

# **Elektronenmikroskopische Untersuchungen von kleinen Hitzeschockproteinen**

## **Strukturbiologische Charakterisierung von Sip1 und Hsp17 aus *C. elegans***

Benjamin Rossa

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Natural Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Priv.-Doz. Dr. Gerd Gemmecker

Prüfer\*innen der Dissertation: 1. Prof. Dr. Johannes Buchner  
2. Prof. Dr. Bernd Reif  
3. Prof. Dr. Jürgen Plitzko

Die Dissertation wurde am 26.07.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Natural Sciences am 27.03.2023 angenommen.



# Danksagung

Mein Dank gilt:

zuerst Prof. Dr. Sevil Weinkauf, die es mir ermöglichte ein Teil ihrer Arbeitsgruppe zu sein. Sie begeisterte mich dazu, in der biomolekularen Elektronenmikroskopie ein Praktikum zu absolvieren, meine Masterarbeit und schließlich diese Doktorarbeit zu schreiben. Das freundschaftliche Miteinander, das Sie in ihrer Arbeitsgruppe gefördert hat sowie die hitzigen Diskussionen waren eine große Bereicherung für mich. Auch abseits der Arbeit hat sie mein Leben nachhaltig bereichert.

Prof. Dr. Johannes Buchner für die Unterstützung, die er in schwierigen Zeiten leistete, die Fachdiskussionen und Unterstützung, ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre diese Arbeit zu schreiben.

Dr. Christoph Kaiser für die tiefgreifenden Diskussionen zu jedem denkbaren Thema, seine Hilfe besonders bei biochemischen Arbeiten und der Administration der Computer.

Dr. Carsten Peters für sein Fachwissen zur Elektronenmikroskopie, seine Gesellschaft im Büro und den Gesprächen zum Tagesgeschehen um bei der Arbeit die Bodenhaftung nicht zu verlieren.

Dr. Beate Rockel für ihre Gesellschaft bei der ersten Tasse Kaffee am Morgen, ihre Unterstützung beim Erlernen der Kryoelektronenmikroskopie am MPI, sowie dem gemeinsamen Herumtüteln an oftmals konfuser Software.

Dr. Marianne Hanzlik dafür, mich bei den ersten Schritten in der Elektronenmikroskopie zu begleiten, sowie für ihre stets fröhliche Art.

Besonders danke ich Prof. Dr. Wolfgang Baumeister und Prof. Dr. Jürgen Plitzko vom Max-Planck-Institut für Biochemie, die es mir ermöglicht haben als Gast in ihrer Abteilung tätig zu sein und einen Großteil der Daten während meiner Promotion an ihren Geräten aufzunehmen.

Des Weiteren danke ich dem Lehrstuhl Biotechnologie mit seinen zahlreichen Mitarbeitern, die stets auch einen Platz für mich hatten. Insbesondere danke ich Annika Strauch für die enge und angenehme Zusammenarbeit in sämtlichen Kooperationsprojekten.

Zudem danke ich allen Studenten, die mich bei meiner Arbeit unterstützten, namentlich: Cordula Schnabel, Vera Wanka, Sebastian Peter, Leo Luo, Lisa Richter, Viktor Movileanu, Ramona Absmeier und Tuan Nguyen Khac.

Und schließlich danke ich meiner Familie, ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre. Sie unterstützte mich jederzeit bedingungslos und ist stets eine große Hilfe für mich.

## Publikation

Strauch A., Rossa B., Köhler F., Haeussler F., Mühlhofer M, Rührnößl F., Körösy C., Bushman Y., Conradt B., Haslbeck M., Weinkauff S., Buchner J.: Topological separation of the N-terminal regions in the permanently chaperone-active small heat shock protein Hsp17. JBC: In-review



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XVII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Biomolekulare Transmissionselektronenmikroskopie .....	1
1.1.1. Das Transmissionselektronenmikroskop .....	1
1.1.2. Kryo-TEM .....	4
1.1.3. Kontrastentstehung .....	6
1.1.4. Kontrastdetektion .....	11
1.2. Bildverarbeitung in der Einzelpartikelanalyse .....	14
1.2.1. 3D-Rekonstruktion .....	14
1.2.2. Datenreduktion durch multivariate statistische Analyse .....	15
1.2.3. Anwendung des Satz von Bayes für die Strukturbestimmung .....	16
1.2.4. Berechnung eines Startmodells .....	17
1.3. Kleine Hitzeschockproteine .....	18
1.3.1. Aufbau .....	18
1.3.2. Quartärstruktur .....	21
1.3.3. Funktion .....	22
1.3.4. Substraterkennung .....	23
1.3.5. Aktivierung .....	23
1.3.6. Rolle der sHsps in Krankheiten .....	24
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.1. Elektronenmikroskopie .....	25
2.1.1. Negativkontrastierung .....	25
2.1.2. Kryo-Präparation .....	25
2.1.3. Aufnahme der Bilder .....	25
2.2. Bildverarbeitung .....	26
2.2.1. Vorbereitung der Partikelstapel .....	26
2.2.2. Motion correction .....	26
2.2.3. CTF-Korrektur .....	26
2.2.4. Picking .....	26
2.2.5. Multivariate Statistische Analyse (MSA) .....	26
2.2.6. 2D Klassifizierung .....	27
2.2.7. Startmodellberechnung .....	27
2.2.8. 3D Klassifizierung .....	27

2.2.9.	Symmetry expansion .....	27
2.2.10.	Signal subtraction .....	28
2.2.11.	Local resolution.....	28
2.3.	Modellierung .....	28
2.3.1.	Konsensus Modellierung.....	28
2.3.2.	Rigid-body fitting .....	28
2.3.3.	Flexible fitting (MDFF) .....	28
2.4.	Geräte .....	29
2.5.	Software .....	30
2.6.	Verbrauchsmaterial.....	31
2.7.	Pufferlösungen .....	31
2.8.	Chemikalien.....	32
2.9.	Proteinlösungen.....	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1.	Sip1 .....	33
3.1.1.	Kenntnisstand .....	33
3.1.2.	Elektronenmikroskopische Untersuchung von Sip1 .....	35
3.1.3.	Sortierung der Datensätze anhand der „sideview“ Symmetrie.....	37
3.1.4.	Symmetrische Rekonstruktion des Sip1 28mers .....	39
3.1.5.	Asymmetrische Rekonstruktion zeigt Unregelmäßigkeiten in der Oligomerstruktur.....	41
3.1.6.	CTR „domain-swap“ der apikalen Monomere von Sip1 .....	43
3.1.7.	3D-Variabilitäts-Analyse.....	44
3.1.8.	Möglicher NTR „domain-swap“ .....	46
3.1.9.	NTR Strukturvorhersage .....	47
3.1.10.	Histidin pH-Schalter .....	49
3.1.11.	Flexibles Fitting mittels MDFF.....	51
3.2.	Hsp17 .....	52
3.2.1.	Kenntnisstand .....	52
3.2.2.	Negative stain .....	52
3.2.3.	Kryo-TEM.....	57
3.2.4.	Strukturmodellierung.....	60
3.2.5.	Mapping von Crosslink Daten .....	64
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>67</b>
4.1.	Sip1 .....	67
4.1.1.	Native Struktur zeigt im Gegensatz zur Kristallstruktur D7 Symmetrie .....	67
4.1.2.	D6 Symmetrie ist ein Artefakt der Oligomergeometrie von Sip1 .....	67
4.1.3.	Symmetrische Kryo-EM Rekonstruktion mit lokaler Auflösung .....	68
4.1.4.	Flexibles Fitting mittels MDFF führt zu erster 28mer Struktur in nativer Umgebung .....	68
4.1.5.	Asymmetrische Rekonstruktion offenbart großes konformationelles Spektrum von Sip1 .....	69
4.1.6.	Multibody Variabilitätsanalyse zeigt bimodale Verteilung .....	70



4.1.7.	Vielfalt der apikalen Verbindungen zeigen „domain-swap“ .....	71
4.1.8.	N-terminales I-x-I-Motiv .....	71
4.1.9.	NTR-Strukturvorhersage .....	72
4.1.10.	Prolin als möglicher konformationeller Schalter innerhalb der NTR.....	72
4.1.11.	Histidin 144 hat Einfluss auf Oligomergröße.....	73
4.2.	Hsp17 .....	74
4.2.1.	Unterschiede in der Chaperonreaktion bei verschiedenen Substratproteinen .....	74
4.2.2.	NTR ist wichtig für Oligomerisierung .....	74
4.2.3.	Hsp17 bildet tetrahedrale Oligomere .....	74
4.2.4.	Symmetrische Kryo-EM Rekonstruktion mit lokaler Auflösung .....	74
4.2.5.	Hsp17 liegt im „metazoan fold“ vor .....	75
4.2.6.	Vergleich von Hsp17 mit anderen sHsps.....	75
4.2.7.	NTRs von Hsp17 sind in zwei Gruppen organisiert .....	75
4.2.8.	Duale Funktion der NTRs .....	76
4.2.9.	Asymmetrische Rekonstruktion zeigt „domain-swap“ der CTRs.....	76

**5. Literaturverzeichnis .....XIX**



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Elektronenquelle eines TEM.....	2
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Kondensorsystems eines TEM .....	3
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Objektiv eines TEM mit Probenhalter .....	3
Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Projektionssystems eines TEM.....	4
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Detektionssystems eines TEM.....	4
Abbildung 6: Ablauf des „plunge-freezings“ .....	5
Abbildung 7: Übersicht der Streuungsmöglichkeiten von Elektronen in der Elektronenmikroskopie .....	6
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Elektronenenergieverlust-Spektrums (EELS) .....	8
Abbildung 9: Verlauf der gedämpften CTF bei verschiedenen Defokuswerten .....	9
Abbildung 10: Vergleich von Aufnahmen des 20S Proteasoms mit und ohne Volta Phasenplatte (VPP).....	10
Abbildung 11: Vergleich der CTF ohne und mit VPP .....	11
Abbildung 12: Vergleich der DQE von photographischem Film, CCD-Kamera und Direct-Detector .....	12
Abbildung 13: Gegenüberstellung der Aufnahmen von Rotaviruspartikeln mit und ohne „motion-correction“ .....	13
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Rekonstruktion eines 2D-Bildes mittels „filtered back-projection“ .....	15
Abbildung 15: Flussdiagramm einer Rekonstruktion in RELION.....	17
Abbildung 16: Schema des sHsp-Aufbaus .....	19
Abbildung 17: Vergleich der beiden Bindungsmodi der ACD .....	19
Abbildung 18: Die NTR von Hsp14.1 aus <i>S. solfataricus</i> .....	21
Abbildung 19: Schematische Übersicht der sHsp Funktion.....	22
Abbildung 20: aUZ-Analyse von Sip1 bei verschiedenen pH-Werten, „negative stain“ Aufnahmen, Größenanalyse und 3D Rekonstruktionen .....	33
Abbildung 21: Top- und side-view eines Sip1 32mers .....	34
Abbildung 22: Größenverteilung von Sip1 mittels Kryo-TEM .....	36

Abbildung 23: Eigenbilder eines Sip1 Datensatzes bei pH 8,2.....	37
Abbildung 24: Sideview-Projektionen von Sip1 28mer und 32mer aus TEM- Rekonstruktionen .....	38
Abbildung 25: Klassifizierung der topviews in Relion nach Abtrennung der sideviews	39
Abbildung 26: Verlauf der Sip1 Rekonstruktion .....	40
Abbildung 27: Galerie von 28 Klassen mit asymmetrischer Rekonstruktion .....	42
Abbildung 28: Symmetrische Rekonstruktion mit gefittetem Dimer der Kristallstruktur	43
Abbildung 29: Beschreibung verschiedener Bindungen in das Oligomerzentrum am Beispiel von drei Klassen einer asymmetrischen Rekonstruktion von Sip1 .....	44
Abbildung 30: Ergebnis des „multibody-refinements“ mit 3D-Variabilitäts-Analyse .....	45
Abbildung 31: Vergleich von N-terminal und C-terminal vermittelten Verbindungen zwischen Speichen von Sip1 .....	46
Abbildung 32: Alignment der NTR Sequenz von Sip1 mit den Ergebnissen der genutzten Sekundärstrukturvorhersagealgorithmen .....	47
Abbildung 33: Helix Wheel Diagramm der prognostizierten N-terminalen Helix .....	48
Abbildung 34: Negative stain Aufnahmen von Sip1 Histidinmutanten bei pH 8,2 sowie Histogramme der Größenanalysen dieser Mutanten .....	49
Abbildung 35: C-terminale Histidinmutanten H139A und H144A im Vergleich .....	50
Abbildung 36: Symmetrische Sip1 Rekonstruktion mit flexibel gefitteter pseudoatomarer Struktur.....	51
Abbildung 37: Negative stain Aufnahmen von Hsp17 wt und Hsp17 $\Delta$ NTR sowie Histogramm der Größenanalyse von Hsp17 wt .....	53
Abbildung 38: Eigenbilder von Hsp17 wt .....	53
Abbildung 39: Vergleich der Chaperone-assays von Hsp17 mit Citratsynthase (oben), Malatdehydrogenase (mitte) und Insulin (unten).....	55
Abbildung 40: Zeitlicher Verlauf des Chaperone-assays von Hsp17 mit Insulin als Substratprotein bei 20 °C .....	56
Abbildung 41: Chaperone Assays von Hsp17 mit Insulin als Substratprotein bei 37 °C .....	57
Abbildung 42: Local resolution map der symmetrischen Rekonstruktion von Hsp17...	58
Abbildung 43: Fitting von sHsp ACDs in die Dichte der ACD der Rekonstruktion von Hsp17.....	59

Abbildung 44: Rekonstruktionen von Hsp17 mit gefitteter pseudoatomarer Struktur....	61
Abbildung 45: Asymmetrische Klassifizierung von Hsp17.....	62
Abbildung 46: Rekonstruktion des Oligomers mit gefitteter Struktur .....	63
Abbildung 47: Die Überlagerung der Struktur von Hsp17 mit der Vorhersage (Q20660) des AlphaFold Servers .....	64
Abbildung 48: Mapping der Crosslink Daten auf die pseudoatomare Struktur .....	65
Abbildung 49: Rekonstruktion von Hsp17 mit Farbcodierung der Ergebnisse der Crosslinkexperimente .....	66



## Abkürzungsverzeichnis

°C - Grad Celsius .....	5
µL - Mikroliter.....	25
µm - Mikrometer .....	12
1D - Eindimensional .....	14
2D - Zweidimensional.....	14
3D - Dreidimensional.....	14
Å - Ångstrom .....	6
ACD - α-Kristallindomäne .....	18
ATP - Adenosintriphosphat.....	18
aUZ - analytische Ultrazentrifugation.....	49
CCD - charge coupled device.....	11
CDS - correlated double sampling.....	57
CS - Citratsynthase .....	35
CTF - Kontrasttransferfunktion .....	9
CTR - C-terminale Region .....	18
DDD - direct detection device .....	13
DED - direct electron detector .....	13
DQE - Detektorquanteneffizienz .....	11
DSG - Disuccinimidylglutarat.....	64
e- - Elektron.....	39
EELS - Elektronenenergieverlust-Spektrometrie .....	8
EM - Elektronenmikroskopie.....	28
EMDB - electron microscopy data bank.....	58
eV - Elektronenvolt .....	2
FT - Fouriertransformation.....	15
Hsp - Hitzeschockprotein.....	18
K - Kelvin.....	2
kDa - Kilodalton.....	18

kV - Kilovolt .....	9
mA - Milliampere .....	25
MAP - maximum a posteriori .....	16
max - maximale .....	39
MD - Molekulardynamik .....	29
MDFF - molecular dynamics flexible fitting .....	28
MDH - Malatdehydrogenase .....	52
min - minimal .....	39
mm - Millimeter .....	9
MSA - multivariate statistische Analyse .....	14
MTF - Modulationstransferfunktion .....	10
nm - Nanometer .....	39
NMR - Kernspinresonanzspektroskopie .....	1
NS - negative stain .....	36
NTR - N-terminale Region .....	18
PDB - protein data bank .....	60
pI - isoelektrischer Punkt .....	33
pm - Pikometer .....	9
RH - relative humidity .....	25
SGD - stochastic gradient descent .....	18
sHsp - kleines Hitzeschockprotein .....	18
SMA - supermolecular assemblies .....	52
SNR - Signal-zu-Rausch-Verhältnis .....	12
TEM - Transmissionselektronenmikroskop /-ie .....	1
VPP - Volta-Phasenplatte .....	10
wt - Wildtyp .....	35



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Hersteller. ....	30
Tabelle 2: Verwendete Programme und dazugehörige Publikationen .....	31
Tabelle 3: Genutztes Verbrauchsmaterial und Bezugsquelle .....	31
Tabelle 4: MES/MOPS-Puffer .....	31
Tabelle 5: Phosphate buffered Saline (PBS):.....	31
Tabelle 6: HEPES-Puffer .....	32
Tabelle 7: Kreuzkorrelation verschiedener sHsp Strukturen mit der ACD. ....	59
Tabelle 8: Validierungsstatistik des pseudoatomaren Modells von Hsp17 (7pe3). ...	60



# 1. Einleitung

## 1.1. Biomolekulare Transmissionselektronenmikroskopie

Die genaue Kenntnis der Struktur von Makromolekülen ist wichtig, um ihre Funktion zu verstehen. Neben der Röntgenkristallographie und der NMR ist die Kryo-Elektronenmikroskopie die dritte große strukturblogische Methode. Die Grundlage hierfür war die Entwicklung des Transmissionselektronenmikroskops (TEM) durch Ernst Ruska und Max Knoll 1931 (Knoll & Ruska 1932), für die Ernst Ruska 1986 den Nobelpreis für Physik erhielt. Da biologische Proben der starken Elektronenstrahlung nur kurze Zeit widerstehen konnten, mussten für die Verwendung von TEM für die Untersuchung von Biomolekülen sogenannte „low-dose“-Techniken entwickelt werden. Die ersten gut aufgelösten Strukturen von biologischen Proben wurden mittels kristallographischer Elektronenmikroskopie erstellt. Aaron Klug erhielt 1982 den Nobelpreis für Chemie für die Untersuchung von Nukleinsäure-Protein-Komplexen. Ein weiterer Meilenstein war die Entwicklung der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM), wobei die Probe in ihrem natürlichen Zustand vitrifiziert wird und somit erstmals eine Betrachtung der Proteine im nativen Zustand möglich wurde. Die Bedeutung dieser Entwicklung durch Joachim Frank, Jacques Dubochet und Richard Henderson wurde schließlich 2017 mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigt (NobelPrize.org 2021).

