term	K72	K82	K90	K92	K103	K121	K150	K166	K174	K175
Alkoholdehydrogenase	N-term								■	■		■
	K7								■	■		
	K17											
	K21											
	K27											
	K29											
	K38											
	K59											
	K80											
	K83											
	K91											
	K160											
	K163				■							
	K191											
	K206											
	K223											
	K225											
K233												
K275												
K286												
K314		■									■	
K318		■										
K331									■			
K334			■				■					
K347		■						■	■	■	■	

Abbildung 52: Übersicht der Crosslinks mit DSSG zwischen α B-Kristallin und Alkoholdehydrogenase: Von den Datenbanksuchen vorgeschlagene und manuell verifizierte Crosslinks zwischen zwei primären Aminogruppen (gelb).

Für die korrespondierenden Experimente mit Hsp26 (Abbildung 53) wurden ebenfalls sehr gute Sequenzabdeckungen erreicht (100 % für Hsp26 und 73 % für Alkoholdehydrogenase). Die resultierenden Crosslinks auf der Alkoholdehydrogenase zeigten ein zur Verteilung von α B-Kristallin (Abbildung 52) sehr

3.3 Analyse von sHsp/Substrat-Interaktionen durch chemische Quervernetzung

ähnliches Muster. Auch die Crosslinks auf Hsp26, lagen wie schon für Lysozym beobachtet, hauptsächlich in den N-terminalen Bereich und in den $\beta 6$ und $\beta 7$ Strängen.

		Hsp26																						
		N-term	K45	K50	K107	K114	K116	K117	K127	K145	K147	K149	K151	K157	K159	K176	K190	K192	K195	K198	K202	K203		
Alkoholdehydrogenase	N-term		■												■									
	K7		■																					
	K17																							
	K21															■								
	K27	■									■	■				■								
	K29										■		■			■								
	K38																							
	K59																							
	K80																							
	K83	■																						
	K91																							
	K160																							
	K163																							
	K191																							
	K206																							
	K223																							
	K225																							
	K233																							
	K275																							
	K286																							
K314															■									
K318	■																							
K331																								
K334	■										■	■			■					■				
K347	■	■	■												■					■	■			

Abbildung 53: Übersicht der Crosslinks mit DSSG zwischen Hsp26 und Alkoholdehydrogenase: Von den Datenbanksuchen vorgeschlagene und manuell verifizierte Crosslinks zwischen zwei primären Aminogruppen (gelb).

Zeichnet man die verifizierten Crosslinks auf der Kristallstruktur der Alkoholdehydrogenase ein, so zeigt sich, dass die quervernetzten Lysine im N- und C-terminalen Bereich des Substrats in der gleichen Region auf der Struktur liegen (Abbildung 54).

Die Gründe für eine Interaktion hauptsächlich mit diesem Bereich des Moleküls könnte zum Beispiel in der sterischen Zugänglichkeit im Tetramer begründet sein. Geht man davon aus, dass von den sHsps bereits sehr frühe Intermediate erkannt werden (Narberhaus, 2002; Basha et al., 2012), handelt es sich hier möglicherweise um die am leichtesten zugänglichen, instabilen Bereiche im Tetramer.

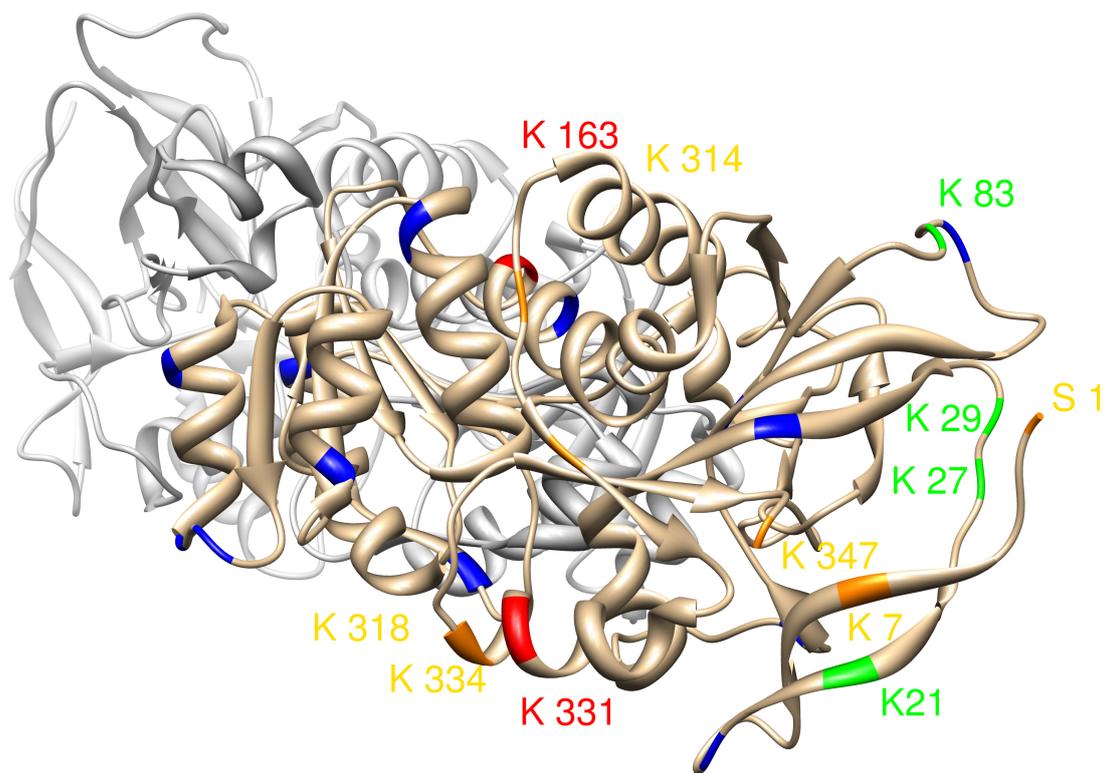


Abbildung 54: Kristallstruktur der Alkoholdehydrogenase aus Bäckerhefe (2HCY) mit eingezeichneten Lysin Positionen: Positionen die mit α B-Kristallin (rot), Hsp26 (grün), beiden (gelb) oder gar nicht (blau) interagierten sind farbig hervorgehoben. Das zweite, direkt interagierende Monomer ist in grau dargestellt.

3.3.3.3 Malatdehydrogenase

Die massenspektroskopische Analyse der Substratkomplexe mit α B-Kristallin und Malatdehydrogenase (Abbildung 55) ergab ebenfalls eine gute Sequenzabdeckung des Chaperons (80 %) und Substrats (85 %). Die insgesamt 13 unterscheidbaren Verknüpfungsstellen gruppieren sich wiederum hauptsächlich um den N-terminalen Bereich der Malatdehydrogenase und dem Bereich um das IXI Motiv in α B-Kristallin.

		alpha B										
		N-term	K72	K82	K90	K92	K103	K121	K150	K166	K174	K175
Malatdehydrogenase	Nterm	■				■		■		■	■	
	K2	■										
	K21											
	K54											
	K67											
	K81											
	K132											
	K133											
	K141											
	K161											
	K179											
	K191											
	K215											
	K217	■										
	K245											
	K255											
	K272											
	K273							■	■			
	K277										■	
	K283											
K290												
K300												
K304								■				
K305											■	
K311										■		
K314												

Abbildung 55: Übersicht der Crosslinks mit DSSG zwischen α B-Kristallin und Malatdehydrogenase: Von den Datenbanksuchen vorgeschlagene und manuell verifizierte Crosslinks zwischen zwei primären Aminogruppen (gelb).

Mit insgesamt 38 unterscheidbaren Verknüpfungsstellen war die Ausbeute für die Analyse der Komplexe aus Malatdehydrogenase (Sequenzabdeckung 85 %) und Hsp26 (Sequenzabdeckung 88 %) am größten (Abbildung 56). Das Crosslinkmuster in der Malatdehydrogenase unterschied sich nur geringfügig von dem entsprechenden Ergebnis mit α B-Kristallin. Jedoch wurde in dem für Hsp26 ansonsten bevorzugt quervernetzten Bereich von Position 147 bis 157 lediglich ein einziger Crosslink gefunden.

		Hsp26																				
		N-term	K45	K50	K107	K114	K116	K117	K127	K145	K147	K149	K151	K157	K159	K176	K190	K192	K195	K198	K202	K203
Malatdehydrogenase	Nterm																					
	K2																					
	K21																					
	K54																					
	K67																					
	K81																					
	K132																					
	K133																					
	K141																					
	K161																					
	K179																					
	K191																					
	K215																					
	K217																					
	K245																					
	K255																					
	K272																					
	K273																					
	K277																					
	K283																					
K290																						
K300																						
K304																						
K305																						
K311																						
K314																						

Abbildung 56: Übersicht der Crosslinks mit DSSG zwischen Hsp26 und Malatdehydrogenase: Von den Datenbanksuchen vorgeschlagene und manuell verifizierte Crosslinks zwischen zwei primären Aminogruppen (gelb).

3.3 Analyse von sHsp/Substrat-Interaktionen durch chemische Quervernetzung

Überträgt man nun die Positionen aller beobachteten Crosslinks auf die Kristallstruktur der Malatdehydrogenase (1MLD) (Abbildung 57), so fällt auf, dass die beobachteten Crosslinks deutlich stärker räumlich verteilt sind als zum Beispiel bei der Alkoholdehydrogenase (Abbildung 54).

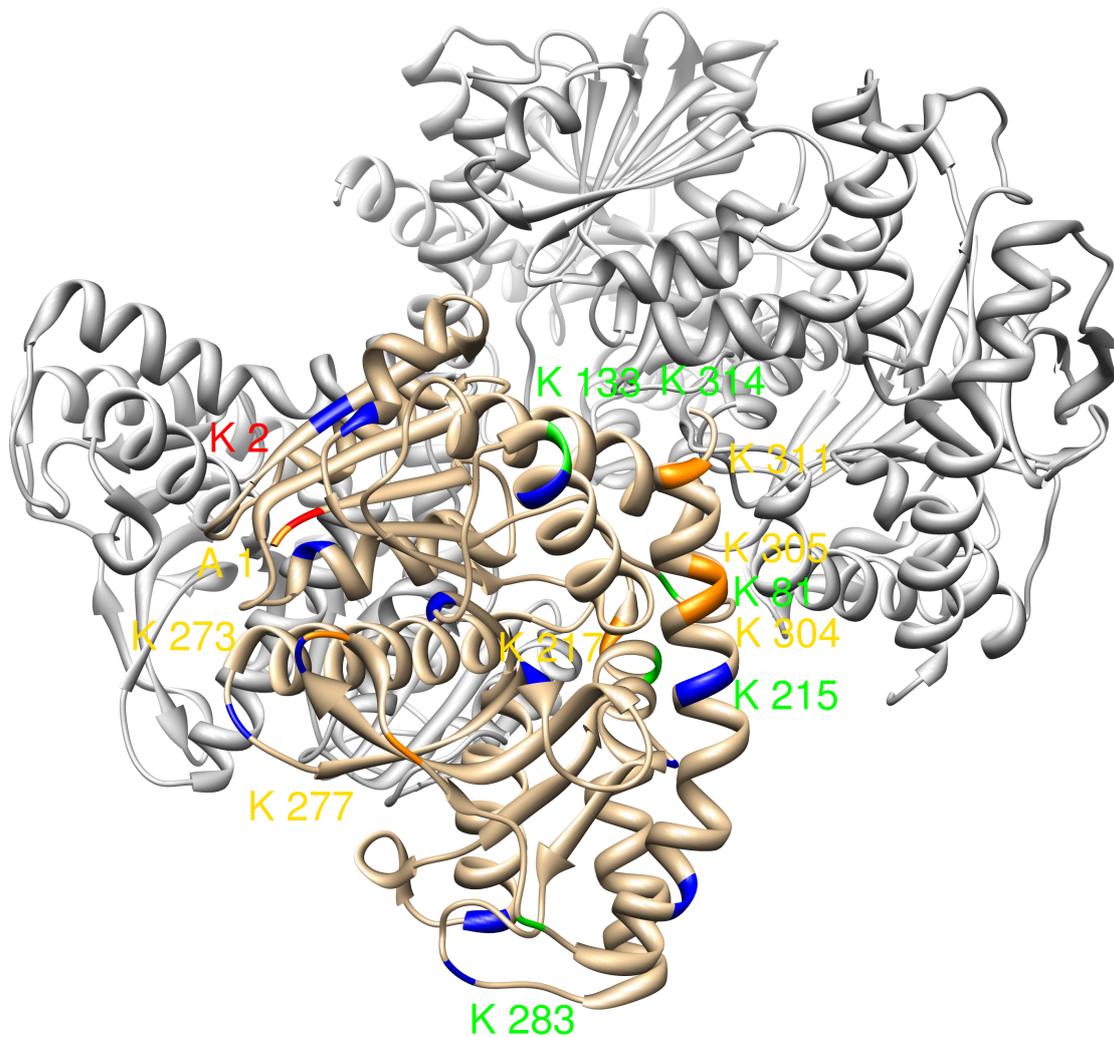


Abbildung 57: Kristallstruktur der Malatdehydrogenase aus dem Schweineherzen (1MLD) mit eingezeichneten Lysin Positionen: Positionen die mit α B-Kristallin (rot), Hsp26 (grün), beiden (gelb) oder gar nicht (blau) interagierten sind farbig hervorgehoben. Das zweite, direkt interagierende Monomer ist in grau dargestellt.