### 1.1.1. Das Transmissionselektronenmikroskop

Als bildgebende Methode gilt für die Elektronenmikroskopie die Abbé-Gleichung für die Punktauflösung und somit die maximal erreichbare Auflösung des Elektronenmikroskops (Abbe 1873):

$$d_{min} = \lambda / (n * \sin \alpha) \quad (1)$$

mit  $\lambda$  Wellenlänge der Strahlung und  $n * \sin \alpha$  numerische Apertur ( $n$  Brechungsindex und  $\alpha$  Öffnungswinkel). In einem TEM hängt die Wellenlänge des Elektronenstrahls von der Beschleunigungsspannung ab (60-1200 kV). Die Wellenlänge ergibt sich aus dem Welle-Teilchen-Dualismus, der durch die de-Broglie-Wellengleichung (de Broglie 1924)

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (2)$$

beschrieben wird. Im Elektronenmikroskop dient die Elektronenkanone (electron gun, Abbildung 1) der Bereitstellung eines Elektronenstrahls mit hoher Helligkeit (= Strahldichte) und hoher temporaler sowie spatialer Kohärenz. Die temporale Kohärenz

$$\lambda_c = v h / \Delta E \quad (3)$$

mit der Geschwindigkeit der Elektronen  $v$  und der Energiespreizung  $\Delta E$  (Williams & Carter 1996) beschreibt die chromatische Aberration der Quelle und sollte minimal sein. Die Spatiale Kohärenz mit

$$d_c = \lambda / 2\alpha \quad (4)$$

hängt vom Öffnungswinkel der Quelle  $\alpha$  ab (Williams & Carter 1996) und wird durch eine möglichst kleine Spitzengeometrie ermöglicht. Eine hohe Kohärenz des Elektronenstrahls ist Voraussetzung für hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie.

Es werden zwei Typen von Elektronenquellen verwendet: Thermionische Kathoden, deren Elektronenaustrittsarbeit durch Heizen der Kathode auf 1400-2700 K erreicht wird und Feldemissionskathoden, aus der die Elektronen quantenmechanisch durch Schottky-Feldemission freigesetzt werden (Orloff 2009). Feldemissionskathoden sind den einfacheren thermionischen Kathoden in jeglicher Hinsicht überlegen und produzieren einen  $10^2$ - $10^3$  mal helleren Strahl mit einer Energiespreizung von nur 0,2 - 0,7 eV statt 1-2 eV bei thermionischen Kathoden.

Die, durch die Kathode freigesetzten Elektronen werden anschließend durch den „Acceleratorstack“ (Abbildung 1) in mehreren Schritten auf ihre finale Geschwindigkeit beschleunigt.

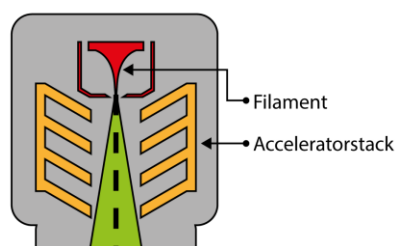


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Elektronenquelle eines TEM. Rot: Filament, orange: Acceleratorstack, grün: Elektronenstrahl

Die Kondensorlinsen (Abbildung 2) dienen der genauen Einstellung der Beleuchtung der Probe. Die Stärke der elektromagnetischen Linsen kann durch die angelegte Spannung moduliert werden. Durch die erste Kondensorlinse wird die Intensität des Elektronenstrahls geregelt, was insbesondere bei der biomolekularen Elektronenmikroskopie wichtig ist, um Strahlungsschäden zu minimieren. Die zweite Kondensorlinse bestimmt den

Strahldurchmesser und damit den Bereich, der belichtet wird. Moderne Hochleistungsmikroskope besitzen noch eine dritte Kondensorlinse die dafür sorgt, dass der Elektronenstrahl je nach Einstellung der anderen beiden Kondensorlinsen parallel auf die Probe trifft und somit ideale Abbildungsbedingungen herrschen. Einfachere Doppelkondensorsysteme ohne dritte Linse können parallele Beleuchtung nur in diskreten Einstellungen gewährleisten und sind somit weniger flexibel in der Anwendung. Hinter den Kondensorlinsen ist die Kondensorblende angebracht, die zur Reduzierung der Strahlintensität und zur Erhöhung der Kohärenz des Elektronenstrahls dient.

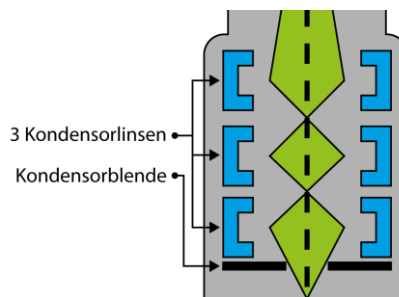


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Kondensorsystems eines TEM. Blau: Linsen, grün: Elektronenstrahl, schwarz: Kondensorblende.

Die Objektivlinse (Abbildung 3) ist die bildgebende Linse im TEM und bestimmt die Auflösung. Die Objektivlinse in modernen TEMs ist in zwei Polstücke geteilt, zwischen denen der Elektronenstrahl parallel verläuft. Die Probe befindet sich in einem Goniometer (Probenbühne/Stage) zwischen den Polstücken und kann dadurch sehr präzise und automatisiert positioniert werden. In der hinteren Brennebene der Objektivlinse liegt die Objektivblende (Kontrastblende), mit der die von der Probe stark gestreuten Strahlen abgeblendet werden, wodurch es zu Kontrasterhöhung kommt. In besonderen Fällen kann statt der Objektivblende an dieser Stelle eine Volta-Phasenplatte (siehe Seite 10) verwendet werden, um durch die induzierte Phasenverschiebung zusätzlichen Kontrast zu erzeugen.

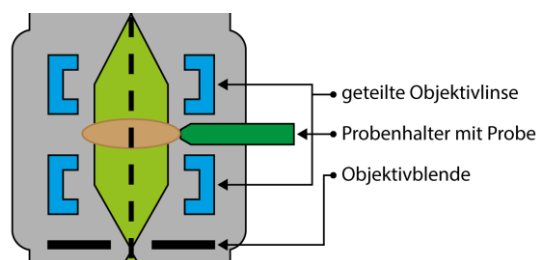


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Objektiv eines TEM mit Probenhalter. Blau: Polstücke der Objektivlinse, hellgrün: Elektronenstrahl, dunkelgrün: Probenhalter, hellbraun: Probe, schwarz: Objektivblende (in der hinteren Fokusebene der Linse).

Das Projektionssystem (Abbildung 4) besteht aus mehreren Linsen und Korrekturspulen, die das Bild vergrößern. Die Anregungen der Linsen kann über einen weiten Bereich

variiert werden, wodurch Vergrößerungen zwischen 50x und mehr als 1 000 000x realisierbar sind. Die Korrekturspulen dienen dazu, die Linsenfehler zu einem gewissen Grad zu korrigieren.

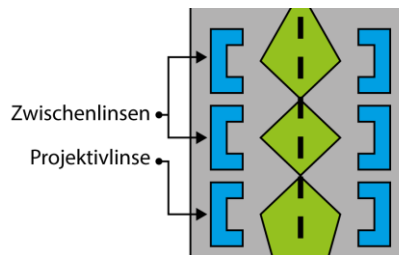


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Projektionssystems eines TEM. Blau: Linsen, grün: Elektronenstrahl.

Das vergrößerte Endbild der Probe wird im einfachsten Fall auf einem Fluoreszenzschirm als Detektor dargestellt und kann direkt „live“ betrachtet werden. Unterhalb des Fluoreszenzschirms befindet sich der Energiefilter (Abbildung 5), der inelastisch gestreute Elektronen, welche einen relevanten Beitrag zum Bildrauschen leisten und nicht von der Objektivblende abgeblockt wurden, herausfiltert. Hierfür werden die Elektronen durch ein magnetisches Prisma nach ihrer Energie aufgespalten (Reimer & Kohl 2008), wodurch anschließend unerwünschte Elektronen durch Positionierung einer Schlitzeblende abgeblockt werden können.

Hinter dem Energiefilter befinden sich schließlich verschiedene Kamerasysteme, die je nach Bedarf in den Elektronenstrahl eingebracht werden können.

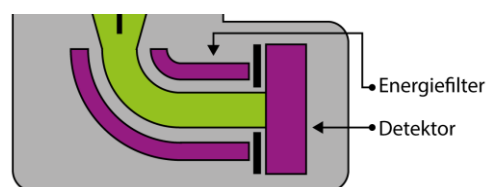


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Detektionssystems eines TEM. Grün: Elektronenstrahl, violett: Energiefilter mit Detektor, schwarz: Schlitzeblende des Energiefilters.

### 1.1.2. Kryo-TEM

Biologische Proben sind typischerweise wässriger Natur, d.h. sie besitzen eine Hydrathülle. Das flüssige Wasser in den Proben kann jedoch nicht im Hochvakuum des Mikroskops bestehen. Dieses Problem kann in der klassischen TEM umgangen werden indem man die Probe mit einer geeigneten Präparationstechnik dehydratisiert, z.B. durch Einbetten in Harz und Trocknung nach Negativkontrastierung mit Schwermetallsalzen. Diese Methoden verursachen jedoch strukturelle Artefakte und sind aufgrund der Körnigkeit der Kontrastmittel nicht für hochaufgelöste Rekonstruktionen verwendbar. Zudem befinden sich die zu untersuchenden Moleküle nach der Präparation nicht mehr in nativer Umgebung was konformationelle Änderungen bewirken und zur Denaturierung des

Proteins führen kann. Bei der Kryo-TEM fixiert man stattdessen die Hydrathülle der Proteine, sowie das umgebende Medium durch Vitrifizieren und verhindert dadurch das Verdampfen des Wassers im Hochvakuum. Hierfür muss ein dünner Probenfilm innerhalb extrem kurzer Zeit (in der Größenordnung von  $10^{-5}$  Sekunden) auf ca.  $-189^{\circ}\text{C}$  abgekühlt werden. Durch die schnelle Kühlrate wird amorphes Eis in der Probe gebildet und gleichzeitig das Wachstum von geordneten Kristallen verhindert, was zu strukturellen Schäden und Bildartefakten führen würde (Moor 1964). Die Proteine werden in einem quasi-nativen Zustand fixiert, die Hydrathülle bleibt erhalten, und man kann das gesamte konformationelle Ensemble des Proteins in der Probe untersuchen.

Die Herstellung von vitrifizierten Proben erfolgt mittels „plunge-freezing“. Dabei wird die Probe auf ein Grid mit Kohlelochfilm aufgetragen und mit Filterpapier abgeblottet, sodass nur noch ein dünner Flüssigkeitsfilm über den Löchern gespannt bleibt (Abbildung 6). Unmittelbar danach wird das Grid in ein geeignetes Kryogen (Ethan, Propan oder eutektische Mischung der Beiden (Tivol et al. 2008)) geschossen und dadurch vitrifiziert (Brüg-geller & Mayer 1980, Dubochet & McDowall 1981). Anschließend muss die Probe ständig unterhalb der Glasübergangstemperatur (reines Wasser ca.  $-136^{\circ}\text{C}$ ) gehalten werden, um einen Phasenübergang des amorphen Wassers zu kristallinen Domänen zu verhindern (Debenedetti 2003). Zudem muss eine Kontamination durch Feuchtigkeit in der Raumluft verhindert werden.

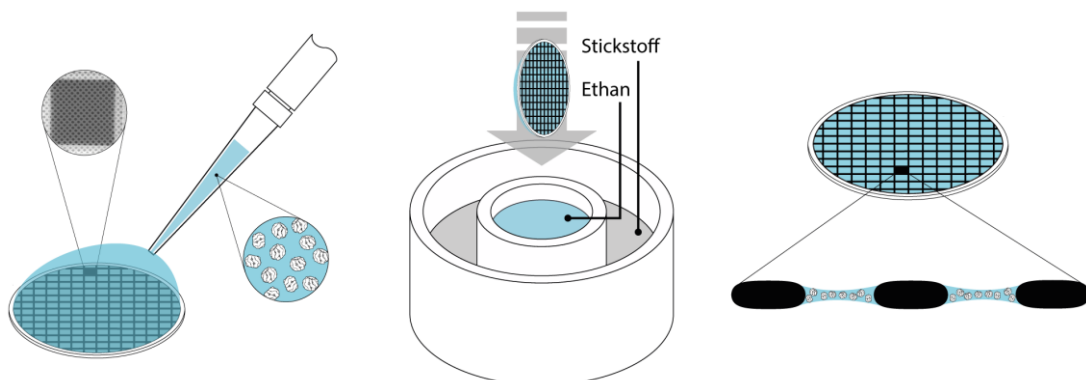


Abbildung 6: Ablauf des „plunge-freezings“. Links: Probe wird auf Trägernetzchen (Grid) mit löchrigem Kohlefilm aufgetragen. Mitte: nachdem der Großteil der Probe mit einem Filterpapier abgeblottet wurde, wird das Netzchen in flüssiges Ethan (oder anderes Kryogen) geschossen. Rechts: Das Ergebnis der Präparation ist ein löchriger Kohlefilm (schwarz) über dessen Löchern sich der vitrifizierte Probenfilm befindet.

Die Interaktion des Elektronenstrahls mit der vitrifizierten Probe führt zum Teil zu inelastischer Streuung der Elektronen an der Probe. Die dabei an die Probe abgegebene Energie führt zu Radiolyse der ionischen und kovalenten Bindungen in organischen Proben. Der dabei freiwerdende Wasserstoff (Leapman & Sun 1995) kann im Mikroskop als „bubbling“ beobachtet werden (Meents et al. 2010). Zudem wird die Probe durch den

Energieeinträge erhitzt, was zunächst zu Kristallwachstum und anschließend zum Schmelzen der Probe führt (Karuppasamy et al. 2011). Aus diesen Gründen gilt für das Arbeiten mit kryofixierten Proben eine starke Dosislimitation. Aus der Limitierung der akzeptablen Elektronendosis folgt ein schlechtes Signal zu Rausch Verhältnis und somit ungünstige Kontrastverhältnisse für die Bildentstehung. Bei einer Elektronendosis von mehr als  $20\text{-}30\text{ e}/\text{\AA}^2$  treten bereits Schäden an den Molekülen in der Probe auf, was es unmöglich macht hochaufgelöste Rekonstruktionen zu erhalten (Baker et al. 2010).

### 1.1.3. Kontrastentstehung

Um Strukturen auf einem Bild unterscheiden zu können, müssen diese durch unterschiedlichen Kontrast voneinander abgrenzbar sein. Wie bereits beschrieben, ist der Kontrast in Kryo-TEM aufgrund der Dosislimitierung schlecht (siehe oben). Kontrastentstehung in der Elektronenmikroskopie beruht auf elastischer und inelastischer Streuung der Elektronen an der Probe (Abbildung 7) und führt in deren Konsequenz zu Amplituden- und Phasenkontrast (Hanßen 1971).

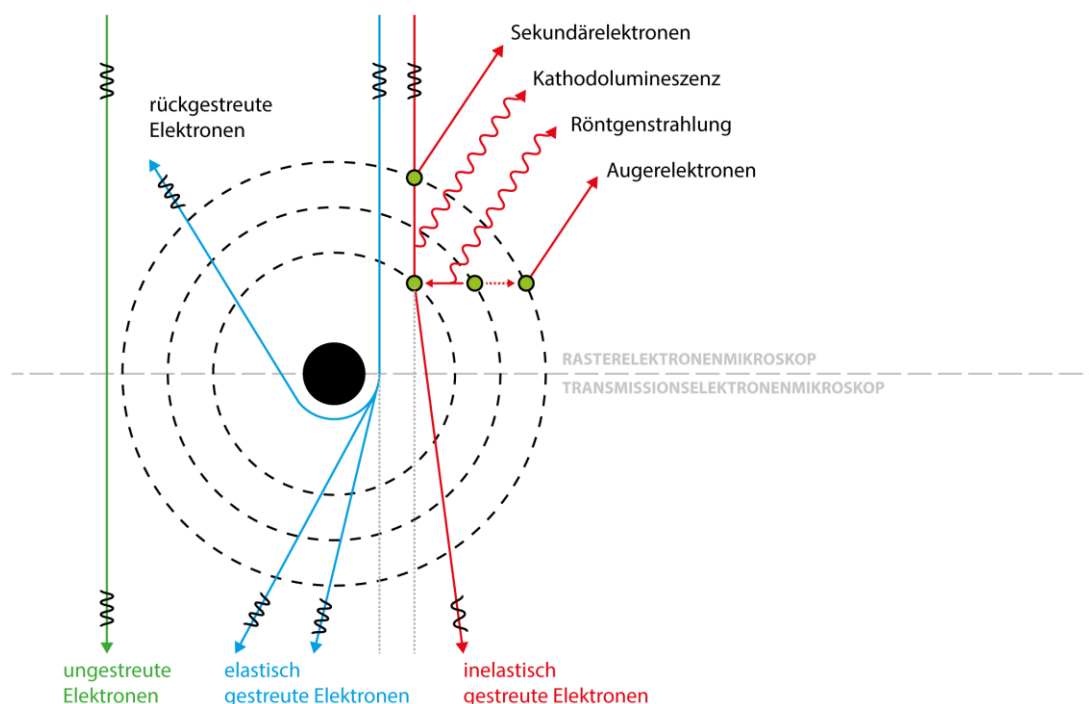


Abbildung 7: Übersicht der Streuungsmöglichkeiten von Elektronen in der Elektronenmikroskopie. Ungestrene Elektronen, die die Probe ohne Interaktion passieren (grün). Elastisch gestreute Elektronen, welche hauptsächlich für die Kontrastentstehung im TEM verantwortlich sind (blau). Inelastisch gestreute Elektronen welche hauptsächlich in der Rasterelektronenmikroskopie (SEM) für die Kontrasterzeugung genutzt werden und im TEM maßgeblich für die Strahlenschäden verantwortlich sind (rot).

Der Phasenkontrast entsteht durch Interferenz der Wellenfunktion von gestreuten Elektronen gegenüber ungestreuten Elektronen. Inelastisch gestreute Elektronen tragen hierbei vor allem zu Rauschen im Bild bei, sofern sie nicht durch einen Energiefilter entfernt



werden. Elastisch gestreute Elektronen hingegen enthalten Informationen über die Probe in Form von Phasenverschiebung, die zur Bilderzeugung genutzt werden können.

Der Amplitudenkontrast entsteht durch Entfernen von Elektronen aus dem Elektronenstrahl bevor diese auf den Detektor treffen (Rose 1984). Dies kann durch Abblocken stark gestreuter Elektronen an der Objektivblende sowie durch Entfernen inelastisch gestreuter Elektronen durch den Energiefilter geschehen. Die Verringerung der Beschleunigungsspannung und das Verkleinern des Objektivblendendurchmessers verstärken den Amplitudenkontrast.

Ein großer Teil der Elektronen passiert die Probe ohne mit der Probe interagiert zu haben (Russo & Passmore 2016). Neben diesen ungestreuten Elektronen werden Elektronen, sofern sie mit Elektronen der Atomhüllen der Probe interagieren, inelastisch gestreut, was mit einem Energieverlust einhergeht. Es werden drei Mechanismen der inelastischen Streuung unterschieden (Reimer & Kohl 2008). Elektronen können von den Atomen der Probe eingefangen werden, was zu Ionisierung des betreffenden Atoms führt und Energie von über 200 eV auf die Probe überträgt (Abbildung 8, rot). Neben der Ionisierung können die Elektronen die Gitterschwingung der Probe anregen und dabei Energie in der Größenordnung von meV auf die Probe übertragen (Abbildung 8, blau). Das Quantenteilchen der Gitterschwingung heißt Phonon, weshalb wir in diesem Fall von Phononenanregung sprechen. Die dritte Möglichkeit der inelastischen Streuung beruht auf der Anregung des Plasmons, dem Quantenteilchen der Schwankung der freien Ladungsträger in der Probe. Bei der Plasmonenanregung werden Energien von 2-50 eV (Abbildung 8, grün) übertragen (Ahn 2004). Neben den Strahlungsschäden, die aufgrund der abgegebenen Energie in der Probe auftreten, verlassen die Elektronen nach der inelastischen Streuung die Probe mit verringerter Energie. Hierdurch werden sie aufgrund der chromatischen Aberration der Linsen nicht korrekt fokussiert und führen zu Unschärfe im Bild. Inelastisch gestreute Elektronen werden typischerweise nur zu kleinen Raumwinkeln gestreut, wodurch sie schlecht von der Objektivblende abgeblockt werden können. Der Energieverlust durch Phononenresonanz ist in der Größenordnung der Energiespreizung der Elektronenquelle und kann nicht mittels Energiefilter herausgefiltert werden. Elektronen, die aufgrund der Plasmonenresonanz Energie verloren haben, können hingegen durch einen Energiefilter von der Detektion ausgeschlossen werden und tragen somit letztendlich zum Amplitudenkontrast bei. Da der Streuungsquerschnitt für die inelastische Streuung von der Kernladungszahl des betreffenden Atoms abhängt, ist der Kontrastbeitrag in der biomolekularen Elektronenmikroskopie aufgrund der typischerweise leichten Elemente nur relativ klein (Bäuerlein 2018).

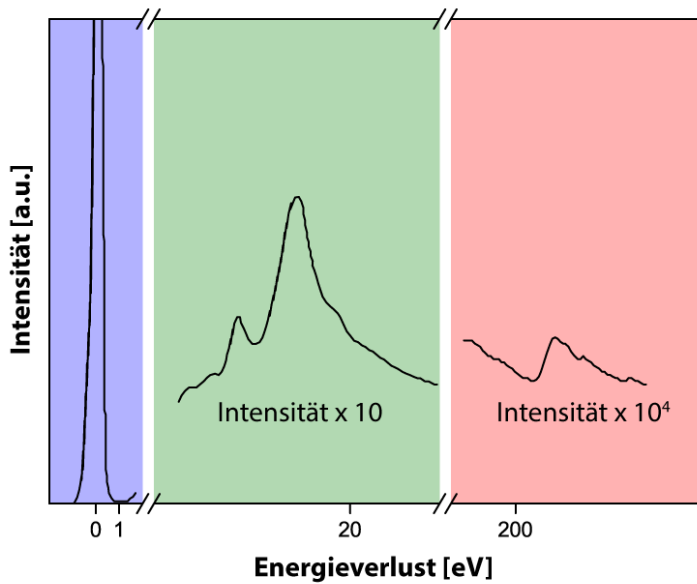


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Elektronenenergieverlust-Spektrums (EELS). Die drei möglichen inelastischen Streuungsereignisse sind farblich unterschiedlich dargestellt. Blau: Der „Zero-loss peak“ beinhaltet Elektronen, die keine Energie an die Probe abgegeben haben. Zudem finden sich Elektronen, die Energie durch Phononenresonanz verloren haben in diesem Peak, da sich der Energieverlust im Bereich von meV abspielt und somit nicht aufgelöst wird. Grün: Die Plasmonresonanz-Peaks treten im Bereich von 2-50 eV auf und können mittels Energiefilter wirkungsvoll herausgefiltert werden. Rot: Das Spektrum der Ionisierungsereignisse ist gekennzeichnet durch hohe Energie im Bereich von über 200 eV. Diese Elektronen werden von der Probe aufgenommen und bewirken starke Strahlenschäden (Kikuchi & Yasuhara 2012).

Bei der elastischen Streuung werden die Elektronen elektrostatisch vom Coulombfeld der Atomkerne in der Probe abgelenkt und erfahren dabei eine Phasenverschiebung bei gleichbleibender Energie (Reimer & Kohl 2008). Atome mit hoher Kernladungszahl streuen die Elektronen zu größeren Raumwinkeln und erzeugen zusammen mit der Objektivblende Amplitudenkontrast (Rose 1984). Die leichten Atome von biologischen Proben streuen hingegen zu geringeren Raumwinkeln und werden somit auf den Detektor projiziert. In der Bildebene kann schließlich die Phasenverschiebung der gestreuten Elektronen zu Interferenz mit ungestreuten Elektronen gebracht werden, was als Phasenkontrast sichtbar wird (Hanßen 1971). Aufgrund der geringen Kernladungszahl und der damit geringen Phasenverschiebung ist die Intensitätsänderung bei Interferenz mit ungestreuten Elektronen nur gering.

Elemente mit niedriger Ordnungszahl erzeugen aufgrund des geringeren Streuungsquerschnitts nur wenig Amplitudenkontrast. Der Amplitudenkontrast spielt somit bei biologischen Proben eine untergeordnete Rolle und beträgt etwa 14 % des Phasenkontrasts (Langmore & Smith 1992).

Um den dennoch geringen Kontrast zu verstärken, kann durch Defokussieren der Objektivlinse eine zusätzliche Phasenverschiebung in den elastisch gestreuten Elektronen

induziert werden (Thon 1966). Dieser Zusammenhang wird in der Kontrasttransferfunktion (CTF) zum Ausdruck gebracht (Frank 1996):

$$CTF(x, \Delta z) = -2 \sin \left[ \pi \left( -\Delta z \lambda x^2 + \frac{1}{2} C_s \lambda^3 x^4 \right) \right] \quad (5)$$

mit zwei mikroskopspezifischen Konstanten: der Wellenlänge der Elektronen  $\lambda$  ( $\lambda = 1,97$  pm bei 300 kV) und der sphärischen Aberration der Objektivlinse  $C_s$ . Zudem hängt die CTF von der Raumfrequenz  $x$  und dem Defokus  $\Delta z$  ab. Abbildung 9 zeigt die Abhängigkeit der CTF vom verwendeten Defokus. Mit zunehmender Raumfrequenz (und somit besserer Auflösung) nimmt die Amplitude der CTF ab. Diese Dämpfung wird durch temporale und spatiale Inkohärenz hervorgerufen, welche als Dämpfungsterme mit der CTF multipliziert werden. Der Effekt dieser Dämpfung kann in Abbildung 9 beobachtet werden (blaue Kurve;  $-3 \mu\text{m}$  Defokus) (Bäuerlein 2018).

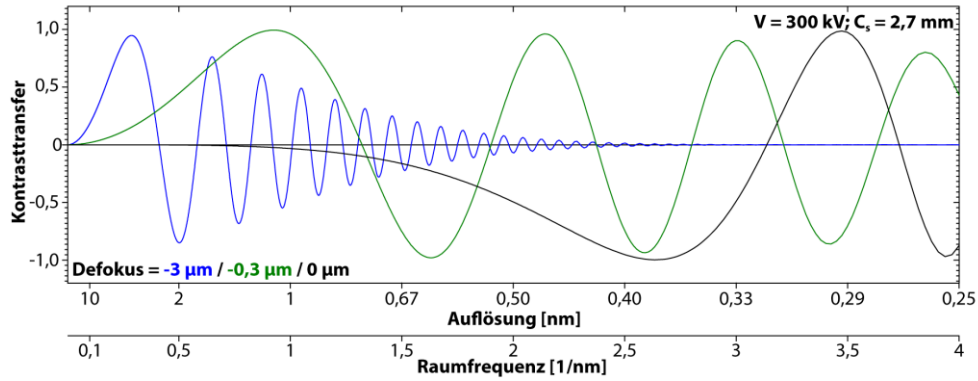


Abbildung 9: Verlauf der gedämpften CTF bei verschiedenen Defokuswerten:  $0 \mu\text{m}$  (schwarz),  $-0,3 \mu\text{m}$  (grün) und  $-3 \mu\text{m}$  (blau) bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV und einem sphärischen Aberrationskoeffizienten von 2,7 mm. Auffällig ist die, mit zunehmenden Defokus stärker werdende Dämpfung der hohen Raumfrequenzen. Je geringer der Defokus, desto weiter verschiebt sich der erste Peak in Richtung der höheren Raumfrequenzen und desto schwerer sind Partikel auf den Negativen zu erkennen. Plots berechnet nach Gleichung (6) (Williams & Carter 1996).

Die Dämpfung durch temporale Inkohärenz wird durch Abweichungen der Wellenlänge des Elektronenstrahls hervorgerufen (Williams & Carter 1996):

$$E_t(x) = \exp \left[ -\frac{1}{2} \pi^2 \lambda^2 x^4 C_c^2 \left( 4 \left( \frac{\Delta I}{I_0} \right)^2 + \left( \frac{\Delta V}{V_0} \right)^2 + \left( \frac{\Delta E}{E_0} \right)^2 \right) \right] \quad (6)$$

Die Hüllfunktion für die temporale Kohärenz hängt von der Energiespreizung der Elektronenquelle  $\Delta V/V_0$ , der Energie des Elektronenstrahls  $\Delta E/E_0$ , der Instabilität der Objektivlinse  $\Delta I/I_0$ , der chromatischen Abberation der Objektivlinse  $C_c$ , der Raumfrequenz  $x$  sowie der Wellenlänge der Elektronen  $\lambda$  ab.

Neben der temporalen Inkohärenz wird die spatiale Inkohärenz durch die Geometrie des Elektronenstrahls hervorgerufen (Williams & Carter 1996):

$$E_s(x) = \exp \left[ - \left( \frac{\pi\alpha}{\lambda} \right)^2 (C_c \lambda^3 x^3 + \Delta z \lambda x)^2 \right] \quad (7)$$

Sie hängt vom Öffnungswinkel der Elektronenquelle  $\alpha$ , dem Defokus  $\Delta z$ , der chromatischen Abberation der Objektivlinse  $C_c$ , der Raumfrequenz  $x$  sowie der Wellenlänge der Elektronen  $\lambda$  ab.

Bei der Detektion der Elektronen mit digitalen Sensoren tritt zudem mit der Modulationstransferfunktion (MTF), eine weitere Dämpfungsfunktion auf, die von der Pixelgröße und anderen hardwarespezifischen Charakteristika der sensitiven Schicht des Detektors abhängt (Hecht 2017).

Da bei stärkerer Defokussierung die Dämpfung der CTF zunimmt, verringert sich die erreichbare Auflösung mit zunehmenden Defokus. Eine Möglichkeit, ausreichend Kontrast zu erhalten und gleichzeitig nicht oder nur wenig zu defokussieren, wurde 2014 mit der Entwicklung der Volta-Phasenplatte (VPP) geschaffen (Danev et al. 2014). Abbildung 10 zeigt Aufnahmen des 20S Proteasoms mit und ohne VPP. Ohne Defokussieren können die Proteine sehr viel deutlicher erkannt werden als auf der konventionellen Aufnahme.

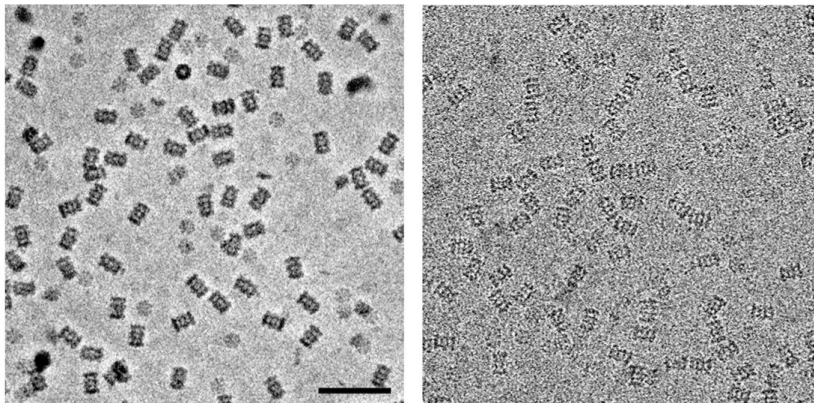


Abbildung 10: Vergleich von Aufnahmen des 20S Proteasoms mit und ohne Volta Phasenplatte (VPP). Links: Aufnahme mit VPP im Fokus mit deutlich erkennbaren Proteinkomplexen. Rechts: Aufnahme ohne VPP bei  $-1,6 \mu\text{m}$  Defokus mit stärkerer Granularität des Hintergrunds und schwächerem Kontrast (Danev & Baumeister 2016).