In dieser Kristallstruktur der Malatdehydrogenase gab es jedoch einen entscheidenden Unterschied. Die Positionen Lysin 215 und 217 sind im intakten Oligomer sehr schlecht zugänglich. Daher ist anzunehmen, dass das Tetramer vor oder bei der Bindung an die sHsps seine Quartärstrukturintegrität verliert.

3.3.3.4 Citratsynthase

Auch wenn die thermische Aggregation der Citratsynthase einer der klassischen Chaperonassays für kleine Hitzeschockproteine ist (Buchner et al., 1998), erwies es sich für die Crosslinkstudien als das am wenigsten geeignete Substrat. Trotz sehr hoher Crosslinkerkonzentrationen (300fach molarer Überschuss) konnte jeweils nur eine geringe Menge Crosslinkprodukt erzeugt werden. So blieb die Sequenzabdeckung für die Citratsynthase trotz einer sehr großen Anzahl an Messungen mit 67 % niedrig (im Vergleich α B-Kristallin 80 %). Mit insgesamt nur vier unterscheidbaren Verknüpfungspunkten ließ sich über die Verteilung der einzelnen Crosslinks relativ wenig ableiten (Abbildung 58). Jedoch wurden auf α B-Kristallin, wie für die anderen Substrate auch, Bereiche in den N-terminalen Erweiterungen beziehungsweise zu Beginn und Ende der α -Kristallin-Domäne gefunden.

		alpha B													
		N-term	K72	K82	K90	K92	K103	K121	K150	K166	K174	K175			
Citratsynthase	N-term														
	K7														
	K16		■												
	K22														
	K49			■											
	K76														
	K80														
	K82														
	K112														
	K116														
	K166														
	K181														
	K188														
	K206														
	K290														
	K294														
	K300														
	K325		■							■					
	K339														
	K348														
	K355														
	K366														
	K368														
	K423														
	K432														
K437															

Abbildung 58: Übersicht der Crosslinks mit DSSG zwischen α B-Kristallin und Citratsynthase: Von den Datenbanksuchen vorgeschlagene und manuell verifizierte Crosslinks zwischen zwei primären Aminogruppen (gelb).

3.3 Analyse von sHsp/Substrat-Interaktionen durch chemische Quervernetzung

Der für Hsp26 gemessene Datensatz lieferte mit ebenfalls nur 66 % Sequenzabdeckung für Citratsynthase (im Vergleich 88 % für Hsp26) nur eine sehr geringe Anzahl an unterscheidbaren Verknüpfungsstellen (Abbildung 59).

		Hsp26																				
		N-term	K45	K50	K107	K114	K116	K117	K127	K145	K147	K149	K151	K157	K159	K176	K190	K192	K195	K198	K202	K203
Citratsynthase	N-term																					
	K7																					
	K16																					
	K22																					
	K49																					
	K76																					
	K80																					
	K82																					
	K112																					
	K116																					
	K166																					
	K181																					
	K188																					
	K206																					
	K290																					
	K294																					
	K300																					
	K325																					
	K339																					
	K348																					
	K355																					
	K366																					
	K368																					
K423																						
K432																						
K437																						

Abbildung 59: Übersicht der Crosslinks mit DSSG zwischen Hsp26 und Citratsynthase: Von den Datenbanksuchen vorgeschlagene und manuell verifizierte Crosslinks zwischen zwei primären Aminogruppen (gelb).

Interessanterweise lagen aber auch diese Crosslinks auf Positionen, die auch mit anderen Substraten quervernetzt wurden. Innerhalb der Citratsynthase war besonders eine Position (Lysin 16) auffällig, welche in beiden Komplexen mit dem jeweiligen Chaperon quervernetzt wurde. Überträgt man nun die Positionen der Crosslinks auf die Kristallstruktur der nativen Citratsynthase so fällt auf, dass die identifizierten Positionen (anders als zum Beispiel bei der Alkoholdehydrogenase) über das gesamte Molekül verteilt waren (Abbildung 60).

Besonders interessant könnte möglicherweise die auch mit α B-Kristallin verknüpfte Position 49 sein. Dieses Lysin ist zwar grundsätzlich oberflächen zugänglich, liegt aber in einem Bereich, der mit dem C-terminalen Bereich der zweiten Untereinheit interagiert und daher sterisch schwer zugänglich sein sollte. Daher ist es gut möglich, dass diese Position erst nach Dissoziation des Dimers von sHsps gebunden werden kann.

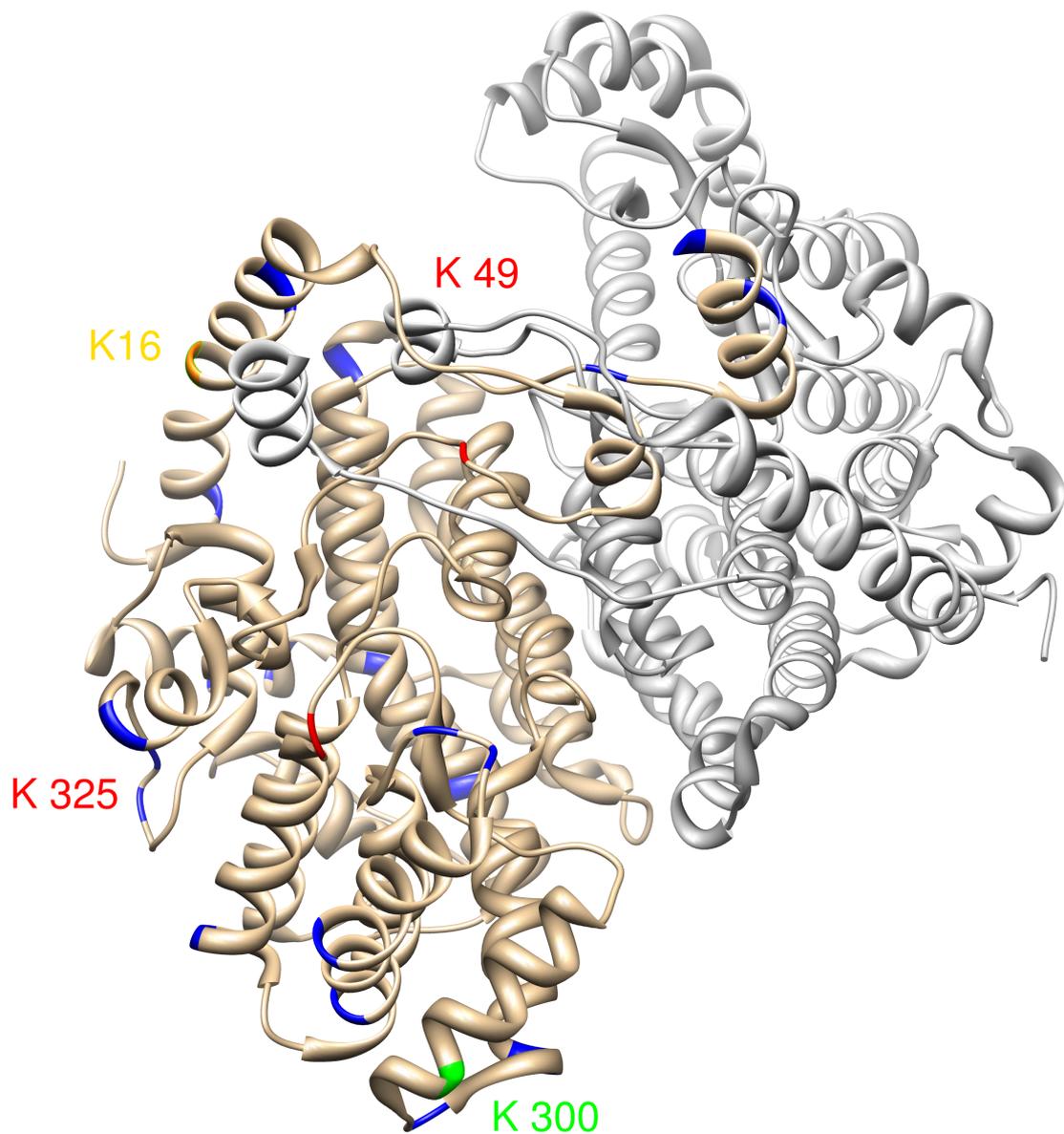


Abbildung 60: Kristallstruktur von der Citratsynthase aus dem Schweineherzen (3ENJ) mit eingezeichneten Lysin Positionen: Positionen die mit α B-Kristallin (rot), Hsp26 (grün), beiden (gelb) oder gar nicht (blau) interagierten sind farbig hervorgehoben. Das zweite, direkt interagierende Monomer ist in grau dargestellt.

3.3.4 Crosslinks mit dem heterobifunktionalem *zero length* Crosslinker EDC/NHS

In weiteren Experimenten sollten nun die mit DSSG erzeugten Crosslinkdaten durch Verwendung einer anderen Linkerlänge und Reaktivität verifiziert und komplementiert werden, da der bisher verwendete homobifunktionale Crosslinker bei der Verwendung mit kleinen Hitzeschockproteinen das Problem hat, dass lediglich eine sehr geringe Anzahl an reaktiven Aminen in den N-terminalen Bereichen des Proteins vorhanden sind (vergleiche Abbildung 42). Um diese Limitierung zu umgehen und zusätzlich die oben generierten Daten mit einer unterschiedlichen Linkerlänge zu testen wurde der *zero-length* Crosslinker EDC/NHS jeweils mit dem Substrat Lysozym verwendet. Jedoch kann über diesen Crosslinker keine Isotopenmarkierung eingebracht werden, was zur Notwendigkeit einer alternativen Verifizierung der Crosslinks führt (siehe Abbildung 62).

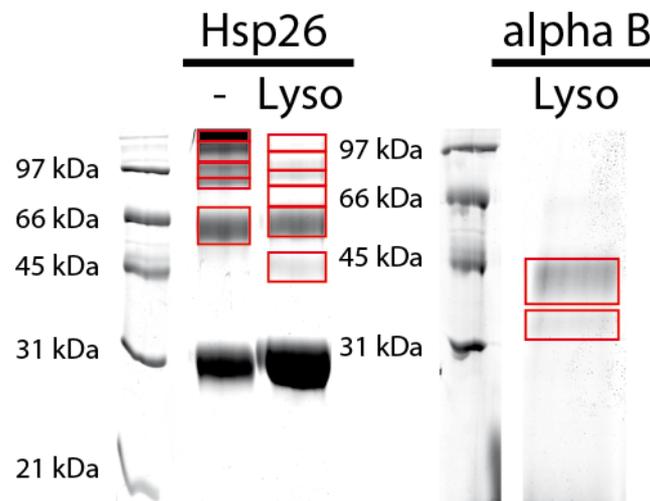


Abbildung 61: Übersicht der Quervernetzungsreaktionen von Hsp26, Hsp26 mit Lysozym und α B-Kristallin mit Lysozym mit EDC/NHS: Für die Ausbildung der Komplexe wurde jeweils 50 μ M Hsp26 beziehungsweise 50 μ M Hsp26 mit 25 μ M Lysozym für 5 min mit einem 100fachen Überschuss an EDC/NHS quervernetzt. Für die Stabilisierung der Komplexe mit α B-Kristallin wurde bei gleichen Konzentrationen der Proteine 30 min mit einem 500fachen molaren Überschuss an Crosslinker gearbeitet. Die Auftrennung erfolgte mittels 12,5 %iger SDS-PAGE. Ungefähre Schnittmarken der Gelbanden: rot.

Die aus den Versuchen mit EDC/NHS resultierenden Gele (Abbildung 61) unterschieden sich deutlich von den entsprechenden Versuchen mit DSSG (Abbildung 43, 45 und 46). Für Hsp26 ohne Substrat wurde ein deutlich größerer Anteil an hochmolekularen Oligomeren gefunden, wohingegen dieser Bereich bei Crosslinks mit Substrat fehlte. Für die Modifikation von Substratkomplexen aus α B-Kristallin und Lysozym musste hier im Vergleich zu Hsp26 deutlich mehr Crosslinker eingesetzt werden und die Inkubationszeit deutlich erhöht werden.

Die Auswertung dieser in der LTQ-Orbitrap gemessener Datensätze gestaltete sich bei diesen Versuchen im Vergleich zu den mit isotope markierten Crosslinkern deutlich schwieriger, da eine Verifizierung der einzelnen Crosslinks in diesem Experiment über das Isotopenmuster nicht möglich ist. Daher kann man in diesem Fall lediglich mit Wahrscheinlichkeiten arbeiten. Bei der hier verwendeten Suchmaschine gibt der pp_{tag} -score die negative logarithmierte Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Aminosäureabfolge des potentiellen Treffers wieder (Xu and Freitas, 2008). Um die Grenzwerte des pp_{tag} -scores für eine *false-discovery-rate* von $\leq 1\%$ zu bestimmen wurde zuerst eine Datenbanksuche mit den Standard-Suchparametern (pp_{tag} -score: 1,3; maximale Abweichung: 10 ppm) durchgeführt (siehe Abbildung 62 und Kapitel 2.2.6.2).

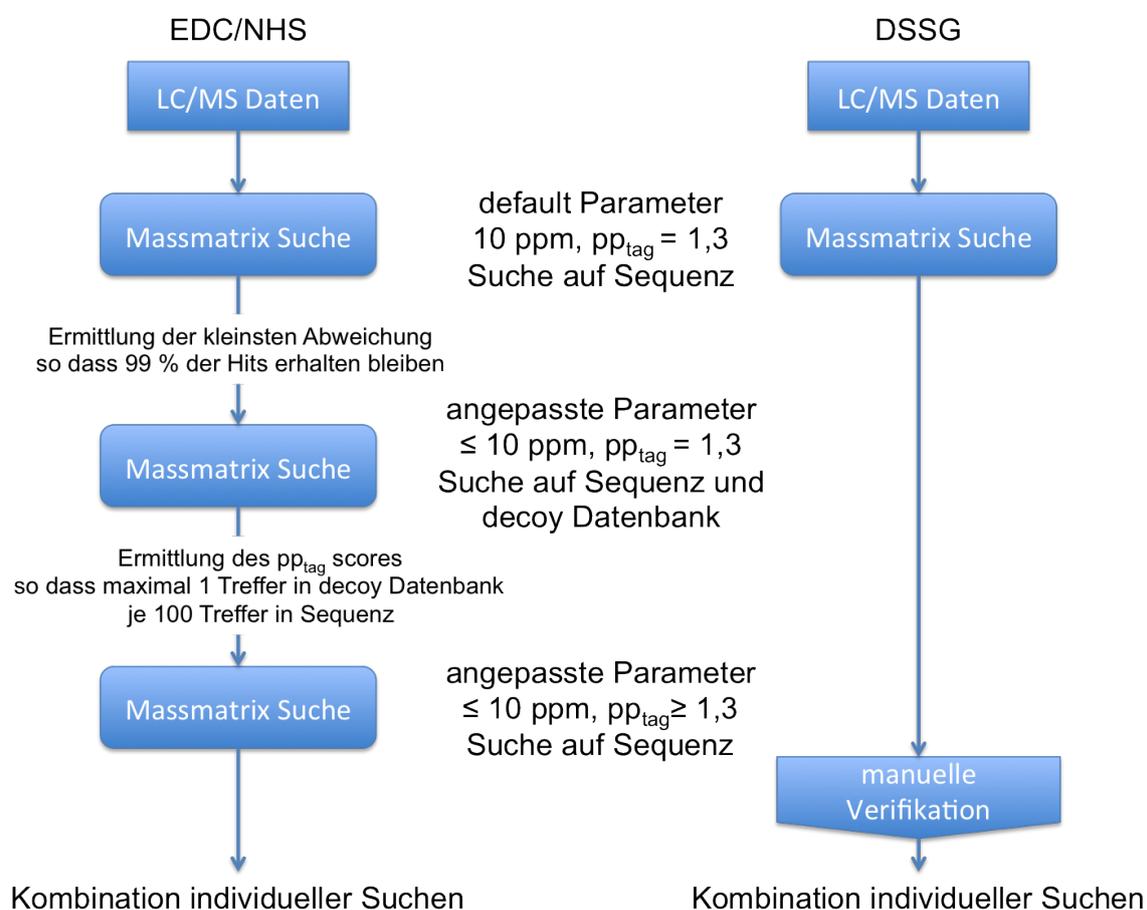


Abbildung 62: Übersicht und Gegenüberstellung der einzelnen Schritte bei den Datenbanksuchen von LC/MS Läufen mit isotope markiertem Crosslinker (rechts) und Crosslinker ohne Isotopenmarkierung (links).

In dem resultierenden Datensatz wurde daraufhin die zulässige Abweichung der *precursor* Masse so angepasst, dass in der neuen Toleranz noch 99 % der ursprünglichen Peptide enthalten waren. Mit diesen modifizierten Suchparametern wurde (pp_{tag} -score: 1,3 maximale Abweichung: ≤ 10 ppm) bei der zweiten Suche sowohl

die entsprechende Datenbank mit den Crosslinkpärchen, wie auch eine *decoy* Datenbank (Moore et al., 2002), welche die Sequenz in umgekehrter Reihenfolge und 20 Sequenzpärchen mit einer zufälligen Aminosäurereihenfolge enthält, durchsucht. Der Vorteil einer im Vergleich zur Sequenzdatenbank deutlich größeren *decoy* Datenbank ist, dass man als Näherung davon ausgehen kann, dass es sich bei allen in der korrekten Datenbank annotierten Peptide um tatsächlich positive Treffer (*true positives*) handelt, wohingegen es sich bei den Treffern in der *decoy* Datenbank ausschließlich um falsch positive Treffer (*false positives*) handeln muss (Huttlin et al., 2007). Anhand dieser beiden Datensätze wurde dann ein Grenzwert für den pp_{tag} -score ermittelt, so dass maximal ein Treffer in der *decoy* Datenbank je 100 korrekt annotierter Peptide gefunden wurde. Mit den so ermittelten Grenzwerten wurde dann wiederum in einer dritten Suche (pp_{tag} -score: $\geq 1,3$; maximale Abweichung: ≤ 10 ppm), die eine falsch-positive Erkennungsrate von $\leq 1\%$ haben sollte, auf der entsprechenden Sequenzdatenbank gesucht. Auf diese Art und Weise wurden jeweils zwei getrennte eigenständige Suchen für den Crosslinker Lysin an Aspartat und Lysin an Glutamat durchgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden anschließend zu einem Datensatz kombiniert.

3.3.4.1 Crosslinks innerhalb Hsp26

Die Auswertung der Crosslinkdaten des Hsp26 Oligomers mit dem *zero space* Crosslinker EDC/NHS ergaben eine Vielzahl von Crosslinks entlang der in Abbildung 63 eingezeichneten Diagonale. Dies bedeutet, dass hier Positionen, die auf der Sequenz von Hsp26 in räumlicher Nachbarschaft liegen, kovalent verknüpft wurden. Zusätzlich konnten auch zwei Gruppen von Crosslinks außerhalb dieser Diagonale identifiziert werden, welche räumliche Nähe in der dreidimensionalen Struktur von auf der Primärstruktur weit entfernten Positionen besitzen müssen (Abbildung 63). So crosslinkte zum einen der Beginn der Mitteldomäne von Hsp26 mit den Positionen des $\beta 6$ und $\beta 7$ Strangs, die bei den Versuchen mit DSSG (Kapitel 3.3.3) auch mit den Substraten interagierten. Zum anderen musste sich in diesem Oligomer der C-terminale Bereich von Hsp26 in direktem Kontakt mit dem Loop zwischen $\beta 3$ und $\beta 4$ Strang (Position Lysin 116, vergleiche Abbildung 4) befinden.

Da keiner der Crosslinks entlang der Diagonale einen direkten Hinweis auf intermolekulare Kontakte gab, ist davon auszugehen, dass diese lediglich lokale Kontakte innerhalb des Monomers widerspiegeln. Die beiden Kontakte außerhalb der Diagonale könnten jedoch wertvolle Hinweise für die, analog zu den Experimenten von Braun et al. (2011), geplante Platzierung der α -Kristallin-Domäne und

3.3 Analyse von sHsp/Substrat-Interaktionen durch chemische Quervernetzung

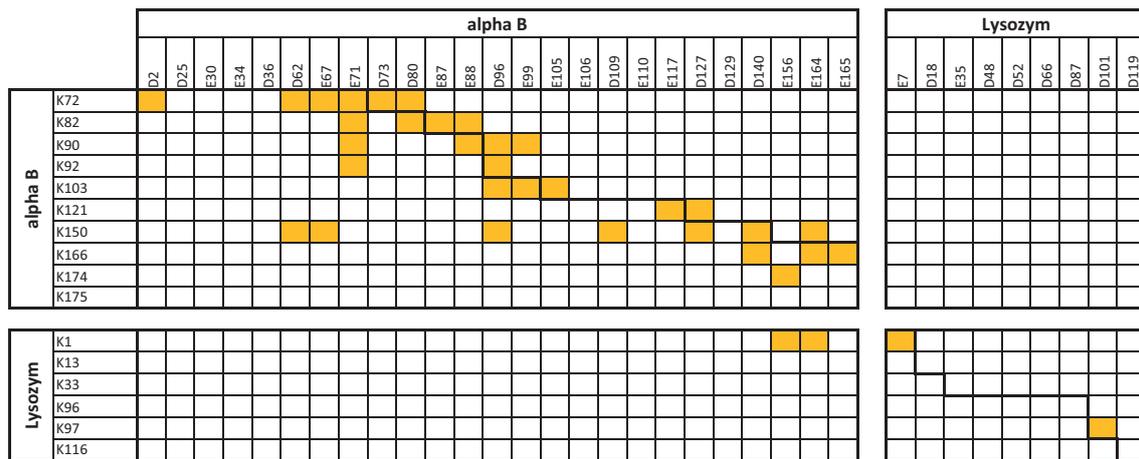


Abbildung 64: Positionsübersicht über Crosslinks (gelb) zwischen α B-Kristallin und Lysozym mit EDC/NHS. Insgesamt gibt es vier mögliche Kombinationen für einen Crosslink: Lysin aus α B-Kristallin crosslinkt mit einer Carboxylgruppe aus α B-Kristallin beziehungsweise Lysozym (obere zwei Felder). Alternativ crosslinkt ein Lysin aus Lysozym mit einer Carboxylgruppe aus α B-Kristallin beziehungsweise Lysozym (untere zwei Felder). Zwei individuelle Suchen (Lysin-Aspartat und Lysin-Glutamat) mit jeweils einer falsch-positiven Erkennungsrate von $\leq 1\%$ wurden kombiniert. Die Diagonale (dicker Strich) gibt die Nähe in der Primärsequenz an.

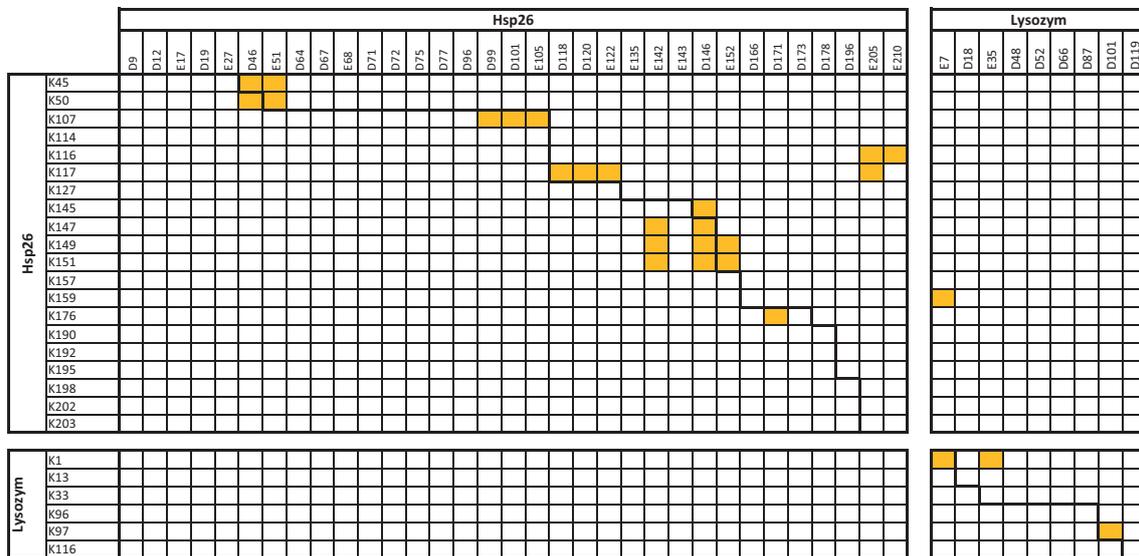


Abbildung 65: Positionsübersicht über Crosslinks (gelb) zwischen Hsp26 und Lysozym mit EDC/NHS. Insgesamt gibt es vier mögliche Kombinationen für einen Crosslink: Lysin aus Hsp26 crosslinkt mit einer Carboxylgruppe aus Hsp26 beziehungsweise Lysozym (obere zwei Felder). Alternativ crosslinkt ein Lysin aus Lysozym mit einer Carboxylgruppe aus Hsp26 beziehungsweise Lysozym (untere zwei Felder). Zwei individuelle Suchen (Lysin-Aspartat und Lysin-Glutamat) mit jeweils einer falsch-positiven Erkennungsrate von $\leq 1\%$ wurden kombiniert. Die Diagonale (dicker Strich) gibt die Nähe in der Primärsequenz an.

Interessanterweise wurden in dem Crosslinkansatz mit Lysozym die Crosslinks zwischen dem N-terminalen Bereich und $\beta 6$ und $\beta 7$ (vergleiche Abbildung 63) nicht identifiziert. Jedoch ist natürlich das Fehlen einzelner Crosslinks an sich nicht aufschlussreich (Rappsilber, 2011).

3.3.5 Diskussion der chemischen Quervernetzung von sHsp Oligomeren und deren Substratkomplexe

Insgesamt wurden für unterschiedliche Chaperon/Substrat/Crosslinker Kombinationen im Laufe der Etablierung der Methodik über 356 LC/MS Läufe (Tabelle 8) aufgenommen und ausgewertet. Vor allem die mit den vier Modellsubstraten (Lysozym, Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase und Citratsynthase) gesammelten Daten lieferten in Abhängigkeit des Substrats eine sehr unterschiedliche Anzahl an auswertbaren Crosslinks. Auffällig hierbei war vor allem, dass die Anzahl der Crosslinks nicht mit der Menge an Messdaten korrelierte (Tabelle 8).