Statt der Objektivblende wird ein beheizter Kohlefilm in die hintere Fokusebene der Objektivlinse gebracht. Da hier die ungestreuten Elektronen auf einem sehr kleinen Bereich gebündelt werden, kann die Phasenplatte durch Exposition mit dem Elektronenstrahl „konditioniert“ werden. Dabei verändert sich die, durch die Phasenplatte induzierte Phasenverschiebung der ungestreuten Elektronen relativ zu den gestreuten Elektronen. Der

Mechanismus ist nicht genau bekannt, aber es wird vermutet, dass die Bestrahlung zu lokaler Desorption verschiedener Spezies führt und damit eine Veränderung der Elektronenausstrittsarbeit und somit des Volta-Potentials in dem Bereich hervorruft. Durch die Verwendung der VPP ändert sich die CTF wie folgt (Danev et al. 2017):

$$CTF(x, \Delta z) = -2 \sin \left[ \pi \left( -\Delta z \lambda x^2 + \frac{1}{2} C_s \lambda^3 x^4 \right) - \varphi \left( 1 - e^{-\frac{x^2}{2s^2}} \right) \right] \quad (8)$$

mit Phasenverschiebung  $\varphi$ , Radius der VPP  $s$ , Wellenlänge der Elektronen  $\lambda$ , sphärische Aberration der Objektivlinse  $C_s$ , Raumfrequenz  $x$  und Defokus  $\Delta z$ . Die Auswirkung der VPP auf die CTF ist in Abbildung 11 dargestellt. Durch die höhere Signalübertragung bei niedrigen Raumfrequenzen können die Partikel trotz geringem Defokus sehr viel besser erkannt werden.

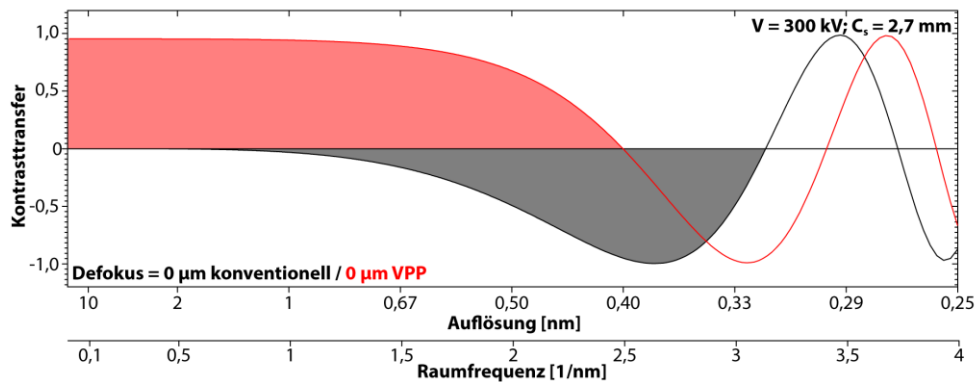


Abbildung 11: Vergleich der CTF ohne und mit VPP. 0 µm Defokus; 300 kV Beschleunigungsspannung; 2,7 mm sphärischer Aberrationskoeffizient. Der Vorteil der VPP (rot) gegenüber konventioneller Konfiguration (schwarz) ist, dass ohne Defokussieren bereits ein sehr guter Kontrasttransfer in den niedrigen Raumfrequenzen vorliegt. Somit zeigen die Proben einen starken Kontrast, ohne dass hierfür entsprechend stark defokussiert werden muss. Plots berechnet nach Gleichung (8) (Danev et al. 2017)

#### 1.1.4. Kontrastdetektion

Die Detektion im TEM erfolgte lange Zeit auf photographischen Film. Da dies jedoch sowohl zeit- als auch arbeitsintensiv war, wurden bereits in den 1980er Jahren digitale CCD-Sensoren zur Bildaufnahme in Elektronenmikroskopen verwendet (Mochel & Mochel 1986). Hierbei werden die Elektronen durch eine Szintillationsschicht in Photonen umgewandelt und diese mittels einer Faseroptik zum CCD-Sensor geleitet (Krivanek & Mooney 1993). Diese indirekte Detektion war jedoch der Qualität der Aufnahmen auf photographischen Film unterlegen (Abbildung 12). Die Leistungsfähigkeit von Detektoren für die Elektronenmikroskopie wird durch 2 Parameter beschrieben: die Detektorquanteneffizienz (DQE) und die Modulationstransferfunktion (MTF):

Die MTF beschreibt, wie stark die verschiedenen Raumfrequenzen im Bild aufgezeichnet werden und ist von der Pixelgröße und anderen Faktoren wie der Punktspreizfunktion der Elektronen in der aktiven Schicht des Detektors abhängig (Hecht 2017).

Die DQE beschreibt, in Abhängigkeit der Raumfrequenz, den Anteil des Rauschens, der durch die Signalumwandlung im Detektor hinzugefügt wird. Üblicherweise wird der Wert bei halber Nyquistfrequenz bestimmt (DQE(50)). Als Nyquistfrequenz bezeichnet man die höchste Frequenz, die mit der gegebenen Pixelgröße exakt rekonstruiert werden kann. Sie entspricht dem doppelten der Pixelgröße des Detektors (Kotel'nikov 2013). Die DQE ist als Quotient der Quadrate von Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) nach dem Detektor und vor dem Detektor definiert (Verschuur et al. 1976):

$$DQE(x) = \frac{SNR(x)_{out}^2}{SNR(x)_{in}^2} \quad (9)$$

Abbildung 12 zeigt die DQE der verschiedenen Detektoren in Abhängigkeit der Nyquistfrequenz. Bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV betrug die DQE(50) der verbreiteten CCD-Sensoren etwa 7-15 %, während photographischer Film bereits eine DQE(50) von 30-35 % bei 7 µm Pixelgröße erreichte und daher nahezu alle höher aufgelösten Strukturen lange Zeit auf Film aufgezeichnet wurden (McMullan et al. 2009).

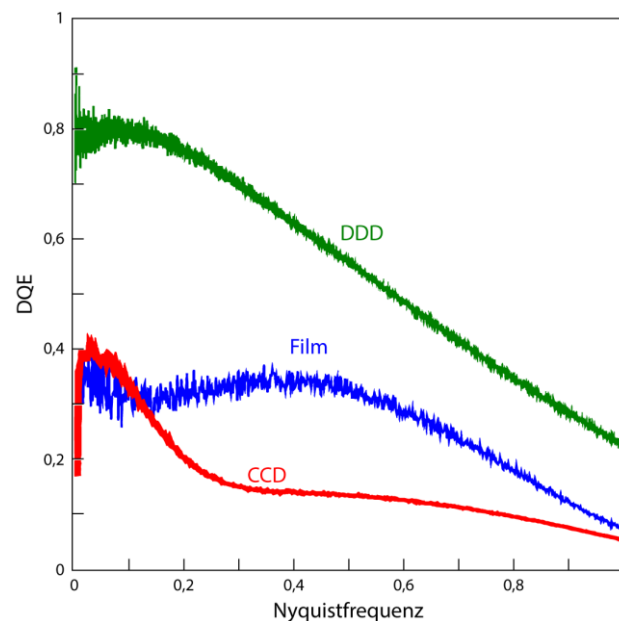


Abbildung 12: Vergleich der DQE von photographischem Film, CCD-Kamera und Direct-Detector. Während bei sehr kleiner Raumfrequenz Film (blau) und CCD-Kamera (rot) ähnlich gute DQE aufweisen, nimmt die Effizienz des CCD-Chips mit steigender Raumfrequenz schnell ab. Der DDD (grün) ist im gesamten Spektrum beiden anderen Detektoren überlegen. Die verwendeten Detektoren sind: Gatan K2-Summit (DDD - grün), Kodak SO-163 (Film - blau) und TVIPS 224 (CCD - rot) (McMullan et al. 2009, McMullan et al. 2014).

Mit der Entwicklung neuer Detektoren im Jahr 2012, welche statt der üblichen Umwandlung der Elektronen in Photonen, direkt Elektronen detektieren können (DDD; direct detection device oder DED direct electron detector) sowie fortschrittlicherer Fertigungstechniken konnte die DQE(50) auf über 60 % gesteigert werden (McMullan et al. 2014). Ein DDD vereint somit die Möglichkeit in kurzer Zeit eine große Zahl digitaler Aufnahmen mit einer bisher unerreicht hoher DQE zu erstellen. Zudem erfolgt das Auslesen der Chips von neuen Detektoren mit extrem hoher Geschwindigkeit, wodurch es möglich wurde Aufnahmeserien („movies“) statt Einzelaufnahmen zu erstellen (Milazzo et al. 2005). Während der Aufnahme wird durch den Energieeintrag eine Bewegung der Probe induziert, zudem können externe Einflüsse Vibrationen in der Probe verursachen. Die kurzen Filmsequenzen ermöglichen es nun, diese Bewegungen der Moleküle während der Aufnahme zu erfassen und anschließend mittels „motion correction“-Algorithmen zu korrigieren (Brilot et al. 2012). In Abbildung 13 ist der Effekt dieser Korrektur am Beispiel von Rotaviruspartikeln dargestellt.

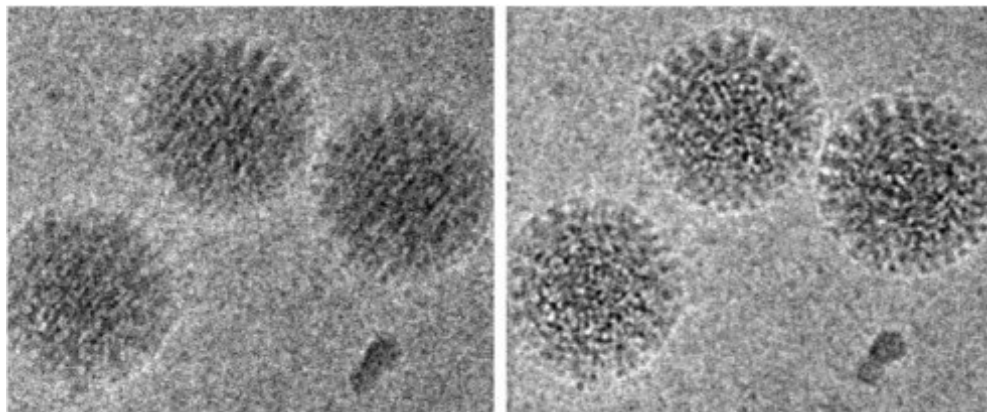


Abbildung 13: Gegenüberstellung der Aufnahmen von Rotaviruspartikeln mit und ohne „motion-correction“. Die Mittelungsbilder einer Aufnahmeserie von 60 Einzelbildern ohne Korrektur der Bewegungsunschärfe zeigt ein deutlich verschmiertes Bild (links) während durch „motion-correction“ der Kontrast und die Auflösung feiner Details verbessert werden konnte (Brilot et al. 2012).

Diese technischen Entwicklungen führten letztendlich zur sogenannten „resolution revolution“, durch die die Elektronenmikroskopie zur hochauflösenden strukturellen biologischen Methode wurde (Kühlbrandt 2014). Aufgrund der verhältnismäßig schlechten Qualität der elektronenmikroskopischen Rekonstruktionen wurden Strukturen für lange Zeit bevorzugt durch Röntgenkristallographie gelöst. Die Methode ist aber unter anderem dadurch limitiert, dass hierzu erst ein Kristall in ausreichend guter Qualität gezüchtet werden muss. Im Kristall liegt das Protein jedoch in nicht-nativen Zustand vor. Durch die beschriebenen Entwicklungen und neuen Rekonstruktionsalgorithmen in der Elektronenmikroskopie war es möglich, Strukturen zu erstellen, die der Qualität von röntgenkristallographischen Rekonstruktionen gleichkamen. Zudem eröffnet sich die Möglichkeit,

biologische Mechanismen zu untersuchen, da man nicht mehr nur eine Konformation in einem Kristall, sondern das gesamte konformationelle Ensemble des Proteins in nativer Umgebung zur Verfügung hat.

## 1.2. Bildverarbeitung in der Einzelpartikelanalyse

Für die Bildverarbeitung von elektronenmikroskopischen Daten existiert eine Vielzahl an verschiedenen Programmen wie z.B. SPIDER, IMAGIC, XMIPP, EMAN2, FREALIGN, Cryosparc2 und RELION (van Heel & Keegstra 1981, Sorzano et al. 2004, Tang et al. 2007, Shaikh et al. 2008, Scheres 2012b, Grigorieff 2016, Punjani et al. 2017). Mit RELION wurden seit seiner Entwicklung mehr hochauflösenden Strukturen gelöst als mit jedem anderen Programm in der Kryo-TEM, wodurch es einen entscheidenden Beitrag für die „resolution revolution“ geleistet hat (Kühlbrandt 2014). Die Berechnung erfolgt hierbei, im Gegensatz zur bislang verwendeten Kreuzkorrelation, mittels bedingter Wahrscheinlichkeiten (siehe Seite 16). Die bisher genutzten Algorithmen sind mit dieser Entwicklung jedoch keinesfalls obsolet geworden. Vor allem die multivariate statistische Analyse (MSA) erweist sich, aufgrund der Fähigkeit große Datenmengen auf die wesentlichen Varianzen zu reduzieren, als geeignetes Werkzeug für die Verarbeitung heterogener Daten (van Heel & Frank 1981).

### 1.2.1. 3D-Rekonstruktion

Um aus den experimentellen Bildern der TEM eine 3D-Rekonstruktion zu erhalten werden Algorithmen zur gefilterten Rückprojektion verwendet. Basierend auf der Radon-Transformation kann ein 2D-Bild aus seinen 1D-Projektionen bei bekannten Winkeln durch Rückprojektion rekonstruiert werden (Schofield et al. 2020). Die Qualität der Rekonstruktion hängt von der Anzahl der 1D-Projektionen, der Genauigkeit der Winkelbestimmung und der gleichmäßigen Verteilung der Projektionsrichtungen ab. Da hohe Frequenzen im Fourierraum niedriger gewichtet werden, müssen niedrige Frequenzen vor der Rückprojektion durch Anwendung eines Filters gedämpft werden (Abbildung 14). Durch Erweiterung der Radon-Transformation um eine Dimension ergibt sich die Grundlage der 3D-Rekonstruktion aus den experimentellen 2D-Dichteprojektionen im TEM (Crowther et al. 1970).



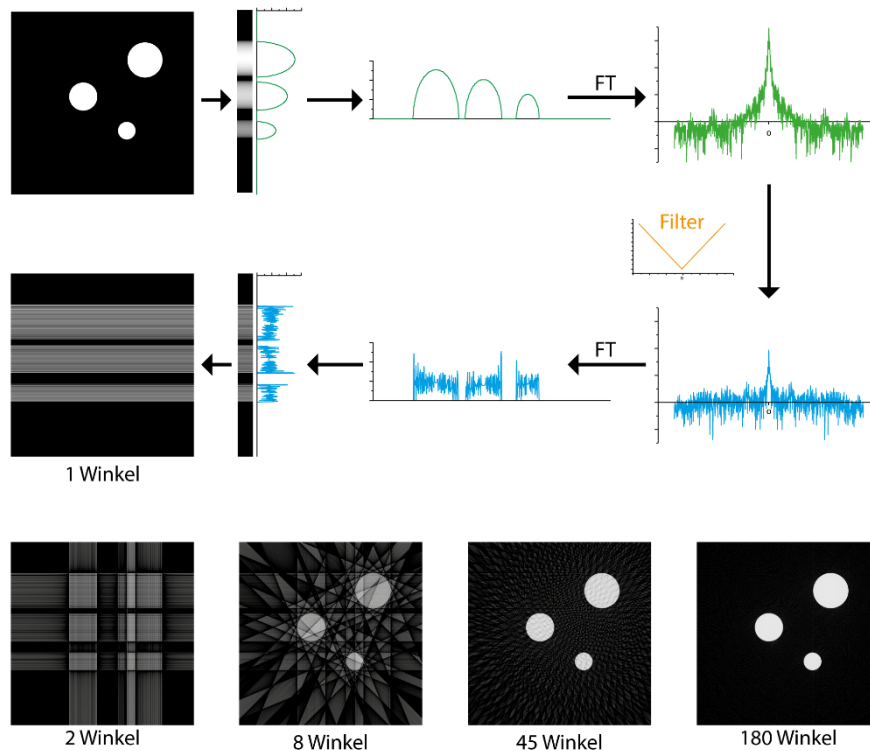


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Rekonstruktion eines 2D-Bildes mittels „filtered back-projection“. 1D-Projektionen des Ausgangsbildes (oben) werden nach Fouriertransformation (FT) mit einem Rampfilter (gelb) multipliziert, um die stärkere Gewichtung der Informationen nahe des Ursprungs zu kompensieren. Die Informationen werden anhand des ermittelten Winkels gleichmäßig in den 2D-Raum projiziert (mitte). Mit zunehmender Anzahl an bekannten Winkelansichten verbessert sich die Rekonstruktion (unten).

### 1.2.2. Datenreduktion durch multivariate statistische Analyse

Die MSA dient zusammen mit verschiedenen Klassifizierungsalgorithmen dazu, Datensätze anhand ihrer Varianzen in unterschiedliche Klassen einzuteilen. Zur Datenreduktion mittels MSA werden die Einzelpartikelbilder als Datenwolke in einem n-dimensionalen Koordinatensystem, in dem jede Dimension den Grauwert eines Pixels repräsentiert, dargestellt. In diese Datenwolke wird nun ein neues, orthogonales Koordinatensystem gelegt, dessen Ausrichtung entlang der größten Ausdehnung der Datenwolke erfolgt. Da zur hinreichend genauen Beschreibung des Datensatzes deutlich weniger Achsen nötig sind als ursprünglich durch die Anzahl der Pixel vorgegeben waren, können die weiteren Berechnungen um ein Vielfaches schneller erfolgen (van Heel & Frank 1981). Durch Klassifizierungsalgorithmen werden die Datenpunkte in Klassen zusammengefasst. Hierbei soll die Distanz zwischen Punkten einer Klasse minimal, und die Distanz zwischen den Klassen maximal sein. Die Klassifizierung und Mittelung gleicher Partikelansichten führt schließlich zu Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (van Heel 1984). Hierdurch wird eine anschließende Bestimmung der Orientierung der Klassen im Raum mittels „projection matching“ oder „angular reconstitution“ ermöglicht (van Heel 1987).

### 1.2.3. Anwendung des Satz von Bayes für die Strukturbestimmung

Mit Weiterentwicklung der Computertechnik konnten nicht nur immer größere Datensätze verarbeitet werden, sondern ebenfalls immer aufwändigere Berechnungen realisiert werden. Maßgeblich war hier insbesondere die Entwicklung des Programmpakets RELION (Scheres 2012b), das ein empirisches bayessches Netz zur Berechnung der wahrscheinlichsten Modellparameter verwendet. Viele der nötigen Parameter werden dabei aus den Daten selbst abgeleitet, statt auf durch den Benutzer vorgegebenen Parametern zu beruhen. Hierdurch wurde es möglich, mit geringerem „bias“ hochauflösende Strukturen zu rekonstruieren.

Nach dem Satz von Bayes (Bayes & Price 1763) für die Berechnung bedingter Wahrscheinlichkeiten kann die Posterior-Wahrscheinlichkeitsverteilung in einen Likelihood-Term und einen Prior-Term faktorisiert werden.

$$\text{Posterior-Wahrscheinlichkeit} \propto \text{Likelihood} * \text{Prior-Wahrscheinlichkeit} \quad (10)$$

Im Kontext der biomolekularen Elektronenmikroskopie gilt:

$$P(\theta|X, Y) \propto P(X|\theta, Y) * P(\theta|Y) \quad (11)$$

Der Posterior-Term beschreibt die Wahrscheinlichkeitsverteilung für den Parameter  $\theta$  das, in Abhängigkeit der Daten  $X$  und der Prior-Information  $Y$ , korrekte Modell zu ergeben. Der Likelihood-Term quantifiziert die Wahrscheinlichkeit, bei einem vorgegebenen Modell die gemessenen Daten zu erhalten. Der Prior-Term beschreibt die Wahrscheinlichkeit, das Modell zu erhalten, wenn die Prior-Information vorausgesetzt wird.

Nimmt man an, dass Proteine eine glatte, stetige Oberfläche im Realraum besitzen, dann hat dies zur Folge, dass die Koeffizienten für hohe Raumfrequenzen im Fourierraum kleinzahliger Natur sind und insbesondere hohe Frequenzen ein schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen. Da mehrere Modelle die verrauschten EM-Daten gleich gut beschreiben wird dieses Problem mathematisch als „ill-posed“ beschrieben,. In RELION nutzt der Prior nun die Annahme der glatten, stetigen Oberfläche, um somit die durch das Rauschen unvollständigen Informationen zu komplementieren (Scheres 2012a).

Der Likelihood-Term beinhaltet in diesem Fall auch Prior-Informationen, weshalb man bei dieser Methode von einer maximum-a-posteriori-Schätzung (MAP) spricht (Scheres 2012a). Ziel der 3D Strukturberechnung ist es, das beste Modell zu erhalten, das mit einem vorgegebenen Datensatz berechnet werden kann. Mathematisch erfolgt dies

durch die Optimierung von  $P(\theta|X, Y)$ , was durch einen „expectation-maximization“-Algorithmus erreicht werden kann (Dempster et al. 1977). Im „expectation“-Schritt wird die Posterior Wahrscheinlichkeit  $\Gamma_{ik\phi}$  iterativ für alle Orientierungen  $\phi$  und alle Klassen  $k$  in allen gemessenen Bildern  $i$  berechnet. Da die experimentellen Daten jedoch nicht das vollständige Spektrum der Orientierungen und Konformationen abdeckt, wird über diese beiden Parameter ( $\phi$  und  $k$ ) marginalisiert. Hieraus folgt für die Iterationen  $n$  (Scheres 2012b):

$$\Gamma_{ik\phi}^{(n)} = \frac{P(X_i|k, \phi, \theta^{(n)}, Y) * P(k, \phi|\theta^{(n)}, Y)}{\sum_{k'=1}^K \int_{\phi'} P(X_i|k', \phi', \theta^{(n)}, Y) * P(k', \phi'|\theta^{(n)}, Y) d\phi'} \quad (12)$$

Die berechnete Wahrscheinlichkeitsverteilung fungiert als Gewichtungsfaktor für den anschließenden „maximization“-Schritt. Durch Rückprojektion wird ein verbessertes Modell rekonstruiert und in der nächsten Iteration zur Berechnung besserer Wahrscheinlichkeiten verwendet (Abbildung 15). Da die gemessenen Bilder ein hohes Maß an Rauschen enthalten liegt der Vorteil der Marginalisierung darin, sich im Gegensatz zu Kreuzkorrelationsmethoden wie „projection matching“ nicht bereits zu Beginn der Optimierung auf eine Klassenzugehörigkeit und Orientierung festlegen zu müssen.

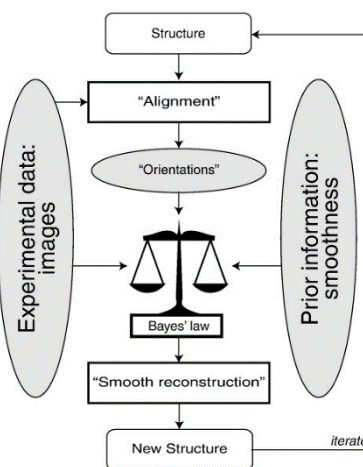


Abbildung 15: Flussdiagramm einer Rekonstruktion in RELION. Als Input dienen sowohl die elektronenmikroskopischen Bilder, die Annahme einer glatten Proteinoberfläche (Prior – „smoothness“) und eine Startstruktur. Mittels bedingter Wahrscheinlichkeit (Bayes' law) wird iterativ die Struktur verbessert, wobei verhältnismäßig wenige Parameter durch den Benutzer vorgegeben werden müssen (Scheres 2012a).

#### 1.2.4. Berechnung eines Startmodells

Die Berechnung von 3D-Rekonstruktionen ist aus mathematischer Sicht ein nichtkonvexes Optimierungsproblem, das naturgemäß anfällig für die Konvergenz in lokale Minima ist. Um dennoch eine korrekte Rekonstruktion zu erhalten, muss ein Startmodell, das hinreichend nah am globalen Minimum liegt, vorgegeben werden (Calafiore & El Ghaoui 2014). Diese Startmodelle können von homologen Strukturen stammen, mittels „random

conical tilt“ (Radermacher et al. 1987) oder durch Nutzung von „common lines“ (van Heel 1987) rekonstruiert werden. Zur Vermeidung von „reference bias“ werden die Startstrukturen, insbesondere für RELION, sehr stark gefiltert.

Durch die Nutzung des „stochastic gradient descent“-Algorithmus (SGD) für große Datenmengen (Bottou 2010), erstmals implementiert im Programm Cryosparc (Punjani et al. 2017), wurde ein weiteres Werkzeug zur Berechnung eines Startmodells bereitgestellt. Der SGD-Algorithmus verwendet statt des gesamten Datensatzes zufällige „mini-batches“, also kleine Datensätze aus zufällig ausgewählten Partikeln des Hauptdatensatzes. Dadurch ist die Berechnung unabhängig von der Initiierungsstelle und läuft nicht Gefahr in ein lokales Minimum zu konvergieren. Zudem benötigt der Algorithmus deutlich weniger Rechenleistung wodurch die Nutzung auch auf kleineren Workstations in angemessener Zeit möglich ist. Im Gegensatz zu anderen Methoden liegt der Vorteil des SGD darin ohne extern vorgegebene Parameter auszukommen und somit ein Startmodell ohne „bias“ zu erzeugen.

### 1.3. Kleine Hitzeschockproteine

Kleine Hitzeschockproteine (sHsp) wurden zuerst als Proteine beschrieben, die nach Hitzeschock gemeinsam mit anderen Hitzeschockproteinen (Hsp) hochreguliert werden (Tissières et al. 1974). Sie sind eine Familie ubiquitär vorkommender molekularer Chaperone, die Proteinaggregation von sich entfaltenden Proteinen durch ATP unabhängige Komplexierung verhindern und somit der Stressantwort der Zelle dienen (Haslbeck 2002, Narberhaus 2002, Haslbeck et al. 2005a). Während nicht alle Bakterien sHsps exprimieren, codieren die Genome der meisten Prokaryoten und Eukaryoten mehrere verschiedene sHsps angefangen von 2 bei *S. cerevisiae* bis zu über 19 bei *A. thaliana* (Kappé et al. 2002, Haslbeck et al. 2004, Siddique et al. 2008, Kriehuber et al. 2010).

#### 1.3.1. Aufbau

Die Molekulargewichte von sHsps rangieren typischerweise im Bereich von 12 bis 43 kDa (Jong et al. 1998, Haslbeck & Vierling 2015). Kleine Hitzeschockproteine haben eine konservierte, dreiteilige Domänenstruktur (Abbildung 16). Das Protein besteht aus einer, die Proteinfamilie definierenden,  $\alpha$ -Kristallindomäne (ACD) mit einer flankierenden C-terminalen Region (CTR) und einer N-terminalen Region (NTR) (Caspers et al. 1995, Kriehuber et al. 2010):

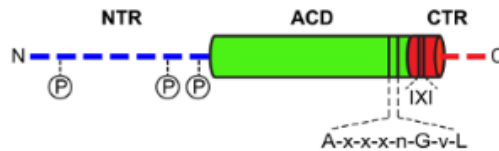


Abbildung 16: Schema des sHsp-Aufbaus. Die NTR weist in Säugtier-sHsps posttranslationale Phosphorylierungen auf. Gegen Ende der ACD befindet sich ein A-x-x-x-n-G-v-L Motiv. Die kurze CTR beinhaltet das konservierte I-X-I Motiv (Haslbeck et al. 2015)

Die ACD bildet eine Immunoglobulin-Faltung (kompaktes  $\beta$ -Sandwich mit zwei antiparallelen Schichten), aus drei beziehungsweise vier Strängen (Kim et al. 1998, van Montfort et al. 2001). Am Ende der ACD befindet sich ein A-x-x-x-n-G-v-L-Motiv, das als wichtigster Indikator der Domäne gilt. Die Aminosäuresequenz innerhalb der Domäne ist allgemein nur schlecht konserviert (Narberhaus 2002). Die Länge, mit im Mittel 94 Aminosäuren, und Sekundärstruktur der ACD ist hingegen bei allen sHsps konserviert (Kriehuber et al. 2010). Die ACD besitzt die Fähigkeit Dimere zu bilden. Zwei ACD-Monomere können sich auf einer von zwei möglichen Dimerisierungsarten verbinden und stellen somit den Grundbaustein für die Bildung höherer Oligomere dar (Bagn ris et al. 2009, Delbecq & Klevit 2013). In Pflanzen und niederen Organismen ist die „non-metazoan“ Dimerstruktur verbreitet, wobei die  $\beta 6$ -Stränge beider Monomere wechselseitig in das  $\beta$ -Faltblatt des anderen Monomers integriert werden (Kim et al. 1998, van Montfort et al. 2001, Bepperling et al. 2012). In höheren Organismen verschmelzen  $\beta 6$  und  $\beta 7$ -Strang zu einem verlängerten Strang und bilden das Dimerinterface durch antiparallele Bindung des benachbarten  $\beta 6+7$  Strang in der „metazoan“ Dimerstruktur (Abbildung 17) (Jehle et al. 2011, Delbecq & Klevit 2013). Die Bindung ist mit einer Dissoziationskonstante von nur wenigen Mikromolar relativ schwach und zeigt drei mögliche „register shifts“ (Laganowsky et al. 2010). Zudem kann die bei der Dimerisierung gebildete Furche kleine Moleküle und Polypeptide, wie z.B. das eigene I-x-I-Motiv der CTR binden (Bagn ris et al. 2009, Clark et al. 2011, Clark et al. 2018).

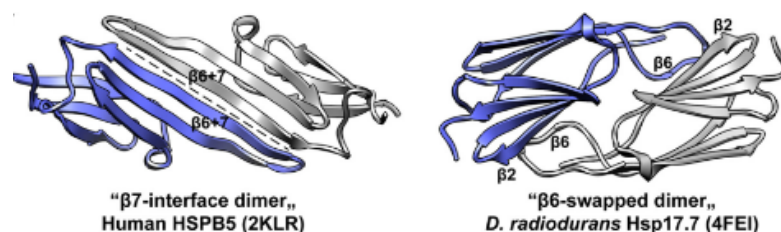


Abbildung 17: Vergleich der beiden Bindungsmodi der ACD. Links: „metazoan“-Variante mit kombiniertem  $\beta 6+7$  Strang. Die Furche zwischen beiden ACDs ist als gestrichelte Linie markiert. Rechts: „non-metazoan“-Variante mit wechselseitiger Bindung des  $\beta 6$ -Strangs (Haslbeck et al. 2019).

Die Länge der CTR variiert zwischen 10 und 20 Aminosäuren und hat eine variable Primärsequenz, die das hochkonservierte I-x-I Motiv beherbergt (Kriehuber et al. 2010, Delbecq et al. 2012). Die CTR besteht aus vorwiegend polaren Aminosäuren und zeigt zunehmende Flexibilität in Richtung des C-Terminus, wo sie mit der Flexibilität freier Peptide vergleichbar ist (Carver et al. 1992, Treweek et al. 2010). Das I-x-I-Motiv vermittelt die Fähigkeit eine hydrophobe Furche zwischen  $\beta 4$  und  $\beta 8$  eines benachbarten Monomers zu binden und trägt damit dazu bei, höherer Oligomere zu bilden (Delbecq et al. 2012). Dabei liegt die CTR nicht fest gebunden vor, sondern bildet ein dynamisches Gleichgewicht zwischen verschiedenen Zuständen. Die Verbindung zweier Monomere durch das I-x-I Motiv kann in einigen Fällen bidirektional erfolgen zudem sind auch intramonomerische Bindungen sowie teilweise oder gänzlich frei vorliegende I-x-I-Motive im dynamischen Gleichgewicht bekannt (Laganowsky et al. 2010, Baldwin et al. 2011).