Substrat	DSSG		EDC/NHS	
	Hsp26	α B-Kristallin	Hsp26	α B-Kristallin
—	8	8	16	
Lysozym	20	35	16	19
CS	58	27		
MDH	44	28		
ADH	24	23		
Summe	154	121	32	19

Tabelle 8: Anzahl der LC/MS Läufe je Chaperon/Substrat Kombination der mit dem Crosslinker DSSG beziehungsweise EDC/NHS durchgeführten Experimente.

Vielmehr schienen eher die absoluten Mengen an eingesetzten Peptiden entscheidend über die Ausbeute an auswertbaren Crosslinks gewesen zu sein. So sind die Ausbeuten an quervernetzten Peptiden vor allem bei Experimenten der Chaperone ohne Substrat oder mit Lysozym als Substrat (Abbildung 49 und 50) bei sehr wenigen Läufen relativ hoch. Bei diesen Kombinationen waren auch die aus den SDS-Gelen ausgeschnittenen Banden (zum Beispiel Verknüpfung zwischen einem sHsp Monomer und einem Substratmolekül) sehr deutlich sichtbar. Wohingegen für die Crosslinks mit Citratsynthase die zweifelsfrei auf Chaperon/Substratinteraktion beruhenden Banden deutlich schwächer waren.

Insgesamt konnten mit dem Crosslinker DSSG durch eine Datenbanksuche 132 unterscheidbare Verknüpfungsstellen zwischen den zwei Chaperonen und vier Modellsubstraten vorgeschlagenen und manuell verifiziert werden. Aus der

detaillierten Diskussion der einzelnen Verknüpfungsstellen ist es jedoch sehr schwierig, Informationen über die direkte Substratinteraktion abzuleiten, da die gebildeten Chaperon/Substratkomplexe strukturell sehr heterogen sein können (Stromer et al., 2003) und vermutlich unterschiedliche Stöchiometrien aufweisen (Stengel et al., 2010).

Zusätzlich wurde in H/D Austauschexperimenten gezeigt, dass es für die Chaperon-Substratwechselwirkungen im Ensemble vermutlich keine definierte starre Bindefläche gibt, vielmehr scheinen Substrate über mehrere schwache und dynamische Interaktionen stabilisiert zu werden (Cheng et al., 2008). Während zum Beispiel die angesprochenen H/D Austauschexperimente in Lösung grundsätzlich einen Gleichgewichtszustand („demokratisch“) beschreiben, sind die beobachteten Crosslinkdaten jedoch unter anderem wegen der Irreversibilität der kovalenten Verknüpfung grundsätzlich „undemokratisch“ und können neben einem Teil der in Lösung vorkommenden Komplexe auch kurzlebige Intermediate einfrieren und deren Analyse ermöglichen (Rappsilber, 2011).

Um eine einfachere Interpretation der Crosslinkdaten zu ermöglichen, wurden die Verknüpfungsdaten mit DSSG auf die quervernetzten Positionen des Chaperons (Abbildung 67) oder der Substrate (Abbildung 66) reduziert. Vergleicht man die quervernetzten Positionen der Substrate in Experimenten mit Hsp26 und α B-Kristallin (Abbildung 66), so fällt auf, dass diese stark überlappen. Diese Beobachtung ließe sich dadurch erklären, dass die Entfaltung der Modellsubstrate, und somit die Freisetzung von nicht-nativen Bereichen unabhängig von dem zugesetzten Chaperon stattfindet (Cheng et al., 2008).

Abgesehen von Citratsynthase, für die nur eine sehr geringe Anzahl an Crosslinks gefunden wurde, fällt auf, dass insgesamt vor allem Bereiche an den Termini der Substrate erkannt wurden. Diese Beobachtung ließe sich durch eine erhöhte Flexibilität/Freisetzung von nicht nativen Kontakten in den terminalen Bereichen erklären. So gibt es Studien, die zeigen, dass die künstliche Fixierung der Termini über Disulfidbrücken zu einer erhöhten thermischen Stabilität beziehungsweise Verringerung der Aggregation führen (Perry and Wetzel, 1987; Iwakura and Honda, 1996). Zusätzlich wurde speziell für thermisch denaturierte Malatdehydrogenase mittels H/D Austausch gezeigt, dass sowohl die ersten 80 wie auch die letzten 45 Aminosäuren sehr schnell Sekundärstrukturelemente verlieren (Cheng et al., 2008). Diese Bereiche zeigen präferentiell Crosslinks mit α B-Kristallin und Hsp26. Wohingegen für Bereiche, die auch im sHsp gebundenen Zustand noch Sekundärstrukturelemente enthalten (Positionen 95 bis 156 und 228 bis 252) (Cheng et al., 2008), lediglich ein einzelner Crosslink detektiert wurde.

		alpha B	Hsp26			alpha B	Hsp26			alpha B	Hsp26			alpha B	Hsp26
Alkoholdehydrogenase	N-term			Lysozym	K1			Malatdehydrogenase	Nterm			Citratsynthase	N-term		
	K7				K13				K2				K7		
	K17				K33				K21				K16		
	K21				K96				K54				K22		
	K27				K97				K67				K49		
	K29				K116				K81				K76		
	K38						K132				K80				
	K59						K133				K82				
	K80						K141				K112				
	K83						K161				K116				
	K91						K179				K166				
	K160						K191				K181				
	K163						K215				K188				
	K191						K217				K206				
	K206						K245				K290				
	K223						K255				K294				
	K225						K272				K300				
	K233						K273				K325				
	K275						K277				K339				
	K286						K283				K348				
K314						K290			K355						
K318						K300			K366						
K331						K304			K368						
K334						K305			K423						
K347						K311			K432						
						K314			K437						

Abbildung 66: Positionsübersicht über mit dem Chaperon mit DSSG quervernetzten Bereiche in den untersuchten Substraten: verifizierte Crosslinks (gelb).

Interessanterweise ist in der Citratsynthase aus Schweineherz die einzige Position, die mit beiden Chaperonen verknüpft wurde, diejenige die auch in anderen filterbasierten Studien von α B-Kristallin beziehungsweise filterbasierten Studien und Crosslinks von Hsp21 aus *A. thaliana* erkannt wurde (Ahrman et al., 2007a,b). Dieser Bereich (die sogenannte Helix A) wurde evolutionär in Citratsynthasen (zum Beispiel aus *S. solfataricus* und *P. furiosus*) deletiert, um eine höhere Thermostabilität zu erzielen (Ahrman et al., 2007a).

Über die Konformation oder lokale Strukturelemente der gebundenen Substrate können auf Grund der Crosslinkdaten nur wenige Aussagen getroffen werden. Da aber zum Beispiel bei der Alkoholdehydrogenase, wie aus der Struktur ersichtlich, zusammenhängende Oberflächen verbrückt wurden, die in der nativen Struktur aus sehr unterschiedlichen Sequenzabschnitten zusammengesetzt werden, liegt die Vermutung nahe, dass hier noch lokale Strukturen vorhanden waren. Dies ist in guter Übereinstimmung mit früheren Daten, dass Faltungs-Intermediate gebunden und diese in einem rückfaltungskompetenten Zustand gehalten werden (Cheng et al., 2008; McHaourab et al., 2009; Ehrnsperger et al., 1999). Für Malatdehydrogenase wurde das Vorhandensein von lokalen Sekundärstrukturelementen nach Bindung an sHsps bereits gezeigt (Jaya et al., 2009),

jedoch muss davon ausgegangen werden, dass das aktive Tetramer zum Teil dissoziierte, da Positionen quervernetzt wurden, die im intakten Tetramer schwer zugänglich sind. Im Gegensatz dazu wurde in früheren Studien gezeigt, dass das T4 Lysozym in einem entfalteten Zustand jedoch in einer bevorzugten Orientierung an sHsps binden kann (Claxton et al., 2008). Wegen der geringen Anzahl an reaktiven Positionen innerhalb des untersuchten Lysozyms aus Hühnereiweiß kann hier allerdings keine Aussage bezüglich der Orientierung des Substrats im Komplex mit α B-Kristallin und Hsp26 getroffen werden.

Die Reduktion der mit DSSG erzeugten Daten auf die Sequenz der Chaperone (Abbildung 67) zeigt, dass auch innerhalb der Sequenz von α B-Kristallin beziehungsweise Hsp26 mit unterschiedlichen Substraten an gleichen Positionen kovalente Verknüpfungen ausgebildet werden konnten. Wie Abbildung 68 (rot) zeigt, sind die Positionen die mit vielen unterschiedlichen Substraten crosslinken an der Oberfläche zugänglich und bilden zwei getrennte Bereiche auf dem Oligomer. Zum einen sind jeweils die drei N-Termini an einer geschlossenen 3fachen Symmetrieachse in einem Abstand von etwa 10 Å zu finden. Zum anderen liegen die Positionen Lysin 72, 150, 166, 174 und 175 ebenfalls in sehr enger Nachbarschaft auf der Oberfläche des Oligomers (Abbildung 68). In beiden untersuchten Chaperonen handelt es sich bei den Positionen mit hoher Ausbeute an potentiellen Interaktionen vor allem um die terminalen Sequenzen, die für sHsps in Lösung zum Teil als sehr flexibel und unstrukturiert beschrieben wurden (van Montfort et al., 2001; Kim et al., 1998; Cheng et al., 2008). Diese Bereiche führten auch in einer methodisch anders ausgelegter Crosslinkstudie zu einer sehr hohen Reaktivität (Jaya et al., 2009). Besonders interessant ist hierbei auch der Vergleich mit der bioinformatischen Studie (Kapitel 3.1), da dort gezeigt wurde, dass die terminalen Bereiche, die hier besonders gut mit den Substraten verknüpfbar sind, in der Evolution mehrfach parallel erfunden und aufgrund funktioneller Kriterien selektiert wurden.

	alpha B										Hsp26																							
	N-term	K72	K82	K90	K92	K103	K121	K150	K166	K174	K175	N-term	K45	K50	K107	K114	K116	K117	K127	K145	K147	K149	K151	K157	K159	K176	K190	K192	K195	K198	K202	K203		
ADH																																		
MDH																																		
Lyso																																		
CS																																		

Abbildung 67: Positionsübersicht über mit Substrat quervernetzten Bereiche auf den kleinen Hitzeschockproteinen: verifizierte Crosslinks (gelb).

Neben den terminalen Bereichen fällt in Hsp26 vor allem der Positionsbereich Lysin 147 bis Lysin 159 auf. Dieser Bereich entspricht dem als β 6 und β 7 bezeichneten

neten Bereich im Monomer. Vor allem der, in Metazoen abwesende, $\beta 6$ Strang ist für die Stabilisierung des Dimers essentiell, wurde aber für Hsp21 auch als potentieller Kandidat für die Substratbindung gefunden (Ahrman et al., 2007b).

Zusätzlich zu den Crosslinkpositionen, die für mindestens drei der vier Substrate beobachtet wurden, existieren in beiden Chaperonen einige Positionen, die lediglich mit bestimmten Substraten quervernetzt wurden. Bei diesen Positionen handelt es sich in beiden Fällen um Lysine innerhalb der $\beta 3$ und $\beta 4$ Stränge die auch bei Crosslinks mit photoaktivierbaren Aminosäuren eine gewisse Substratselektivität zeigten (Jaya et al., 2009). In Übereinstimmung mit dieser Studie wurden auch hier Crosslinks mit der Malatdehydrogenase für diese Bereiche identifiziert. Für αB -Kristallin ragen drei der vier substratspezifischen Crosslinkpositionen (Lysin 90 und 92 und 121) in das sogenannten „Fenster“ (offene 3fache Symmetrieachse) hinein (Abbildung 68, gelb), dass aus drei gekrümmten α -Kristallin-Domän-Dimeren gebildet wird (Braun et al., 2011) und sind dort im Prinzip sehr gut lösungsmittelzugänglich. Mit einem Durchmesser des „Fensters“ von etwa 40 Å ist dies jedoch nicht für große gefaltete Substrate zugänglich. Die vierte substratspezifische Position (Lysin 82) ist ebenfalls im Oligomer zugänglich und zeigt in die zweifache Symmetrieachse (Abbildung 68 B).

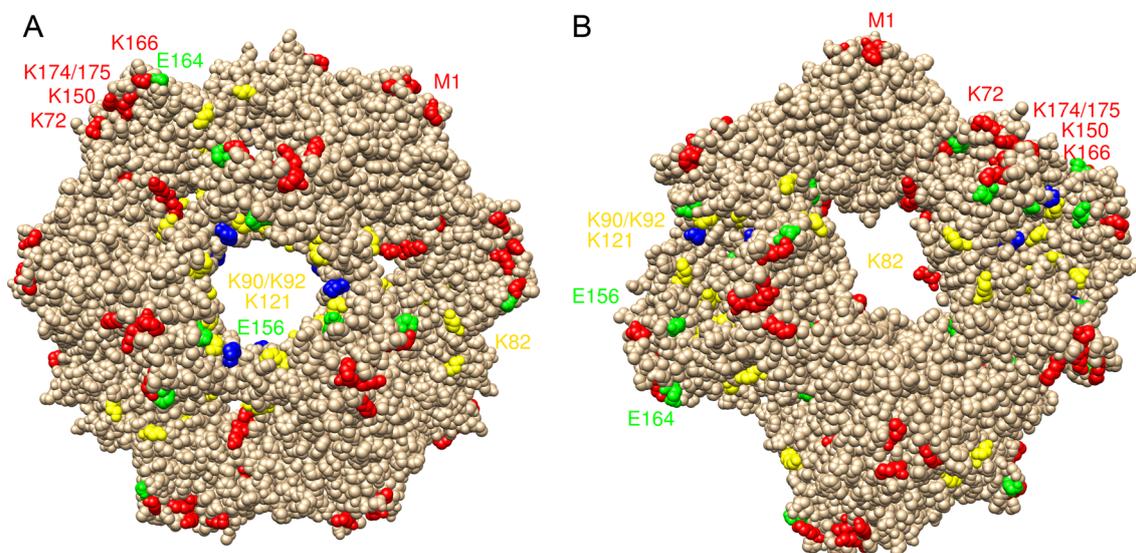


Abbildung 68: Pseudoatomare Struktur von αB -Kristallin (2YGD) mit farblich hervorgehobenen Crosslinkpositionen: DSSG Crosslinks mit mindestens 3 Substraten (rot); substratspezifische Positionen (gelb); Lysine ohne beobachteten Crosslink mit DSSG (blau). Mit dem *zero length* Crosslinker EDC/NHS verbrückte Positionen: grün. (A) Sicht auf die offene dreifache Symmetrieachse. (B) Sicht auf die zweifache Symmetrieachse.

Durch Verwendung eines zweiten Crosslinkers (Kapitel 3.3.4) mit abweichender Reaktivität (EDC/NHS: Lysin-Carboxylgruppen) und ohne zusätzlich eingefügten Linker zwischen den beiden verknüpften Aminosäuren wurde versucht, die

direkten Kontakte zweier Aminosäureketten zu fixieren. Wie erwartet wurde dadurch vor allem bei α B-Kristallin eine deutlich reduzierte Fähigkeit zur Ausbildung von Crosslinks gefunden (Abbildung 61). Diese Reduktion der Ausbeute deutet darauf hin, dass die durch den Linker eingeführte zusätzliche Flexibilität für eine effektive kovalente Verknüpfung notwendig war und die Ketten daher vermutlich nicht in direktem Kontakt standen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die mit EDC/NHS identifizierten Crosslinks den mit DSSG generierten Datensatz unterstützen und mit diesem überlappen. So wurden für α B-Kristallin wiederum zwei Positionen (Glutamat 156 und 164) um das konservierte IXI-Motiv (Position 159/161) gefunden. Diese beiden Positionen liegen vergleichbar zu den mit DSSG identifizierten Positionen in der C-terminalen Erweiterung von α B-Kristallin und sind, in Abhängigkeit der Konformation des Monomers, auch in räumlicher Nähe zu den anderen mit Lysozym interagierenden Positionen. Da in der Literatur angenommen wird, dass die hydrophoben Flächen des β 4 und β 8 Strangs im inaktiven Zustand durch das IXI-Motiv verdeckt werden und dieser Kontakt zur Substratbindung dissoziiert und somit zwei hydrophobe Flächen freigesetzt werden (van Montfort et al., 2001; Ahrman et al., 2007b; Pasta et al., 2004; Jehle et al., 2010), würden die Crosslinks mit EDC/NHS zu diesem Modell passen.

Die detaillierte Diskussion der Hsp26 Crosslinks gestaltet sich deutlich schwieriger, da es hierfür bis jetzt keine verlässlichen Oligomermodelle gibt. Jedoch wird auch mit dem *zero space* Crosslinker, in Übereinstimmung mit den mit DSSG generierten Daten, eine Interaktion zwischen Lysozym und Hsp26 im β 7 Strang vorgeschlagen (Lysin 159).

Somit konnte in dieser Arbeit eine Methodik etabliert werden die es erlaubt, potentielle Interaktionen in analytisch schwer zugänglichen Molekülkomplexen zu untersuchen. Die identifizierten und verifizierten Crosslinks lassen sich sehr gut mit den früheren, für andere sHsps beziehungsweise andere Substrate publizierten Daten auch unter Verwendung alternativer experimentellen Ansätze (Jaya et al., 2009; Ahrman et al., 2007a,b) vereinbaren und tragen somit zum molekularen Verständnis der Interaktion zwischen sHsps und Substraten bei.

4 Zusammenfassung

Kleine Hitzeschockproteine (sHsps) sind molekulare Chaperone, die sich in allen Bereichen des Lebens, mit Ausnahme von wenigen pathogenen Organismen, etabliert haben. Sie alle enthalten neben einer konservierten Domäne, die eine Homologie zu den α -Kristallinen im Auge aufweist und daher α -Kristallin-Domäne genannt wird, N- und C-terminal flankierende Bereiche von sehr unterschiedlicher Länge. Als Aufgabe der Chaperon-Familie geht man davon aus, dass viele Vertreter im zellulären Umfeld ungefaltete oder partiell gefaltete Substrate binden und durch Weitergabe an ATP-abhängige Chaperone die (Rück-)Faltung von Substraten begünstigen. Für die Funktion der sHsps ist die Bildung und Regulation, zum Beispiel über Temperaturänderung oder posttranslationale Modifikationen, eines sehr dynamischen Oligomers aus bis zu 40 Untereinheiten Voraussetzung.

Da die Oligomere beziehungsweise die Komplexe der sHsps mit Substraten auf Grund ihrer Größe und Dynamik analytisch sehr schwer zugänglich sind, wurde in dieser Arbeit versucht, das Verständnis für die Substraterkennung und Bindung an die Oligomere zu verbessern.

Zum einen konnte mit einem bioinformatischem Ansatz gezeigt werden, dass die Evolution der in allen Vertretern vorhandenen, konservierten α -Kristallin-Domäne und der für die Funktion essentiellen, jedoch sehr heterogenen flankierenden Bereiche unabhängig voneinander stattgefunden hat. Die Daten deuten darauf hin, dass die flankierenden Bereiche mehrfach parallel „erfunden“ und selektiert wurden. Diese evolutionäre Vergangenheit hebt die kleinen Hitzeschockproteine deutlich von anderen Proteinfamilien ab, die meist über zusätzliche, zum Beispiel regulatorische Domänen, differenzierten und lenkt bei der Analyse funktioneller Unterschiede zwischen einzelnen Vertretern der Proteinfamilie das Augenmerk besonders auf die flankierenden Bereiche.

In einem zweiten Ansatz konnte ein experimenteller Nachweis erbracht werden, dass die von Hsp26 aus *S. cerevisiae* gebildeten Oligomere in Lösung deutlich heterogener sind als bisher angenommen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die Verteilung der Oligomere *in vitro* über einen sehr breiten Bereich durch die Wahl unterschiedlicher Salz- beziehungsweise Pufferkonzentrationen verschieben lässt. Die unterschiedlichen Aktivitäten der einzelnen *in vitro* unter zum Teil unphysiologischen Bedingungen erzeugten Oligomerverteilungen deuten auf ein regulatorisches Prinzip hin, dass *in vivo* über posttranslationale Modifikationen realisiert werden könnte. Dies konnte für einige bekannte Phosphorylierungsstellen durch phosphomimetische Mutanten *in vitro* gezeigt werden.

In einem dritten Projekt wurden Methoden zur kovalenten Verknüpfung und Analyse von Oligomeren beziehungsweise Substratkomplexen mittels hochauflösender Massenspektrometrietechniken im Labor etabliert. Mit Hilfe dieser Techniken konnten zum einen Kontakte innerhalb des Oligomers identifiziert werden, welche die Grundlage für weitere Modellierungsversuche in dreidimensionalen Rekonstruktionen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Hsp26 bilden sollen. Zum anderen konnte bei der Analyse der Substratkomplexe gezeigt werden, dass es auf Seite der beiden untersuchten sHsps (Hsp26 und α B-Kristallin) Bereiche gab, die mit allen untersuchten Modellsubstraten kovalente Verknüpfungen ausbildeten. Wohingegen es für andere Bereiche eine klare Präferenz für bestimmte Substrate gab. Auf Seite der Substrate konnte gezeigt werden, dass auf diesen von den beiden sHsps sehr ähnliche Bereiche erkannt wurden, was darauf hindeuten könnte, dass das Erkennungsprinzip der nicht-nativen Strukturen für beide sHsps vergleichbar ist. Die so identifizierten Interaktionsstellen können nun als Grundlage einer weiteren biochemischen Charakterisierung der Substraterkennung dienen.

5 Summary

Small heat shock proteins (sHsps) are molecular chaperones, which are present in all kingdoms of life. Apart from a few pathogenic organisms, they can be found in all genomes. All of them share a conserved domain which is named after the abundant eye lense protein α -crystallin. This conserved domain is flanked by N- and C-terminal extensions with varying length. In general it is believed that members of this superfamily can bind unfolded or partial folded substrates in the cell, keep them in a folding-competent state and finally handing them over to the ATP-dependent chaperone families. For the function of sHsps, the formation and regulation of large dynamic oligomeric assemblies with up to 40 subunits e.g. by temperature change or posttranslational modification is essential.

Since these large oligomeric assemblies or complexes with substrates are hard to address by conventional techniques, the aim of this thesis was to get a more detailed understanding of substrate recognition and binding.

A bioinformatic study showed, that the conserved and essential α -crystallin domain and its heterogeneous flanking regions evolved independently with different evolutionary rates. The data suggest that the flanking regions have been invented and selected many times in parallel, possibly upon functional needs. This scenario sets the evolution of sHsps apart from many other protein families which diverged by forming multi domain proteins with varying domain architectures. When analyzing the functional differences of substrate recognition and substrate binding, these findings clearly shift the focus to the unconserved flanking regions.

Another set of experiments showed that the oligomers of Hsp26 from *S. cerevisiae* are much more heterogeneous than previously expected. In addition, the oligomeric assembly can be shifted *in vitro* over a wide range by varying salt and buffer conditions. The different activity of the different oligomers *in vitro* might indicate a regulatory principle which could be realized *in vivo* by posttranslational modifications as indicated by the analysis of some selected phosphomimic mutants *in vitro*.

In a third approach, a workflow for covalent crosslinking of sHsps and sHsp-substrate complexes and analysis by high resolution mass spectrometry was established. On the one hand, with the help of this technique, potential contact sites within the oligomer have been identified which should help modeling the appropriate number of subunits into the 3D reconstructions obtained by electron microscopy and image processing. On the other hand, the analysis of the cross-linked sites in sHsps and substrates showed, that the substrates have identical

interaction sites with both analyzed model sHsps (Hsp26 and α B-crystallin). In the sHsps, some sites could be crosslinked with all analyzed substrates whereas others showed a clear preference for only some substrates. The proposed interaction sites provide a basis for further biochemical characterization of the substrate recognition.

Veröffentlichungen

A. Bepperling, F. Alte, T. Kriehuber, N. Braun, S. Weinkauf, M. Groll, M. Haslbeck and J. Buchner. A new paradigm for bacterial two component small heat shock protein systems. *in Vorbereitung*

A. Drazic, T. Kriehuber, H. Miura, Y. Le, N. Mäusbacher and J. Winter. Reversible methionine oxidation activates a transcription factor in response to oxidative stress. *eingereicht bei Nat Commun*

G. Dogra, F. G. Purschke, V. Wagner, M. Haslbeck, T. Kriehuber, J. G. Hughes, M. L. Van Tassell, C. Gilbert, M. Niemeyer, W. K. Ray, R. F. Helm, and B. E. Scharf. Sinorhizobium meliloti cheA complexed with ches exhibits enhanced binding to cheY1, resulting in accelerated cheY1 dephosphorylation. *J Bacteriol*, 194(5):1075–87, Mar 2012.

T. Kriehuber, T. Rattei, T. Weinmaier, A. Bepperling, M. Haslbeck, and J. Buchner. Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB J*, 24(10):3633–42, Oct 2010.

P. C. Echeverria, M. J. Figueras, M. Vogler, T. Kriehuber, N. de Miguel, B. Deng, M. C. Dalmaso, D. E. Matthews, M. Matrajt, M. Haslbeck, J. Buchner, and S. O. Angel. The hsp90 co-chaperone p23 of toxoplasma gondii: Identification, functional analysis and dynamic interactome determination. *Mol Biochem Parasitol*, 172(2):129–40, Aug 2010.

N. de Miguel, N. Braun, A. Bepperling, T. Kriehuber, A. Kastenmüller, J. Buchner, S. O. Angel, and M. Haslbeck. Structural and functional diversity in the family of small heat shock proteins from the parasite toxoplasma gondii. *Biochim Biophys Acta*, 1793(11): 1738–48, Nov 2009.