Die NTR ist die am wenigsten konservierte Region der sHsps. Ihre Länge rangiert zwischen 24 Resten in Hsp12.2 aus *C. elegans* (Candido 2002) und 247 Aminosäuren in Hsp42 aus *S. cerevisiae* (Haslbeck et al. 2004). Es sind keine konservierten Sequenzmotive in der NTR bekannt, jedoch besitzen einige sHsps ein zusätzliches I-X-I-Motiv in der NTR (Stamler et al. 2005, Sluchanko et al. 2017). Die NTR ist stark lösungsmittelzugänglich, was auf eine hohe Dynamik im Gleichgewicht hindeutet (Wintrode et al. 2003). Aufgrund dieser Eigenschaften sind nur wenige strukturelle Informationen zur NTR vorhanden, jedoch deuten bisherige Ergebnisse darauf hin, dass die NTR ebenfalls wichtig für die Bildung höherer Oligomere (Delbecq & Klevit 2013), sowie an der Regulierung der Aktivität der sHsps und der Substratbindung beteiligt ist (Cheng et al. 2008). Die NTR beinhaltet eine hohe Anzahl hydrophober Aminosäuren (Kriehuber et al. 2010) sowie Serinreste, die in Säugetieren durch spezielle Kinasen in vivo phosphoryliert vorliegen (Ito et al. 1997, Arrigo & Gibert 2013). Rekonstruktionen der NTR zeigen bei Hsp16.0 aus *S. pombe* (Hanazono et al. 2013), Hsp14 aus *S. tokodaii* (Takeda et al. 2011), Hsp16.9 aus *T. aestivum* (van Montfort et al. 2001), humanem  $\alpha B$ -Kristallin (Jehle et al. 2011) sowie Hsp14.1 aus *S. solfataricus* (Liu et al. 2015) helikale Sekundärstrukturbereiche, die in verschiedenen Konformationen vorliegen können. In *S. solfataricus* konnte gezeigt werden, dass die helikalen Bereiche der NTR über eine Konformationsänderung die Aktivität des Chaperons modulieren (Abbildung 18). Hierbei geht die NTR eines Dimers eine Bindung mit der NTR eines benachbarten Dimers ein. Neben diesem NTR-NTR Kontakt konnten auch Interaktionen mit der ACD-Furche (Fleckenstein et al. 2015), der  $\beta 4/ \beta 8$  Bindetasche (Clark et al. 2018) sowie über ein N-terminales I-x-I-Motiv gezeigt werden (Stamler et al. 2005, Sluchanko et al. 2017).

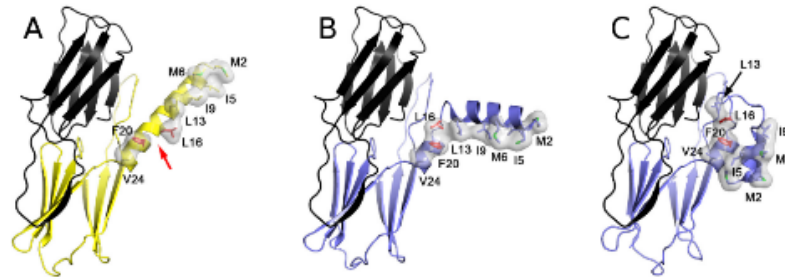


Abbildung 18: Die NTR von Hsp14.1 aus *S. solfataricus* reguliert über Konformationsänderung des helikalen Bereichs die Aktivität des sHsps. Dabei bewirkt die Konformationsänderung eine Umlagerung der hydrophoben Bereiche (transparent), die im inaktiven Zustand getrennt vorliegen (roter Pfeil) (Liu et al. 2015)

### 1.3.2. Quartärstruktur

Mit wenigen Ausnahmen besitzen sHsps die bemerkenswerte Fähigkeit, polydisperse Ensembles von stetig interkonvertierenden Oligomeren zu bilden (Spector et al. 1971, Braun et al. 2011). Dabei scheinen alle drei Domänen an diesem hochkomplexen hierarchischen Prozess beteiligt zu sein (Delbecq & Klevit 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass manchen sHsps die Fähigkeit zur Bildung von Heterooligomeren mit unterschiedlichen Stöchiometrien besitzen (Zantema et al. 1992, Bukach et al. 2009, Myrnikov et al. 2012, Arrigo 2013). Hierdurch wird der ohnehin schon große konformationelle Spielraum der sHsps enorm erweitert, da hierdurch die Möglichkeit geschaffen wird, nicht nur unterschiedliche Monomere mit variabler Anzahl in das Oligomer zu inkorporieren, sondern diese auch noch durch die zahlreichen, verschiedenen Bindungsmodi zu verbinden. Dies kann an einem HSPB2/HSPB3 Heterotetramer veranschaulicht werden (Clark et al. 2018). Hier sind drei HSPB2 Monomere mit einem HSPB3 Monomer verknüpft, wobei die CTR und die NTR die  $\beta 4/\beta 8$  Bindetasche sowie die ACD-Furche binden.

Das Paradigma der molekularen Strukturbiologie besagt, dass die Funktion von Proteinen und anderen Biomolekülen direkt mit ihrer dreidimensionalen Struktur verknüpft sein kann (Campbell 2002). Das Zusammenwirken der Vielzahl an sHsps mit den ATP-abhängigen Hitzeschockproteinen zur Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase stellt eine unverzichtbare Eigenschaft von Zellen dar, auf äußere Einflüsse zu reagieren (Lee et al. 1997, Veinger et al. 1998, Haslbeck & Vierling 2015, Mogk et al. 2018). Die dafür nötige funktionelle Flexibilität bei der Erkennung von Substraten lässt einen Rückschluss auf die strukturelle Flexibilität ziehen. sHsps sind hochdynamische Proteine, deren Funktion eng mit ihrer Flexibilität verknüpft ist. Bemerkenswert ist, dass die Dynamik der meisten Proteine sich auf die Seitenkettenkonformationen und Tertiärstruktur beschränkt, während sHsps zudem schnelle und komplexe Dynamik hinsichtlich ihrer Oligomerkomposition zeigen. Diese komplexe Dynamik der sHsps stellt eine besondere Hürde für biophysikalische und strukturbiologische Techniken dar.



### 1.3.3. Funktion

Als Teil der zellulären Stressantwort werden sich entfaltende Proteine von kleinen Hitzeschockproteinen in einem Zustand komplexiert, der eine Rückfaltung zum nativen Protein möglich macht (Ungelenk et al. 2016). Dabei können sHsps ihre Substratproteine nicht eigenständig zurückfalten, sondern sind hierzu auf die Hilfe der ATP-abhängigen Hsps angewiesen. Im Gegensatz zum sHsp-Substrat-Komplex können Aggregate, die in Abwesenheit von sHsps gebildet wurden, nicht mehr erfolgreich zurückgefaltet werden (Haslbeck et al. 2005b, Ungelenk et al. 2016). Somit erzeugen sHsps im Fall von Proteinstress einen Puffer von teilweise aggregierten Proteinen, die durch die nachfolgenden ATP-abhängigen Chaperone der Zelle wieder in den nativen Zustand gebracht werden können. Die Gestalt dieses Puffers wird neben den Eigenschaften des Substrats und äußeren Einflüssen wie pH und Temperatur vor allem durch die Stöchiometrie des sHsp/Substrat-Komplexes bestimmt: Sind sHsps im Überschuss vorhanden, so bilden sich lösliche Komplexe. Bei Substratüberschuss bilden sich große Aggregate aus Substratprotein, in denen oft auch sHsp inkorporiert vorliegen können (Lee et al. 1997, Haslbeck et al. 1999, Stromer et al. 2003). Die Rückfaltung der Proteine erfolgt dann für lösliche Komplexe durch das Hsp70/Hsp40 System (Ehrensperger et al. 1997, Veinger et al. 1998, Mogk et al. 2003b). Für die Rückfaltung aus unlöslichen Komplexen muss in Bakterien und Hefen zusätzlich Hsp100 rekrutiert werden (Mogk et al. 2003a, Cashikar et al. 2005, Haslbeck et al. 2005b, Ratajczak et al. 2009). Die in Anwesenheit von sHsps gebildeten Aggregate weisen eine veränderte Struktur auf, wodurch starke Interaktionen der entfalteten Proteinteile vermieden werden. Hierdurch wird die Interaktion mit ATP-abhängigen Hitzeschockproteinen zur Auflösung der Aggregate und Rückfaltung der Proteine begünstigt. Zudem werden hydrophobe Oberflächen in sHsp/Substrat-Komplexen vermieden und somit das Protein vom Abbau durch Proteasen geschützt.

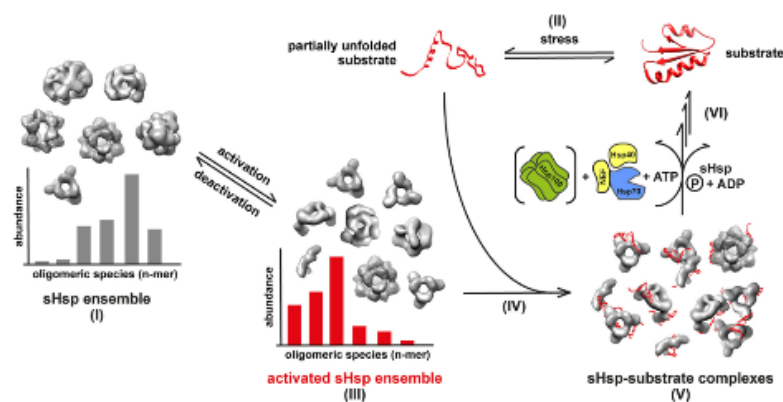


Abbildung 19: Schematische Übersicht der sHsp Funktion. (I): sHsps liegen im Cytosol als Ensemble unterschiedlicher Oligomergrößen vor. (II): Substratproteine werden durch Stress teilweise entfaltet. (III): Bei Aktivierung verändert sich die Zusammensetzung des Oligomerensembles. (IV): Teilweise entfaltete Proteine aus (II) werden durch aktive Chaperone komplexiert (V) und können in diesem Zustand von ATP-abhängigen Hsps unter Freisetzung der sHsps zurückgefaltet werden (VI) (Haslbeck et al. 2019).



#### 1.3.4. Substraterkennung

Die bemerkenswerte Eigenschaft eines sHsps, eine Vielzahl an verschiedenen zytosolischen Proteinen unter Stress vor vollständiger Aggregation zu schützen, deutet auf ein äußerst breites Erkennungsspektrum hinsichtlich der Substrate hin (Basha et al. 2004, Haslbeck et al. 2004, Fu et al. 2013, Fleckenstein et al. 2015, Mymrikov et al. 2017). Der Mechanismus der Erkennung von Proteinen, die sich im Entfaltungsprozess befinden, durch sHsps ist jedoch nicht geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass hydrophobe Wechselwirkungen sowie Ladungen hierfür relevant sind und mehrere mögliche Substratbindungsstellen in jedem sHsp existieren (Basha et al. 2012, Treweek et al. 2015). Vor allem die NTR scheint in dem Prozess eine wichtige Rolle zu spielen (Lentze & Narberhaus 2004, Basha et al. 2006, Jovcevski et al. 2018).

#### 1.3.5. Aktivierung

Die NTR nimmt sowohl für die Bildung höherer Oligomere als auch für die Erkennung der Substratproteine eine wichtige Rolle ein. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass eine Aktivierung der sHsps oftmals mit einer Verkleinerung der Oligomere einhergeht (Haslbeck et al. 2005a, McHaourab et al. 2009). Es liegt die Vermutung nahe, dass die Freilegung von Substratbindungsstellen durch Konformationsänderung und Änderung des Oligomerezustandes hervorgerufen wird. Welche Spezies (Monomer, Dimer, Tetramer) letztendlich für die Substratbindung verantwortlich ist, konnte bisher nicht belegt werden, allerdings wird angenommen, dass die größeren Oligomere eine Speicherform darstellen (Fleckenstein et al. 2015). Neben dem namensgebenden Hitzestress kann zudem eine spezifische Aktivierung durch pH-Änderung, posttranslationelle Modifikationen, die Anwesenheit von entfaltetem Substratprotein, der Bildung von Heterooligomeren oder durch Oxidation hervorgerufen werden:

- Erhöhte Temperaturen führen bei Hsp26 aus *S. cerevisiae* zur Bildung kleinerer Oligomere und erhöhter Chaperonaktivität (Haslbeck et al. 1999).
- Der Einfluss posttranslationaler Modifikationen kann am Beispiel von humanem  $\alpha$ B-Kristallin gezeigt werden. Durch die zusätzliche negative Ladung an den Phosphorylierungsstellen wird das Oligomer destabilisiert und in dessen Folge kleinere Oligomere gebildet (Aquilina et al. 2004, Peschek et al. 2013).
- Ein vergleichbarer Effekt ist durch Ladungsänderung einiger Aminosäuren infolge von pH-Wertänderung denkbar (Fleckenstein et al. 2015).

- Eine Aktivierung durch Heterooligomerformation konnte in *E. coli* und *H. sapiens* beobachtet werden. Dabei wird vermutet, dass je nach Stöchiometrie des Heterooligomers, eine sehr genaue Regulierung der Aktivierung möglich ist (Ratajczak et al. 2009, Mymrikov et al. 2012, Mymrikov et al. 2017).
- Durch die Anwesenheit denaturierender Substratproteine wird das Gleichgewicht der aktiven und inaktiven Form gestört, wodurch die Bildung aktiver Chaperone aus den Speicherformen verstärkt wird (McHaourab et al. 2009).
- In humanem  $\alpha$ A-Kristallin konnte außerdem gezeigt werden, dass neben der Polydispersität des reduzierten Chaperons auch eine physiologisch relevante oxidierte Spezies vorliegt. Diese zeigt eine vom reduzierten Protein unterschiedliche Quartärstruktur und ist im Vergleich zum reduzierten  $\alpha$ A-Kristallin einfacher zu entfalten. Es hat sich gezeigt, dass die oxidierte Variante ein aktives Chaperon darstellt und zudem die Fähigkeit besitzt, ihre Disulfidbrücke auf das Substrat zu übertragen (Kaiser et al. 2019).

#### **1.3.6. Rolle der sHsps in Krankheiten**

Neben Krankheiten, die durch direkte Mutation eines sHsps bedingt sind, werden sHsps mit verschiedenen Krankheiten wie Krebs, neurologische Erkrankungen, Myopathien und Multipler Sklerose in Verbindung gebracht (Sun & MacRae 2005, Arrigo & Gibert 2014, Bakthisaran et al. 2015, Mymrikov & Haslbeck 2015). Hierbei ist vor allem eine verstärkte Expression der sHsps zu beobachten, die vor proteotoxischen Schäden schützt (Kampinga & Garrido 2012, Bakthisaran et al. 2015) und somit beispielsweise auch Tumorzellen bei ihrem ungehemmten Wachstum unterstützen und gleichzeitig die Wirkung der Therapie behindern (Ciocca & Calderwood 2005, Kang et al. 2008, Arrigo & Gibert 2014). Auch eine verminderte sHsp-Expression begünstigt Erkrankungen wie z.B. Alzheimer (Ojha et al. 2011). In *C. elegans* konnte zudem eine Verknüpfung von sHsps mit dem Alterungsprozess nachgewiesen werden, da hier mit zunehmenden Alter eine erhöhte Proteinaggregation beobachtet werden kann (Hsu et al. 2003, Walther et al. 2015).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Elektronenmikroskopie

#### 2.1.1. Negativkontrastierung

Für die Negativkontrastierung wurden in dieser Arbeit Grids mit selbstpräpariertem Kohlefilm verwendet. Vor Verwendung wurden sie für 30 Sekunden in einer Sputteranlage bei 4 mA hydrophilisiert. 5 µL Proteinlösung wurde auf das Grid adsorbiert und 1-2 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit einem Stück Filterpapier abgeblottet und bei Verwendung phosphathaltiger Puffer zweimal mit jeweils 5 µL Wasser/HEPES-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Grid unverzüglich mit 5 µL Uranylacetatlösung (2 % w/v) benetzt. Nach weiteren 30 Sekunden Inkubationszeit wurde das Grid erneut abgeblottet und vor Betrachtung im TEM gründlich getrocknet.

#### 2.1.2. Kryo-Präparation

Die Präparation von kryofixierten Proben erfolgte auf Grids mit löchrigem Kohlefilm der Firma Quantifoil. Hierzu erfolgte das Adsorbieren, Blotten und Vitrifizieren roboterassistiert mit einem Vitrobot der Firma FEI bei kontrollierter Luftfeuchtigkeit (70-100 % RH) und Temperatur (4°C–37°C). Vor Verwendung wurden die Grids für 20-30 Sekunden in einem Plasmacleaner bei mittlerer/hocher Intensität hydrophilisiert. Nach Einspannen des Grids in den Vitrobot wurden 4-5 µL Proteinlösung auf das Grid adsorbiert und der Vorgang per Fußpedal gestartet. Adsorptionszeit, Blottingdauer und Blottingkraft wurden variiert um die Vitrifikation und Verteilung der Probe zu optimieren. Als Kryogen wurde Ethan bzw. ein eutektisches Gemisch aus Ethan und Propan verwendet.