Literatur

- B. D. Aebermann and E. R. Waters. A comparative genomic analysis of the small heat shock proteins in *Caenorhabditis elegans* and *Brugia malayi*. *Genetica*, 133(3): 307–19, Jul 2008.
- M. F. Ahmad, B. Raman, T. Ramakrishna, and C. M. Rao. Effect of phosphorylation on alpha b-crystallin: differences in stability, subunit exchange and chaperone activity of homo and mixed oligomers of alpha b-crystallin and its phosphorylation-mimicking mutant. *J Mol Biol*, 375(4):1040–51, Jan 2008.
- E. Ahrman, N. Gustavsson, C. Hultschig, W. C. Boelens, and C. S. Emanuelsson. Small heat shock proteins prevent aggregation of citrate synthase and bind to the n-terminal region which is absent in thermostable forms of citrate synthase. *Extremophiles*, 11(5):659–66, Sep 2007a.
- E. Ahrman, W. Lambert, J. A. Aquilina, C. V. Robinson, and C. S. Emanuelsson. Chemical cross-linking of the chloroplast localized small heat-shock protein, hsp21, and the model substrate citrate synthase. *Protein Sci*, 16(7):1464–78, Jul 2007b.
- B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2002.
- C. P. Albuquerque, M. B. Smolka, S. H. Payne, V. Bafna, J. Eng, and H. Zhou. A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics*, 7(7):1389–96, Jul 2008.
- S. P. Allen, J. O. Polazzi, J. K. Gierse, and A. M. Easton. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174(21):6938–47, Nov 1992.
- C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela, and F. H. White. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 47:1309–1314, Sep 1961.
- C. Bagn ris, O. A. Bateman, C. E. Naylor, N. Cronin, W. C. Boelens, N. H. Keep, and C. Slingsby. Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alpha b-crystallin and hsp20. *J Mol Biol*, 392(5):1242–52, Oct 2009.
- E. V. Baranova, S. D. Weeks, S. Beelen, O. V. Bukach, N. B. Gusev, and S. V. Strelkov. Three-dimensional structure of α -crystallin domain dimers of human small heat shock proteins hspb1 and hspb6. *J Mol Biol*, 411(1):110–22, Aug 2011.

- E. Basha, G. J. Lee, B. Demeler, and E. Vierling. Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat. *Eur J Biochem*, 271(8):1426–36, Apr 2004.
- E. Basha, C. Jones, V. Wysocki, and E. Vierling. Mechanistic differences between two conserved classes of small heat shock proteins found in the plant cytosol. *J Biol Chem*, 285(15):11489–97, Apr 2010.
- E. Basha, H. O'Neill, and E. Vierling. Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci*, 37(3):106–17, Mar 2012.
- J. L. P. Benesch, J. A. Aquilina, A. J. Baldwin, A. Rekas, F. Stengel, R. A. Lindner, E. Basha, G. L. Devlin, J. Horwitz, E. Vierling, J. A. Carver, and C. V. Robinson. The quaternary organization and dynamics of the molecular chaperone hsp26 are thermally regulated. *Chem Biol*, 17(9):1008–17, Sep 2010.
- N. J. Bentley, I. T. Fitch, and M. F. Tuite. The small heat-shock protein hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast*, 8(2):95–106, Feb 1992.
- M. Bertz, J. Chen, M. J. Feige, T. M. Franzmann, J. Buchner, and M. Rief. Structural and mechanical hierarchies in the alpha-crystallin domain dimer of the hyperthermophilic small heat shock protein hsp16.5. *J Mol Biol*, 400(5):1046–56, Jul 2010.
- W. C. Boelens, Y. Croes, M. de Ruwe, L. de Reu, and W. W. de Jong. Negative charges in the c-terminal domain stabilize the alpha-crystallin complex. *J Biol Chem*, 273(43):28085–90, Oct 1998.
- P. Bossier, I. T. Fitch, H. Boucherie, and M. F. Tuite. Structure and expression of a yeast gene encoding the small heat-shock protein hsp26. *Gene*, 78(2):323–30, May 1989.
- M. P. Bova, L. L. Ding, J. Horwitz, and B. K. Fung. Subunit exchange of alpha-crystallin. *J Biol Chem*, 272(47):29511–7, Nov 1997.
- M. P. Bova, H. S. McHaourab, Y. Han, and B. K. Fung. Subunit exchange of small heat shock proteins. analysis of oligomer formation of alpha-crystallin and hsp27 by fluorescence resonance energy transfer and site-directed truncations. *J Biol Chem*, 275(2):1035–42, Jan 2000.
- M. P. Bova, Q. Huang, L. Ding, and J. Horwitz. Subunit exchange, conformational stability, and chaperone-like function of the small heat shock protein 16.5 from *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem*, 277(41):38468–75, Oct 2002.

- S. A. Bowring, J. P. Grotzinger, C. E. Isachsen, A. H. Knoll, S. M. Pelechaty, and P. Kolosov. Calibrating rates of early cambrian evolution. *Science*, 261:1293–8, Sep 1993.
- N. Braun, M. Zacharias, J. Peschek, A. Kastenmüller, J. Zou, M. Hanzlik, M. Haslbeck, J. Rappsilber, J. Buchner, and S. Weinkauff. Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone α b-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(51):20491–6, Dec 2011.
- J. Buchner, H. Grallert, and U. Jakob. Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods Enzymol*, 290:323–38, 1998.
- B. Bukau, E. Deuerling, C. Pfund, and E. A. Craig. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell*, 101(2):119–22, Apr 2000.
- E. P. M. Candido. The small heat shock proteins of the nematode *caenorhabditis elegans*: structure, regulation and biology. *Prog Mol Subcell Biol*, 28:61–78, 2002.
- J. A. Carver, J. A. Aquilina, R. J. Truscott, and G. B. Ralston. Identification by 1h nmr spectroscopy of flexible c-terminal extensions in bovine lens alpha-crystallin. *FEBS Lett*, 311(2):143–9, Oct 1992.
- A. G. Cashikar, M. Duennwald, and S. L. Lindquist. A chaperone pathway in protein disaggregation. hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by hsp104. *J Biol Chem*, 280(25):23869–75, Jun 2005.
- G. J. Caspers, J. A. Leunissen, and W. W. de Jong. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved alpha-crystallin domain. *J Mol Evol*, 40(3):238–248, Mar 1995.
- J. Chen, M. J. Feige, T. M. Franzmann, A. Bepperling, and J. Buchner. Regions outside the alpha-crystallin domain of the small heat shock protein hsp26 are required for its dimerization. *J Mol Biol*, 398(1):122–31, Apr 2010a.
- Z. A. Chen, A. Jawhari, L. Fischer, C. Buchen, S. Tahir, T. Kamenski, M. Rasmussen, L. Lariviere, J.-C. Bukowski-Wills, M. Nilges, P. Cramer, and J. Rappsilber. Architecture of the rna polymerase ii-tfiif complex revealed by cross-linking and mass spectrometry. *EMBO J*, 29(4):717–26, Feb 2010b.
- G. Cheng, E. Basha, V. H. Wysocki, and E. Vierling. Insights into small heat shock protein and substrate structure during chaperone action derived from hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *J Biol Chem*, 283(39):26634–42, Sep 2008.

- A. R. Clark, C. E. Naylor, C. Bagn ris, N. H. Keep, and C. Slingsby. Crystal structure of r120g disease mutant of human α b-crystallin domain dimer shows closure of a groove. *J Mol Biol*, 408(1):118–34, Apr 2011.
- D. P. Claxton, P. Zou, and H. S. Mchaourab. Structure and orientation of t4 lysozyme bound to the small heat shock protein alpha-crystallin. *J Mol Biol*, 375(4): 1026–39, Jan 2008.
- M. O. Dayhoff, R. M. Schwartz, and B. C. Orcutt. *Atlas of Protein Sequence and Structure*, chapter A model of evolutionary change in proteins, pages 345–352. National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, 1978.
- W. W. de Jong, J. A. Leunissen, and C. E. Voorter. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol Biol Evol*, 10(1):103–126, Jan 1993.
- W. W. de Jong, G. J. Caspers, and J. A. Leunissen. Genealogy of the alpha-crystallin–small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol*, 22(3-4): 151–62, 1998.
- N. de Miguel, N. Braun, A. Bepperling, T. Kriehuber, A. Kastenmüller, J. Buchner, S. O. Angel, and M. Haslbeck. Structural and functional diversity in the family of small heat shock proteins from the parasite toxoplasma gondii. *Biochim Biophys Acta*, 1793(11):1738–48, Nov 2009.
- H. Ecroyd, S. Meehan, J. Horwitz, J. A. Aquilina, J. L. P. Benesch, C. V. Robinson, C. E. Macphree, and J. A. Carver. Mimicking phosphorylation of alphab-crystallin affects its chaperone activity. *Biochem J*, 401(1):129–41, Jan 2007.
- R. C. Edgar. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5):1792–7, 2004.
- M. Ehrnsperger, S. Gr ber, M. Gaestel, and J. Buchner. Binding of non-native protein to hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J*, 16(2):221–9, Jan 1997.
- M. Ehrnsperger, H. Lilie, M. Gaestel, and J. Buchner. The dynamics of hsp25 quaternary structure. structure and function of different oligomeric species. *J Biol Chem*, 274(21):14867–74, May 1999.
- H. P. Erickson. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol Proced Online*, 11:32–51, 2009.

- G. Fairbanks, T. L. Steck, and D. F. Wallach. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10(13):2606–17, 1971. ISSN 0006-2960 (Print).
- J. Felsenstein. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author, 2005.
- S. B. Ficarro, M. L. McClelland, P. T. Stukenberg, D. J. Burke, M. M. Ross, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and F. M. White. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 20(3):301–5, Mar 2002.
- R. D. Finn, J. Tate, J. Mistry, P. C. Coghill, S. J. Sammut, H.-R. Hotz, G. Ceric, K. Forslund, S. R. Eddy, E. L. L. Sonnhammer, and A. Bateman. The pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 36:D281–8, Jan 2008.
- S. P. Fling and D. S. Gregerson. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem*, 155(1):83–8, May 1986.
- J.-M. Fontaine, J. S. Rest, M. J. Welsh, and R. Benndorf. The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins. *Cell Stress Chaperones*, 8(1):62–9, 2003.
- E. Franck, O. Madsen, T. van Rheede, G. Ricard, M. A. Huynen, and W. W. de Jong. Evolutionary diversity of vertebrate small heat shock proteins. *J Mol Evol*, 59(6):792–805, Dec 2004.
- T. M. Franzmann. *Chaperone mechanism of the small heat shock protein Hsp26*. Dissertation, Technische Universität München, München, 2008.
- T. M. Franzmann, M. Wühr, K. Richter, S. Walter, and J. Buchner. The activation mechanism of hsp26 does not require dissociation of the oligomer. *J Mol Biol*, 350(5):1083–93, Jul 2005.
- T. M. Franzmann, P. Menhorn, S. Walter, and J. Buchner. Activation of the chaperone hsp26 is controlled by the rearrangement of its thermosensor domain. *Mol Cell*, 29(2):207–16, Feb 2008.
- C. Garrido. Size matters: of the small hsp27 and its large oligomers. *Cell Death Differ*, 9(5):483–5, May 2002.
- M. E. Goldberg, R. Rudolph, and R. Jaenicke. A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry*, 30(11):2790–7, Mar 1991.

- R. A. Gomes, H. Vicente Miranda, M. S. Silva, G. Graça, A. V. Coelho, A. E. Ferreira, C. Cordeiro, and A. P. Freire. Yeast protein glycation in vivo by methylglyoxal. molecular modification of glycolytic enzymes and heat shock proteins. *FEBS J*, 273(23):5273–87, Dec 2006.
- N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, and R. M. Singh. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, 5(2):467–77, Feb 1966.
- S. Gribaldo, V. Lumia, R. Creti, E. Conway de Macario, A. Sanangelantoni, and P. Cammarano. Discontinuous occurrence of the hsp70 (dnak) gene among archaea and sequence features of hsp70 suggest a novel outlook on phylogenies inferred from this protein. *J Bacteriol*, 181(2):434–43, Jan 1999.
- B. A. Griffin, S. R. Adams, and R. Y. Tsien. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science*, 281(5374):269–72, Jul 1998.
- J. Gu, M. Emerman, and S. Sandmeyer. Small heat shock protein suppression of vpr-induced cytoskeletal defects in budding yeast. *Mol Cell Biol*, 17(7):4033–4042, Jul 1997.
- F. U. Hartl. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583):571–579, Jun 1996.
- F. U. Hartl, A. Bracher, and M. Hayer-Hartl. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356):324–332, Jul 2011.
- M. Haslbeck, S. Walke, T. Stromer, M. Ehrnsperger, H. E. White, S. Chen, H. R. Saibil, and J. Buchner. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J*, 18(23):6744–51, Dec 1999.
- M. Haslbeck, N. Braun, T. Stromer, B. Richter, N. Model, S. Weinkauff, and J. Buchner. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 23(3):638–49, Feb 2004a.
- M. Haslbeck, A. Ignatiou, H. Saibil, S. Helmich, E. Frenzl, T. Stromer, and J. Buchner. A domain in the n-terminal part of hsp26 is essential for chaperone function and oligomerization. *J Mol Biol*, 343(2):445–55, Oct 2004b.
- M. Haslbeck, T. Franzmann, D. Weinfurtner, and J. Buchner. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 12(10):842–6, 2005a. ISSN 1545-9993 (Print).

- M. Haslbeck, A. Miess, T. Stromer, S. Walter, and J. Buchner. Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. the cooperation of hsp26 with ssa1 and hsp104. *J Biol Chem*, 280(25):23861–8, Jun 2005b.
- M. Haslbeck, A. Kastenmüller, J. Buchner, S. Weinkauff, and N. Braun. Structural dynamics of archaeal small heat shock proteins. *J Mol Biol*, 378(2):362–74, Apr 2008.
- A. Hawe, M. Sutter, and W. Jiskoot. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm Res*, 25(7):1487–99, Jul 2008.
- D. Hayes, V. Napoli, A. Mazurkie, W. F. Stafford, and P. Graceffa. Phosphorylation dependence of hsp27 multimeric size and molecular chaperone function. *J Biol Chem*, 284(28):18801–7, Jul 2009.
- E. Hilario, E. C. Teixeira, G. A. Pedroso, M. C. Bertolini, and F. J. Medrano. Crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of xac1151, a small heat-shock protein from xanthomonas axonopodis pv. citri belonging to the alpha-crystallin family. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 62(Pt 5):446–8, May 2006.
- E. Hilario, F. J. M. Martin, M. C. Bertolini, and L. Fan. Crystal structures of xanthomonas small heat shock protein provide a structural basis for an active molecular chaperone oligomer. *J Mol Biol*, 408(1):74–86, Apr 2011.
- J. Horwitz. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(21):10449–53, Nov 1992.
- J. Horwitz. Alpha-crystallin. *Exp Eye Res*, 76(2):145–53, Feb 2003.
- E. L. Huttlin, A. D. Hegeman, A. C. Harms, and M. R. Sussman. Prediction of error associated with false-positive rate determination for peptide identification in large-scale proteomics experiments using a combined reverse and forward peptide sequence database strategy. *J Proteome Res*, 6(1):392–8, Jan 2007.
- H. Ito, K. Kamei, I. Iwamoto, Y. Inaguma, D. Nohara, and K. Kato. Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of alpha b-crystallin. *J Biol Chem*, 276(7):5346–52, Feb 2001.
- M. Iwakura and S. Honda. Stability and reversibility of thermal denaturation are greatly improved by limiting terminal flexibility of escherichia coli dihydrofolate reductase. *J Biochem*, 119(3):414–20, Mar 1996.
- U. Jakob, M. Gaestel, K. Engel, and J. Buchner. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*, 268(3):1517–20, Jan 1993.

- N. Jaya, V. Garcia, and E. Vierling. Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(37):15604–9, Sep 2009.
- S. Jehle, B. van Rossum, J. R. Stout, S. M. Noguchi, K. Falber, K. Rehbein, H. Oschkinat, R. E. Klevit, and P. Rajagopal. alphab-crystallin: a hybrid solid-state/solution-state nmr investigation reveals structural aspects of the heterogeneous oligomer. *J Mol Biol*, 385(5):1481–97, Feb 2009.
- S. Jehle, P. Rajagopal, B. Bardiaux, S. Markovic, R. Kühne, J. R. Stout, V. A. Higman, R. E. Klevit, B.-J. van Rossum, and H. Oschkinat. Solid-state nmr and saxs studies provide a structural basis for the activation of alphab-crystallin oligomers. *Nat Struct Mol Biol*, 17(9):1037–42, Sep 2010.
- S. Jehle, B. S. Vollmar, B. Bardiaux, K. K. Dove, P. Rajagopal, T. Gonen, H. Oschkinat, and R. E. Klevit. N-terminal domain of alphab-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(16):6409–14, Apr 2011.
- S. Kalkhof and A. Sinz. Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive n-hydroxysuccinimide esters. *Anal Bioanal Chem*, 392(1-2):305–12, Sep 2008.
- N. Kannan, S. S. Taylor, Y. Zhai, J. C. Venter, and G. Manning. Structural and functional diversity of the microbial kinome. *PLoS Biol*, 5(3):e17, Mar 2007.
- G. Kappé, J. A. M. Leunissen, and W. W. de Jong. Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins. *Prog Mol Subcell Biol*, 28:1–17, 2002.
- G. Kappé, E. Franck, P. Verschuure, W. C. Boelens, J. A. M. Leunissen, and W. W. de Jong. The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: Hspb1-10. *Cell Stress Chaperones*, 8(1):53–61, 2003.
- G. Kappé, W. C. Boelens, and W. W. de Jong. Why proteins without an alpha-crystallin domain should not be included in the human small heat shock protein family hspb. *Cell Stress Chaperones*, 15(4):457–61, Jul 2010.
- C. K. Kennaway, J. L. P. Benesch, U. Gohlke, L. Wang, C. V. Robinson, E. V. Orlova, H. R. Saibil, H. R. Saibi, and N. H. Keep. Dodecameric structure of the small heat shock protein acr1 from mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem*, 280(39):33419–25, Sep 2005.
- K. K. Kim, R. Kim, and S. H. Kim. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 394(6693):595–9, Aug 1998.

- B. P. Kokke, M. R. Leroux, E. P. Candido, W. C. Boelens, and W. W. de Jong. Caenorhabditis elegans small heat-shock proteins hsp12.2 and hsp12.3 form tetramers and have no chaperone-like activity. *FEBS Lett*, 433(3):228–32, Aug 1998.
- H. A. Koteiche and H. S. McHaourab. Mechanism of chaperone function in small heat-shock proteins. phosphorylation-induced activation of two-mode binding in alphas-crystallin. *J Biol Chem*, 278(12):10361–7, Mar 2003.
- T. Kriehuber, T. Rattei, T. Weinmaier, A. Bepperling, M. Haslbeck, and J. Buchner. Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB J*, 24(10):3633–42, Oct 2010.
- A. Kurosky, B. T. Miller, and S. L. Knock. Kinetic analysis of biotinylation of specific residues of peptides by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 631(1-2):281–7, Feb 1993.
- A. Laganowsky and D. Eisenberg. Non-3d domain swapped crystal structure of truncated zebrafish alphaa crystallin. *Protein Sci*, 19(10):1978–84, Oct 2010.
- A. Laganowsky, J. L. P. Benesch, M. Landau, L. Ding, M. R. Sawaya, D. Cascio, Q. Huang, C. V. Robinson, J. Horwitz, and D. Eisenberg. Crystal structures of truncated alphaa and alphas crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. *Protein Sci*, 19(5):1031–43, May 2010.
- M. D. Leavell, P. Novak, C. R. Behrens, J. S. Schoeniger, and G. H. Kruppa. Strategy for selective chemical cross-linking of tyrosine and lysine residues. *J Am Soc Mass Spectrom*, 15(11):1604–11, Nov 2004.
- G. J. Lee, A. M. Roseman, H. R. Saibil, and E. Vierling. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J*, 16(3):659–71, Feb 1997.
- M. R. Leroux, B. J. Ma, G. Batelier, R. Melki, and E. P. Candido. Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins. *J Biol Chem*, 272(19):12847–53, May 1997a.
- M. R. Leroux, R. Melki, B. Gordon, G. Batelier, and E. P. Candido. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J Biol Chem*, 272(39):24646–56, Sep 1997b.
- I. Letunic and P. Bork. Interactive tree of life (itol): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23(1):127–8, Jan 2007.
- K. Liberek, A. Lewandowska, and S. Zietkiewicz. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J*, 27(2):328–35, Jan 2008.

- R. A. Lindner, A. Kapur, M. Mariani, S. J. Titmuss, and J. A. Carver. Structural alterations of alpha-crystallin during its chaperone action. *Eur J Biochem*, 258(1):170–83, Nov 1998.
- R. A. Lindner, J. A. Carver, M. Ehrnsperger, J. Buchner, G. Esposito, J. Behlke, G. Lutsch, A. Kotlyarov, and M. Gaestel. Mouse hsp25, a small shock protein. the role of its c-terminal extension in oligomerization and chaperone action. *Eur J Biochem*, 267(7):1923–32, Apr 2000.
- A. J. Lomant and G. Fairbanks. Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35s]dithiobis(succinimidyl propionate). *J Mol Biol*, 104(1):243–61, Jun 1976.
- S. Mädler, C. Bich, D. Touboul, and R. Zenobi. Chemical cross-linking with nhs esters: a systematic study on amino acid reactivities. *J Mass Spectrom*, 44(5):694–706, May 2009.
- A. Maiolica, D. Cittaro, D. Borsotti, L. Sennels, C. Ciferri, C. Tarricone, A. Musacchio, and J. Rappsilber. Structural analysis of multiprotein complexes by cross-linking, mass spectrometry, and database searching. *Mol Cell Proteomics*, 6(12):2200–11, Dec 2007.
- H. S. McHaourab, J. A. Godar, and P. L. Stewart. Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry*, 48(18):3828–37, May 2009.
- B. T. Miller and A. Kurosky. Elevated intrinsic reactivity of seryl hydroxyl groups within the linear peptide triads his-xaa-ser or ser-xaa-his. *Biochem Biophys Res Commun*, 196(1):461–7, Oct 1993.
- A. Mogk, C. Schlieker, K. L. Friedrich, H.-J. Schönfeld, E. Vierling, and B. Bukau. Refolding of substrates bound to small hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by clpb/dnak. *J Biol Chem*, 278(33):31033–42, Aug 2003.
- R. E. Moore, M. K. Young, and T. D. Lee. Qscore: an algorithm for evaluating sequest database search results. *J Am Soc Mass Spectrom*, 13(4):378–86, Apr 2002.
- G. B. G. Moorhead, V. De Wever, G. Templeton, and D. Kerk. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem J*, 417(2):401–9, Jan 2009.
- G. Morrow, Y. Inaguma, K. Kato, and R. M. Tanguay. The small heat shock protein hsp22 of drosophila melanogaster is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization. *J Biol Chem*, 275(40):31204–10, Oct 2000.

- E. V. Mymrikov, A. S. Seit-Nebi, and N. B. Gusev. Large potentials of small heat shock proteins. *Physiol Rev*, 91(4):1123–59, Oct 2011.
- R. H. Nagaraj, T. Oya-Ito, P. S. Padayatti, R. Kumar, S. Mehta, K. West, B. Levison, J. Sun, J. W. Crabb, and A. K. Padival. Enhancement of chaperone function of alpha-crystallin by methylglyoxal modification. *Biochemistry*, 42(36):10746–55, Sep 2003.
- F. Narberhaus. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(1): 64–93; table of contents, Mar 2002.
- F. H. Niesen, H. Berglund, and M. Vedadi. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc*, 2(9):2212–21, 2007.
- D. E. Nowak, B. Tian, and A. R. Brasier. Two-step cross-linking method for identification of nf-kappab gene network by chromatin immunoprecipitation. *Biotechniques*, 39(5):715–25, Nov 2005.
- T. Oya-Ito, B.-F. Liu, and R. H. Nagaraj. Effect of methylglyoxal modification and phosphorylation on the chaperone and anti-apoptotic properties of heat shock protein 27. *J Cell Biochem*, 99(1):279–291, Sep 2006.
- S. Y. Pasta, B. Raman, T. Ramakrishna, and C. M. Rao. The ixi/v motif in the c-terminal extension of alpha-crystallins: alternative interactions and oligomeric assemblies. *Mol Vis*, 10:655–62, Sep 2004.
- D. N. Peixoto, R. M. Ferreira, V. Paschoalin, and J. Silva. *Evidence for In Vivo Phosphorylation of Hsp26 from Saccharomyces cerevisiae*, chapter 21, pages 521–532. Nova Biomedical Books, 2010.
- S. J. Perlman, M. S. Hunter, and E. Zchori-Fein. The emerging diversity of rickettsia. *Proc Biol Sci*, 273(1598):2097–106, Sep 2006.
- L. J. Perry and R. Wetzel. The role of cysteine oxidation in the thermal inactivation of t4 lysozyme. *Protein Eng*, 1(2):101–5, 1987.
- L. Petko and S. Lindquist. Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell*, 45(6):885–894, Jun 1986.
- E. V. Petrotchenko and C. H. Borchers. Crosslinking combined with mass spectrometry for structural proteomics. *Mass Spectrom Rev*, 29(6):862–76, 2010.

- M. L. Plater, D. Goode, and M. J. Crabbe. Effects of site-directed mutations on the chaperone-like activity of alphab-crystallin. *J Biol Chem*, 271(45):28558–66, Nov 1996.
- N. Plesofsky-Vig, J. Vig, and R. Brambl. Phylogeny of the alpha-crystallin-related heat-shock proteins. *J Mol Evol*, 35(6):537–545, Dec 1992.
- P. Poulain, J.-C. Gelly, and D. Flatters. Detection and architecture of small heat shock protein monomers. *PLoS One*, 5(4):e9990, 2010.
- D. R. Rahman, N. J. Bentley, and M. F. Tuite. The *saccharomyces cerevisiae* small heat shock protein hsp26 inhibits actin polymerisation. *Biochem Soc Trans*, 23(1):77S, Feb 1995.
- T. A. Ramelot, S. Raman, A. P. Kuzin, R. Xiao, L.-C. Ma, T. B. Acton, J. F. Hunt, G. T. Montelione, D. Baker, and M. A. Kennedy. Improving nmr protein structure quality by rosetta refinement: a molecular replacement study. *Proteins*, 75(1):147–67, Apr 2009.
- J. Rappsilber. The beginning of a beautiful friendship: cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes. *J Struct Biol*, 173(3):530–40, Mar 2011.
- T. Rattei, P. Tischler, R. Arnold, F. Hamberger, J. Krebs, J. Krumsiek, B. Wachinger, V. Stümpflen, and W. Mewes. Simap—structuring the network of protein similarities. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue):D289–92, Jan 2008.
- K. Richter, M. Haslbeck, and J. Buchner. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell*, 40(2):253–66, Oct 2010.
- O. Rinner, J. Seebacher, T. Walzthoeni, L. N. Mueller, M. Beck, A. Schmidt, M. Mueller, and R. Aebersold. Identification of cross-linked peptides from large sequence databases. *Nat Methods*, 5(4):315–8, Apr 2008.
- S. L. Rutherford and S. Lindquist. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396(6709):336–342, Nov 1998.
- E. W. Sayers, T. Barrett, D. A. Benson, S. H. Bryant, K. Canese, V. Chetvernin, D. M. Church, M. DiCuccio, R. Edgar, S. Federhen, M. Feolo, L. Y. Geer, W. Helmberg, Y. Kapustin, D. Landsman, D. J. Lipman, T. L. Madden, D. R. Maglott, V. Miller, I. Mizrachi, J. Ostell, K. D. Pruitt, G. D. Schuler, E. Sequeira, S. T. Sherry, M. Shumway, K. Sirotkin, A. Souvorov, G. Starchenko, T. A. Tatusova, L. Wagner, E. Yaschenko, and J. Ye. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue):D5–15, Jan 2009.