#### 2.1.3. Aufnahme der Bilder

Das Screening der Proben erfolgte zunächst per Negativkontrastierung in einem JEOL JEM1400Plus mit einer Ruby Kamera und der Software TEM Center von JEOL. Zur Ermittlung idealer Präparationsbedingungen wurden die Proben per Kryo-Präparation in einem FEI Tecnai F20 mit Eagle Kamera erneut geprüft. Als Software wurde hierbei SerialEM im low dose Modus genutzt. Die Aufnahme der Daten erfolgte letztendlich vollautomatisch an einem FEI Titan Krios mit einer Direct Detector Kamera (Gatan K2, Gatan K3) und unterschiedlichen Softwareprogrammen (siehe Software).

## 2.2. Bildverarbeitung

### 2.2.1. Vorbereitung der Partikelstapel

Durch die hohe Anzahl der automatisch aufgenommenen Daten ist ein nachträgliches Kuratieren der Daten notwendig. Hierzu werden bereits während der Aufnahme Defokus und Astigmatismus der Aufnahme bestimmt und stark abweichende Daten von der weiteren Prozessierung ausgeschlossen. Zudem werden bei den folgenden Schritten Daten mit unzureichender Qualität identifiziert und ebenfalls ausgeschlossen.

### 2.2.2. Motion correction

Die Korrektur der Bewegungsunschärfe in den Daten erfolgte durch UCSF MotionCor2. Hierbei wurden Aufnahmen mit starker Drift aus dem Datensatz entfernt und die aufgenommenen Movies anhand der verwendeten Elektronendosis zu Mittelungsbildern summiert. Zur Korrektur der Bewegungsunschärfe wurden 9 mal 9 Patches genutzt. Die ersten Frames der Aufnahmeserie enthalten erfahrungsgemäß die stärksten Bewegungsartefakte und werden nicht mit in das Mittelungsbild einbezogen. Je mehr Frames aufgenommen werden, desto stärker werden Strahlenschäden in der Probe sichtbar, weshalb nur Frames bis zum Erreichen der akzeptablen Strahlungs-dosis aufsummiert werden. In dieser Arbeit wurden 30 bis 55 Elektronen als Dosis verwendet.

### 2.2.3. CTF-Korrektur

Für die korrekte Strukturanalyse benötigt man die Parameter der CTF, welche anhand der Summenbilder durch Fitting der Fourierspektren ermittelt werden können. Die Parameter (Defokus, Astigmatismus, maximale Auflösung) dienen zudem der Sortierung der Aufnahmen und der Selektion der Daten mit ausreichender Qualität für die weitere Verarbeitung.

### 2.2.4. Picking

Das Auswählen der Einzelpartikel erfolgte automatisch mittels verschiedener Pickingalgorithmen. Häufig muss hierzu ein initialer Datensatz manuell erstellt werden. Zudem werden der Pickingthreshold sowie die Abstandsgrenzwerte empirisch festgelegt.

### 2.2.5. Multivariate Statistische Analyse (MSA)

Durch MSA des Datensatzes wurden Eigenbilder erstellt, welche einen Rückschluss auf die in den Daten vorliegenden Symmetrien zulassen, sowie dazu dienen die Heterogenitäten in den Daten zu identifizieren. Diese Informationen können im weiteren Verlauf

dazu verwendet werden den Datensatz zu sortieren sowie die Rekonstruktionen zu verbessern. In dieser Arbeit wurde die MSA mit dem Programm Imagic durchgeführt. Dabei wurden typischerweise 20 bis 40 Eigenbilder berechnet und analysiert.

#### **2.2.6. 2D Klassifizierung**

Eine erste 2D-Klassifizierung dient in der Regel dazu, falsch gepickte Partikel (Luftblasen, Kontaminationen, Kohlefilmränder) zu entfernen. Folgende 2D-Klassifikationen sind dazu geeignet Strukturdetails darzustellen, Partikel die eine hohe Auflösung aufweisen zu identifizieren, sowie eine erste Analyse der Daten durchzuführen. Ergebnisse von 2D-Klassifizierungen können zudem dazu verwendet werden das Picking weiterer Daten zu verbessern. In dieser Arbeit wurde je nach Datensatzgröße und beabsichtigter Verwendung in 10 bis 200 Klassen eingeteilt.

#### **2.2.7. Startmodellberechnung**

Die Berechnung der Startmodelle erfolgte mittels SGD-Algorithmus-Implementationen der verschiedenen Softwarepakete. Je nach Datensatz konnten unterschiedlich gute Ergebnisse mit verschiedener Anzahl der erzeugten Modelle erzielt werden. Es wurden parallel verschiedene Berechnungen erstellt, wobei unterschiedliche, im Datensatz vorhandene Symmetrien angewendet wurden sowie eine bzw. drei Klassen berechnet wurden.

#### **2.2.8. 3D Klassifizierung**

Die Rekonstruktion der Proteine erfolgt mittels 3D-Klassifizierung. Durch Variation der Klassenanzahl können Heterogenitäten im Datensatz identifiziert und die Qualität der Rekonstruktionen verbessert werden. Initial wird nach Möglichkeit die bekannte Symmetrie vorgegeben um ein möglichst gutes Konsensusmodell zu erzeugen und die Strukturelle Redundanz in den Daten zu nutzen. In späteren Modellen kann die Symmetrie schrittweise reduziert werden um feine Unterschiede in den Modellen mitzuklassifizieren. Durch die Verwendung von Masken kann die Klassifizierung auf bestimmte Teile des Modells fokussiert werden. Symmetry-expanded Datensätze können insbesondere dazu genutzt werden eine vorhandene Heterogenität zu klassifizieren, da hierbei kein Kompromiss zwischen struktureller Redundanz und Mittelung verschiedener Konformationen gefunden werden muss.

#### **2.2.9. Symmetry expansion**

„Symmetry expansion“ erfolgt durch Vervielfältigung des Datensatzes und die Anpassung der Winkelinformationen je nach verwendeter Symmetrie. Hierzu werden die Im-

plementierungen der unterschiedlichen Softwarepakete genutzt. Für die weitere Verarbeitung darf dieser Datensatz nicht mehr symmetrisiert werden, und der Winkelbereich für die Alignierung muss limitiert werden.

#### **2.2.10. Signal subtraction**

Für die „signal subtraction“ werden verschiedene Masken benötigt, um die Regionen zu kennzeichnen, welche die Daten beinhalten die subtrahiert bzw. behalten werden sollen. Die Masken werden durch Binarisierung aus den Konsensmodellen erstellt. Nach der „signal subtraction“ wird erneut ein Konsensmodell berechnet um die erfolgreiche, vollständige Subtraktion zu überprüfen. Anschließend kann der Datensatz für Klassifizierungen und Alignierungen verwendet werden. Eine Limitierung des Winkelbereichs wie bei der „symmetry expansion“ entfällt hierbei.

#### **2.2.11. Local resolution**

Neben der globalen Auflösung der Rekonstruktion kann eine lokale Auflösung der einzelnen Voxel des Modells berechnet werden. Hierzu werden entsprechende Programme der Softwarepakete Relion oder Cryosparc verwendet. Die Daten werden anschließend genutzt um die EM-Dichterekonstruktionen entsprechend der lokalen Auflösung farblich zu markieren.

### **2.3. Modellierung**

#### **2.3.1. Konsensus Modellierung**

Die Modellierung von pseudoatomaren Modells erfolgte zunächst als Homologiemodellierung mit dem Programm I-TASSER. Fehlende Segmente wurden mit dem Programm MODELLER generiert.

#### **2.3.2. Rigid-body fitting**

Rigid-body fitting erfolgte durch das Programm UCSF Chimera mit der „Fit map“ Funktion. Hierzu wurde das Modell zunächst grob per Drag-and-Drop in die entsprechende Dichtekarte gelegt und anschließend durch das Programm zum besten Fit optimiert.

#### **2.3.3. Flexible fitting (MDFF)**

Flexibles fitting erfolgte mittels Molekulardynamik (MD) Simulation mit dem Programm NAMD2. Die Erzeugung der Konfigurationsdateien erfolgte mit VMD. Da durch die Verwendung der EM-Dichtekarte ein zusätzliches „forcefield“ zur Verfügung stand, wurde auf eine Berechnung in Lösungsmittel verzichtet und stattdessen in Vakuum gearbeitet. Um die Verbindungsbereiche bei symmetrischen Molekülen zu berücksichtigen, wurden

zudem teilweise „symmetry-restraints“ eingeführt, damit beim anschließenden Symmetrisieren des Modells keine Probleme auftreten. Zusätzlich wurden Sekundärstrukturen während der Simulation beibehalten ebenso wie cis/trans Konfigurationen und Chiralitätsinformationen. Variiert wurden bei verschiedenen Simulationen vornehmlich die Stärke des durch die Dichtekarte definierten „forcefields“ und die der Simulation zugrundeliegende Temperatur. Teilweise wurden Bereiche, die für den jeweiligen Stand der Simulation nicht von Bedeutung waren, von der Simulation ausgenommen. Zu Beginn und Ende der Simulation erfolgten stets Energieminimierungsschritte für etwa 2-5 Picosekunden. Die Berechnung der MD erfolgte in mehreren einzelnen Schritten für einige Nanosekunden. Statt die Simulation durch Verwendung verschiedener Startmodelle zu lenken wurde in dieser Arbeit die MDFF-Funktion von VMD für die Steuerung der Simulation während der Berechnung genutzt. Hierbei konnte durch manuelle Applikation von Kräften auf einzelne Bereiche der Struktur während der Simulation die Struktur aktiv in die gewünschte Konformation gelenkt werden ohne dabei die grundsätzliche Plausibilität der Bewegung zu vernachlässigen. Während der MDFF Simulation konnten, ebenso wie in nicht-interaktiven Simulationen, keine Bindungen getrennt oder gebildet werden. Zudem bricht die Simulation ab, falls eine zu hohe Geschwindigkeit der Atome verursacht wird. Nach jeder Interaktion mit der Struktur wurde die Berechnung zudem stets für mindestens mehrere hundert Picosekunden ohne externe Kräfte fortgeführt, um einen Gleichgewichtszustand zu erreichen.

## 2.4. Geräte

Name	Hersteller
TEM JEM 1400Plus	JEOL, Japan
TEM Tecnai F20	Thermo Fisher Scientific, USA
TEM Titan Krios	Thermo Fisher Scientific, USA
Kamera JEOL Ruby	JEOL, Japan
Kamera Eagle	Thermo Fisher Scientific, USA
Kamera Orion	Thermo Fisher Scientific, USA
Kamera K2 Summit	Gatan, USA
Kamera K3	Gatan, USA
Vitrobot Mark3	Thermo Fisher Scientific, USA
Vitrobot Mark4	Thermo Fisher Scientific, USA
Sputteranlage Bal-Tec SCD 005	Balzers, Liechtenstein
Plasma Cleaner PDC-32G-2	Harrick Plasma; USA

Kryo-Halter Gatan	Gatan, USA
Kryo-Halter Fischione	Fischione Instruments, USA
Laborwaage BL 1500 S	Sartorius, Deutschland
Laborwaage BL 120	Sartorius, Deutschland
Laborwaage SI-234	Denver Instruments,
pH-Meter pH 538	WTW, Deutschland
pH-Meter 766	Knick, Deutschland
Hochvakuum Pumpstation PST 170 E	Balzers, Liechtenstein
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad, USA
C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, USA
MJ Mini Personal Thermal Cycler	Bio-Rad, USA
Centrifuge 5418	Eppendorf, Deutschland
Centrifuge 5418 R	Eppendorf, Deutschland
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, USA
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, USA
Spectrophotometer Ultrospec 1100 pro	Amersham Biosciences, Großbritannien
Spectrophotometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences, Großbritannien

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Hersteller.

## 2.5. Software

<b>Name</b>	<b>Referenz</b>
SerialEM	(Mastrorade 2003, 2005)
UCSF MotionCor2	(Zheng et al. 2017)
CTFFIND4	(Rohou & Grigorieff 2015)
Gctf	(Zhang 2016)
CrYOLO	(Wagner et al. 2019)
Gautomatch	(Zhang 2017)
Imagic 5	(van Heel & Keegstra 1981)
EMAN2	(Tang et al. 2007)
RELION	(Scheres 2012b)
Cryosparc	(Punjani et al. 2017)
Scipion	(La Rosa-Trevín et al. 2016)
UCSF Chimera	(Pettersen et al. 2004)
VMD	(Humphrey et al. 1996)
NAMD2	(Phillips et al. 2020)
MDFF	(Trabuco et al. 2009)
Phenix	(Adams et al. 2010)
Coot	(Emsley et al. 2010)
I-TASSER	(Roy et al. 2010, Yang & Zhang 2015)
MODELLER	(Sali & Blundell 1993, Webb & Sali 2016)
NetWheels	(Mól et al. 2018)
Fiji	(Schindelin et al. 2012)
Adobe Illustrator	(Adobe Inc. 2012)



Origin	(OriginLab Corp. 2013)
Excel	(Microsoft Corp. 2018)
YASPIN	(Lin et al. 2005)
Jnet/Jhmm/Jpssm	(Cuff & Barton 2000, Cole et al. 2008)
PredictProtein	(Bernhofer et al. 2021)
PSSpred	(Yan et al. 2013)
Frag1D	(Zhou et al. 2010)
SPIDER2	(Yang et al. 2017)
CFSSP	(Ashok Kumar 2013)
APSSP2	(Raghava 2002)
NetSurf	(Petersen et al. 2009)
s2D	(Sormanni et al. 2015)
Quark	(Xu & Zhang 2012)

Tabelle 2: Verwendete Programme und dazugehörige Publikationen

## 2.6. Verbrauchsmaterial

Name	Quelle
Holey Carbon Grids R1/2	Quantifoil, Deutschland
Holey Carbon Grids R1.2/1.3	Quantifoil, Deutschland
Kupfer Grids, 200 mesh	Plano GmbH, Deutschland
Kohlefaden	Plano GmbH, Deutschland
Mica	Plano GmbH, Deutschland
Whatman #1 Filterpapier	Cytiva, USA
Xpress Micro Dialyzer MD300	Scienova, Deutschland

Tabelle 3: Genutztes Verbrauchsmaterial und Bezugsquelle

## 2.7. Pufferlösungen

Substanz	Konzentration
MES	10 mM
MOPS	10 mM
KCl	17 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
HCl	pH 6,3-8,2 einstellen

Tabelle 4: MES/MOPS-Puffer

Substanz	Konzentration
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
HCl	pH 7,4 einstellen

Tabelle 5: Phosphate buffered Saline (PBS):

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
HEPES	40 mM
NaOH	pH 7,4 einstellen

Tabelle 6: HEPES-Puffer

## 2.8. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma Aldrich (USA), Merck (Deutschland), Carl Roth (Deutschland) und Serva (Deutschland) bezogen.

## 2.9. Proteinlösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteinlösungen wurden durch Kooperationspartner des Lehrstuhls Biotechnologie der TU München (Prof. Dr. Buchner) bereitgestellt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Sip1

#### 3.1.1. Kenntnisstand

Ursprünglich als SEC-1 beschrieben (Linder et al. 1996), ist Sip1 eines der 16 sHsps, die in *C. elegans* codiert werden (Kriehuber et al. 2010). Das sHsp wird ausschließlich in Oozyten und Embryos exprimiert und ist dort essentiell für die Entwicklung der Nematoden (Linder et al. 1996, Candido 2002, Tabuse et al. 2005). Es besteht aus 159 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 17,8 kDa. Mit 10 Histidinen und einem berechneten isoelektrischen Punkt (pI) von 7,89 ist es beim physiologischen pH-Wert von 7,5 vorwiegend positiv geladen. Während der Morphogenese im Ei nimmt der Sip1-Gehalt der Zellen rapide ab, und nach dem Durchlaufen der Larvenstadien steigt es im adulten Wurm aufgrund der Expression in den Gonaden (Linder et al. 1996, Levin et al. 2012). Sip1 macht bis zu 2,1 % des gesamten Proteingehaltes im Ei aus und beträgt etwa 0,5 % der Proteingehaltes adulter Würmer, was sich mit der mittleren Eizahl adulter Würmer deckt (Schafer 2005, Fleckenstein et al. 2015).