- H. Schäfer, K. Nau, A. Sickmann, R. Erdmann, and H. E. Meyer. Identification of peroxisomal membrane proteins of *saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Electrophoresis*, 22(14):2955–68, Aug 2001.
- K. D. Scharf, M. Siddique, and E. Vierling. The expanding family of *arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (acd proteins). *Cell Stress Chaperones*, 6(3):225–37, Jul 2001.
- T. Scheibel, T. Weikl, and J. Buchner. Two chaperone sites in hsp90 differing in substrate specificity and atp dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(4):1495–9, Feb 1998.
- B. Schilling, R. H. Row, B. W. Gibson, X. Guo, and M. M. Young. Ms2assign, automated assignment and nomenclature of tandem mass spectra of chemically crosslinked peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 14(8):834–50, Aug 2003.
- T. B. Schreiber, N. Mäusbacher, J. Soroka, S. K. Wandinger, J. Buchner, and H. Daub. Global analysis of phosphoproteome regulation by the ser/thr phosphatase ppt1 in *saccharomyces cerevisiae*. *J Proteome Res*, Mar 2012.
- P. Schuck. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J*, 78(3):1606–19, Mar 2000.
- R. Shashidharamurthy, H. A. Koteiche, J. Dong, and H. S. McHaourab. Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: dissociation of the hsp27 oligomer is required for recognition and binding of destabilized t4 lysozyme. *J Biol Chem*, 280(7):5281–9, Feb 2005.
- M. Siddique, S. Gernhard, P. von Koskull-Döring, E. Vierling, and K.-D. Scharf. The plant shsp superfamily: five new members in *arabidopsis thaliana* with unexpected properties. *Cell Stress Chaperones*, 13(2):183–97, 2008.
- M. B. Smolka, C. P. Albuquerque, S.-h. Chen, and H. Zhou. Proteome-wide identification of in vivo targets of dna damage checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(25):10364–9, Jun 2007.
- F. Sobott, J. L. P. Benesch, E. Vierling, and C. V. Robinson. Subunit exchange of multimeric protein complexes. real-time monitoring of subunit exchange between small heat shock proteins by using electrospray mass spectrometry. *J Biol Chem*, 277(41):38921–9, Oct 2002.

- J. Soroka, S. K. Wandinger, N. Mäusbacher, T. Schreiber, K. Richter, H. Daub, and J. Buchner. Conformational switching of the molecular chaperone hsp90 via regulated phosphorylation. *Mol Cell*, 45(4):517–28, Feb 2012.
- A. Stamatakis. Raxml-vi-hpc: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21):2688–90, Nov 2006.
- R. Stamler, G. Kappé, W. Boelens, and C. Slingsby. Wrapping the alpha-crystallin domain fold in a chaperone assembly. *J Mol Biol*, 353(1):68–79, Oct 2005.
- F. Stengel, A. J. Baldwin, A. J. Painter, N. Jaya, E. Basha, L. E. Kay, E. Vierling, C. V. Robinson, and J. L. P. Benesch. Quaternary dynamics and plasticity underlie small heat shock protein chaperone function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(5):2007–12, Feb 2010.
- T. Stromer, M. Ehrnsperger, M. Gaestel, and J. Buchner. Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *J Biol Chem*, 278(20):18015–21, May 2003.
- T. Stromer, E. Fischer, K. Richter, M. Haslbeck, and J. Buchner. Analysis of the regulation of the molecular chaperone hsp26 by temperature-induced dissociation: the n-terminal domain is important for oligomer assembly and the binding of unfolding proteins. *J Biol Chem*, 279(12):11222–8, Mar 2004.
- S. Studer and F. Narberhaus. Chaperone activity and homo- and hetero-oligomer formation of bacterial small heat shock proteins. *J Biol Chem*, 275(47):37212–8, Nov 2000.
- S. Studer, M. Obrist, N. Lentze, and F. Narberhaus. A critical motif for oligomerization and chaperone activity of bacterial alpha-heat shock proteins. *Eur J Biochem*, 269(14):3578–86, Jul 2002.
- C. Sugino, M. Hirose, H. Tohda, Y. Yoshinari, T. Abe, Y. Giga-Hama, R. Iizuka, M. Shimizu, S.-i. Kidokoro, N. Ishii, and M. Yohda. Characterization of a shsp of *Schizosaccharomyces pombe*, sphsp15.8, and the implication of its functional mechanism by comparison with another shsp, sphsp16.0. *Proteins*, 74(1):6–17, Jan 2009.
- Y. Sun and T. H. MacRae. The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J*, 272(11):2613–27, Jun 2005.

- C. L. Swaim, J. B. Smith, and D. L. Smith. Unexpected products from the reaction of the synthetic cross-linker 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate), dtssp with peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 15(5):736–49, May 2004.
- J. Swire. Selection on synthesis cost affects interprotein amino acid usage in all three domains of life. *J Mol Evol*, 64(5):558–71, May 2007.
- W. Szaflarski and K. H. Nierhaus. Question 7: optimized energy consumption for protein synthesis. *Orig Life Evol Biosph*, 37(4-5):423–428, Oct 2007.
- K. Takeda, T. Hayashi, T. Abe, Y. Hirano, Y. Hanazono, M. Yohda, and K. Miki. Dimer structure and conformational variability in the n-terminal region of an archaeal small heat shock protein, sthsp14.0. *J Struct Biol*, 174(1):92–9, Apr 2011.
- K. Usui, N. Ishii, Y. Kawarabayasi, and M. Yohda. Expression and biochemical characterization of two small heat shock proteins from the thermoacidophilic crenarchaeon *sulfolobus tokodaii* strain 7. *Protein Sci*, 13(1):134–44, Jan 2004.
- R. L. van Montfort, E. Basha, K. L. Friedrich, C. Slingsby, and E. Vierling. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol*, 8(12):1025–30, Dec 2001.
- M. Ventura, C. Canchaya, Z. Zhang, G. F. Fitzgerald, and D. van Sinderen. Molecular characterization of hsp20, encoding a small heat shock protein of *bifidobacterium breve ucc2003*. *Appl Environ Microbiol*, 73(14):4695–703, Jul 2007.
- C. Vogel, M. Bashton, N. D. Kerrison, C. Chothia, and S. A. Teichmann. Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 14(2): 208–16, Apr 2004.
- M. J. Vos, J. Hageman, S. Carra, and H. H. Kampinga. Structural and functional diversities between members of the human hspb, hsph, hspa, and dnaj chaperone families. *Biochemistry*, 47(27):7001–11, Jul 2008.
- G. Walker. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Wiley, New York, 1998.
- M. C. Walter, T. Rattei, R. Arnold, U. Güldener, M. Münsterkötter, K. Nenova, G. Kastenmüller, P. Tischler, A. Wölling, A. Volz, N. Pongratz, R. Jost, H.-W. Mewes, and D. Frishman. Pedant covers all complete refseq genomes. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue):D408–11, Jan 2009.
- E. R. Waters. The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics*, 141(2):785–795, Oct 1995.

- E. R. Waters and I. Rioflorido. Evolutionary analysis of the small heat shock proteins in five complete algal genomes. *J Mol Evol*, 65(2):162–74, Aug 2007.
- E. R. Waters and E. Vierling. The diversification of plant cytosolic small heat shock proteins preceded the divergence of mosses. *Mol Biol Evol*, 16(1):127–39, Jan 1999.
- E. R. Waters, G. J. Lee, and E. Vierling. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47(3):325–338, 1996.
- E. R. Waters, B. D. Aebermann, and Z. Sanders-Reed. Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new sub-families and reveals diverse evolutionary patterns. *Cell Stress Chaperones*, 13(2):127–42, 2008.
- H. E. White, E. V. Orlova, S. Chen, L. Wang, A. Ignatiou, B. Gowen, T. Stromer, T. M. Franzmann, M. Haslbeck, J. Buchner, and H. R. Saibil. Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein hsp26. *Structure*, 14(7):1197–204, Jul 2006.
- H. Xu and M. A. Freitas. Monte carlo simulation-based algorithms for analysis of shotgun proteomic data. *J Proteome Res*, 7(7):2605–15, Jul 2008.
- H. Xu, L. Zhang, and M. A. Freitas. Identification and characterization of disulfide bonds in proteins and peptides from tandem ms data by use of the massmatrix ms/ms search engine. *J Proteome Res*, 7(1):138–44, Jan 2008.
- H. Xu, P.-H. Hsu, L. Zhang, M.-D. Tsai, and M. A. Freitas. Database search algorithm for identification of intact cross-links in proteins and peptides using tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*, 9(7):3384–93, Jul 2010.
- H. Yang, S. Huang, H. Dai, Y. Gong, C. Zheng, and Z. Chang. The mycobacterium tuberculosis small heat shock protein hsp16.3 exposes hydrophobic surfaces at mild conditions: conformational flexibility and molecular chaperone activity. *Protein Sci*, 8(1):174–9, Jan 1999.

Danksagung

Es gibt sehr viele Personen, bei denen ich mich bedanken möchte, da sie mich in den Jahren meines Studiums und meiner Doktorarbeit unterstützt, gefördert, gefordert oder begleitet haben. Aber sicherlich kann ich nur einen Teil von ihnen erwähnen ...

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei meinem Doktorvater Johannes, er hat mir nicht nur sehr viel Vertrauen und die nötige wissenschaftliche Freiheit gegeben meine eigenen Ideen und Interessen zu verwirklichen, sondern hat mich in meiner ganzen Zeit am Lehrstuhl in jeglicher Richtung unterstützt und gefördert.

Ganz besonderen Dank hat Martin verdient (ich hoffe Hasi weiß jetzt, dass er damit gemeint ist ;)). Er hat mich in all den Jahren mit meinen thematischen und methodischen Fragen immer unterstützt und geduldig mit mir jede wissenschaftliche Diskussion geführt. Ich bin mir sicher er kann den Satz „Du Hasi, sag mal“ schon nicht mehr hören.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei den wissenschaftlichen Kooperationspartnern Sevil Weinkauff und Thomas Rattei für die sehr gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Besonders möchte ich mich hier bei Sevil bedanken, dass sie mich mit meinen „unerwarteten“ Ergebnissen zu Hsp26 von Anfang an ermutigt hat, diesen, vielleicht etwas unbequemen Weg, weiter zu verfolgen.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei meinem „Lieblingselektronenmikroskopiker“ bedanken (OK der Titel war jetzt nicht wirklich schwer verdient). Er hat immer Zeit gefunden mal eben „schnell“ (zu mindestens stellt sich das ein Biochemiker so vor) ein paar Proben zu analysieren.

Erwähnen möchte ich auch den unermüdlichen Einsatz von Alex bei der Durchführung und Auswertung meiner unzähligen UZ-Läufe und die Hilfe von Chris bei meinen *in vivo* Experimenten.

Nina gebührt ganz großer Dank für die unermessliche Hilfe bei allen Fragen und Problemen rund um die Massenspektrometrie. Ohne ihre Hilfe und Einsatz hätte ich es nie geschafft die Geheimnisse der Massenspektrometrie so schnell zu lernen.

Eine ganz wichtige Hilfe bei dem manchmal nervenaufreibenden SysAdmin-Job waren für mich meine SysAdmin-Kollegen Christoph und Mathias. Nur als Team haben wir es geschafft das IT Chaos etwas zu bändigen.

Ein großer Dank gilt auch unseren technischen Angestellten (und ganz besonders

Bibi und Helmut), die mir bei der täglichen Arbeit im Labor sehr viele Routine-tätigkeiten abgenommen haben und mich jederzeit unterstützt haben.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Hilber. Während meiner gesamten Zeit am Lehrstuhl hat sie alle bürokratischen Probleme gelöst und mit ihrem stets gut gefülltem Gummibärchenglas über so manch „kleinen Hunger“ hinweggeholfen.

Einen entscheidenden Anteil am erfolgreichen Abschluss meiner Ausbildung haben auch meine Eltern. Sie haben nicht nur mein wissenschaftliches Interesse erkannt und gefördert, sondern haben mir auch ein sorgenfreies Studium mit viel Rückhalt ermöglicht.

Außerdem möchte ich mich bei all den, hier nicht namentlichen genannten, Praktikanten, Büro- und Laborkollegen bedanken die dazu beigetragen haben, dass ich jeden Tag Spass an meiner Arbeit hatte ... in diesem Zusammenhang muss ich mich vor allem auch für die Nachsicht und Unterstützung meiner Familie bedanken, wenn mich die Arbeit am Abend oder Wochenende mal wieder nicht losgelassen hat ;)

DANKE!

Hiermit erkläre ich, Thomas Kriehuber, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde bisher keiner Prüfungskommission vorgelegt. Teile dieser Arbeit wurden in wissenschaftlichen Journalen veröffentlicht.

Garching, den 29. April 2012

(Thomas Kriehuber)