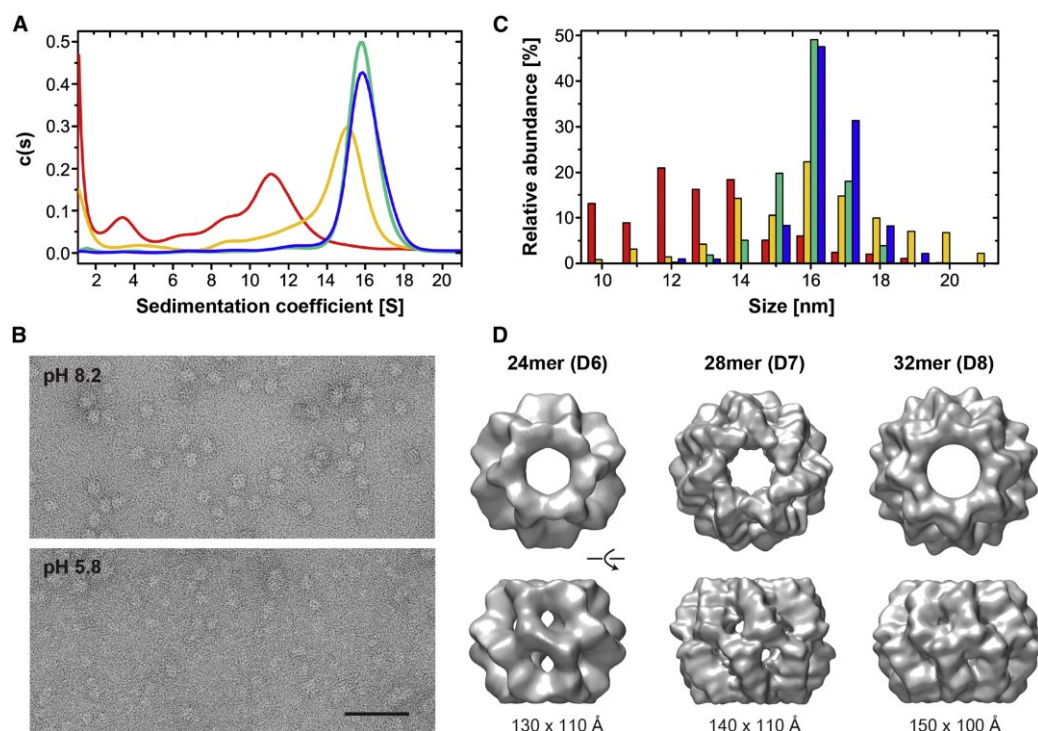


Abbildung 20: A: aUZ-Analyse von Sip1 bei verschiedenen pH-Werten (pH 5,8 rot, pH 6,3 gelb, pH 7,5 grün, pH 8,2 blau). B: „negative stain“ Aufnahmen von Sip1 bei pH 8,2 und pH 5,8. Scalebar: 50 nm. C: Größenanalyse aus „negative-stain“ TEM Untersuchungen (Farbschema wie in A) D: 3D-Rekonstruktionen des 24-, 28- und 32mers von Sip1. (Fleckenstein et al. 2015)

Von Sip1 ist bereits die Kristallstruktur der ACD sowie von Teilen der terminalen Domänen bekannt (Abbildung 21) und es wurden bereits erste elektronenmikroskopische Rekonstruktionen erstellt (Abbildung 20D) (Fleckenstein et al. 2015). In vorausgehenden Studien wurde gezeigt, dass Sip1 eine polydisperse, dynamische Quartärstruktur aufweist (Fleckenstein et al. 2015). Sip1 Oligomere repräsentieren eine Faszstruktur mit D7 (28mer) oder D8 (32mer) Symmetrie. Die Fasddaunen entsprechen hierbei einem S-förmigen Sip1-Tetramer, aufgebaut aus 2 identischen Sip1-Dimeren. Im Dimer unterscheidet man zwischen apikalem und äquatorialem Monomer, je nach dessen Lage im Tetramer.

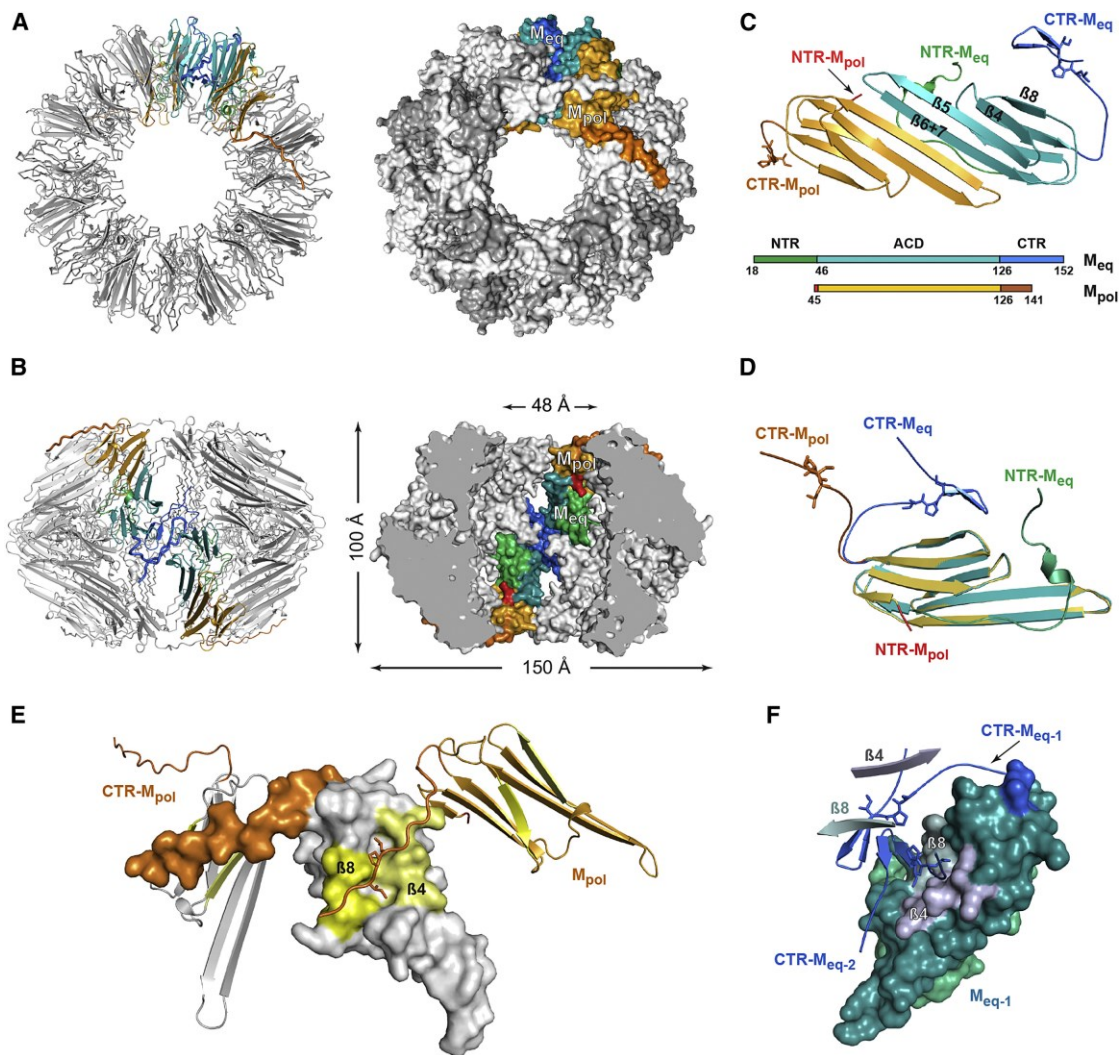


Abbildung 21: Top- (A) und side-view (B) eines Sip1 32mers (4ydz) als Cartoon (links) und *surface*-Darstellung. Eine Speiche ist farblich markiert. Farbgebung entsprechend (C). (C) zeigt das Dimer als Cartoon mit der Farbgebung entsprechend der angegebenen Aminosäurereste. Das I-x-I-Motiv ist als Stickmodell dargestellt Die Überlagerung von apikalen und äquatorialen Monomeren (D) zeigt die hohe Übereinstimmung der ACD sowie die unterschiedliche Orientierung der CTR. Die Interaktion zwischen benachbarten Tetrameren durch die polaren CTRs wird in (E) dargestellt, während die Interaktion der äquatorialen CTRs in (F) gezeigt wird. (Fleckenstein et al. 2015)

Die Dimerisierung der Monomere erfolgt durch die  $\beta 6$  und  $\beta 7$  Stränge der beteiligten ACDs über die „metazoan“-Dimerisierungsvariante. In der Kristallstruktur (4ydz) erfolgt die Interaktion zwischen den Dimeren im Tetramer durch die CTR der äquatorialen Monomere (Abbildung 21F). Die Interaktion zwischen benachbarten Tetrameren wird durch die CTR der polaren Monomere vermittelt, indem das I-x-I-Motiv an einer hydrophoben Region der ACD zwischen  $\beta 4$ - und  $\beta 8$ -Strang bindet (Abbildung 21E).

Im Gegensatz zu den vier nah verwandten Hsp16-Proteinen ist Sip1 nicht durch Hitze-stress induzierbar (Fleckenstein et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass bei Sip1 sowohl die Oligomerverteilung als auch die Chaperonaktivität vom pH-Wert abhängen (Abbildung 20) (Fleckenstein et al. 2015). Bei einem pH-Wert von 8,2 wird nahezu keine Aktivität im Citratsynthase (CS) Chaperon Aktivitätsassay gemessen, während bei einem pH-Wert von 6,3 die Aktivität stark erhöht ist. Im Zusammenhang mit der These, dass die Oligomergröße auf die Aktivität schließen lässt (Haslbeck et al. 2005a, McHaourab et al. 2009), können entsprechend die großen Speicherformen von Sip1 (32mer) bei pH 8,2 beobachtet werden, während bei pH 6,3 zunehmend kleine Spezies (28mer) beobachtet werden können. Je nach pH-Wert zeigt Sip1 eine unterschiedlich stark ausgeprägte Oligomerheterogenität. Bei niedrigem pH-Wert zeigt sich eine breitere Verteilung hinsichtlich der Oligomergröße. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es außerordentlich schwer, hochaufgelöste Rekonstruktionen bei niedrigem pH-Wert zu erstellen.

*In vivo* treten saure pH-Werte während der Embryonalentwicklung von *C. elegans* auf (Oka & Futai 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass Sip1 eine große Anzahl an Substrate binden kann und nicht auf eine bestimmte Proteinkategorie beschränkt ist. Neben der starken Bindung zu Proteinen, die speziell in Embryos exprimiert werden und für deren Entwicklung wichtig sind, konnte zudem eine Relevanz für die Lebensdauer von *C. elegans* nachgewiesen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Sip1-Gehalt in langlebigen *daf-2* Mutanten erhöht ist (Walther et al. 2015), während RNAi knock-down von Sip1 eine Verringerung der Lebensdauer der Würmer um etwa 25% sowohl beim Wildtyp, als auch bei *daf-2* Mutanten verursachte. (Hsu et al. 2003)

### **3.1.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung von Sip1 Größenanalyse und multivariate statistische Analyse**

Eine initiale Bestimmung der Größenverteilung des Sip1 wt mittels negative stain TEM bestätigt das typische Muster für sHsps: Bei Aktivierung verschiebt sich das Oligomergleichgewicht in Richtung der kleineren Oligomerspezies. Um Kontrastierungseffekte zu vermeiden, wurde eine Größenbestimmung aus Kryo-TEM Daten durchgeführt. Hierbei

zeigt sich, dass gegenüber den Daten aus NS-TEM die gemessenen Partikeldurchmesser kleiner sind. Dies kann einerseits durch Abflachungsartefakte während des Kontrastierens zurückzuführen sein, andererseits auch auf einem systematischen Fehler beim Messen des Durchmessers basieren. Die Messung erfolgte an Klassenmittelbildern, die anhand der Eigenbilder der Größenvarianz gebildet wurden. Hierbei kann bei der Vermessung der kontrastierten Bilder ein Teil des Kontrastmittelrandes mitgemessen werden, was zu systematisch größeren Durchmessern führt. Für die Größenanalyse wurden daher die Kryo-TEM Aufnahmen bevorzugt, da hier keine Abflachungsartefakte und Stain-Ränder die Messung stören. Aufgrund der höheren Partikelzahl ergibt sich zudem eine klarere Abgrenzung der Histogramme der beiden untersuchten pH-Werte.

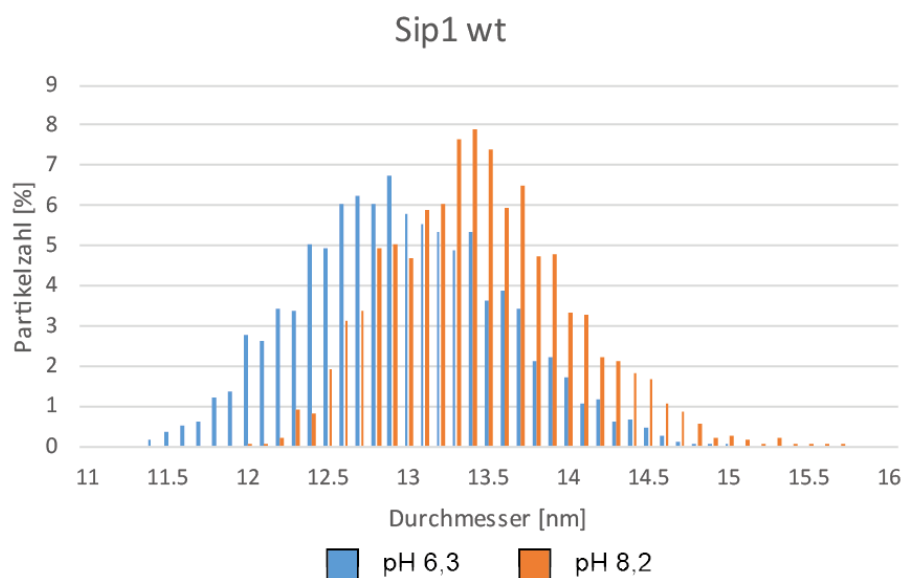


Abbildung 22: Größenverteilung von Sip1 mittels Kryo-TEM. Für pH 6,3 wurden 75 602 Partikel und für pH 8,2 70 101 Partikel vermessen. Der Partikeldurchmesser wurde jeweils auf 1 Å gerundet und als Histogramm dargestellt.

Die Partikeldurchmesser wiesen bei beiden pH Werten große Schwankungen auf. Der Peak der Größenverteilung liegt für pH 6,3 bei 12,9 Å und für pH 8,2 bei 13,4 Å. Sip1 ist somit bei pH 8,2 etwa 5 Å größer als bei pH 6,3 (Abbildung 22). Durch multivariate statistische Analyse des Datensatzes bei pH 8,2 mit 24 745 Partikeln konnten anhand der Eigenbilder erste Charakteristika des Datensatzes ermittelt werden (Abbildung 23). So zeigen die ersten beiden Eigenbilder deutlich die in der Größenanalyse beobachtete Größenvarianz. Die Eigenbilder 3 und 4 belegen das Vorliegen von Dihedralsymmetrie. Zudem können weitere, höhere Symmetrien wie 6-fach (Eigenbild 10) 7-fach (Eigenbild 16) sowie 8-fach (Eigenbild 21) beobachtet werden. Das Vorliegen von verschiedenen Symmetrien und Oligomergrößen machen eine Sortierung der Daten vor der weiteren Analyse notwendig.

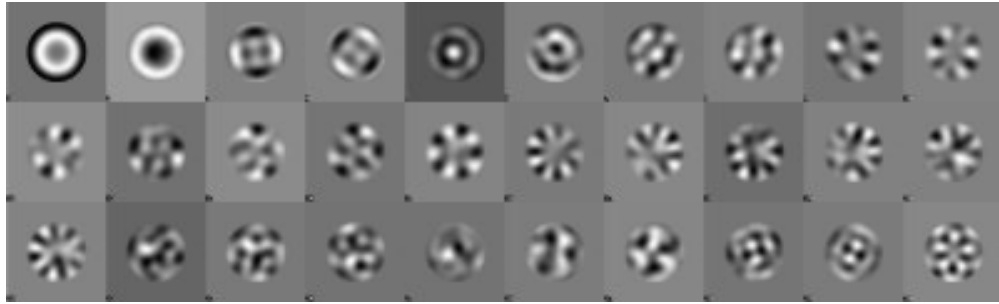


Abbildung 23: Eigenbilder eines Sip1 Datensatzes bei pH 8,2 (24 745 Partikel) vor der Sortierung nach Symmetrieeigenschaften. Deutlich zu erkennen sind die Größenvarianz, 6-fach, 7-fach und 8-fach Symmetrie, sowie das Vorliegen von Dihedralsymmetrie.

### 3.1.3. Sortierung der Datensätze anhand der „sideview“ Symmetrie

Die Analyse heterogener Daten stellt eine der größten Hürden für die biomolekulare Elektronenmikroskopie dar. Das schlechte Signal-zu-Rausch Verhältnis macht eine eindeutige Zuordnung der Partikelorientierung schwer, eine hinzukommende kompositionelle Heterogenität erschwert diese Aufgabe erheblich. Da die kompositionelle Heterogenität bei sHsps aufgrund der stetigen Interkonversion nicht vor der Datenaquisition beseitigt werden kann, liegt eine besondere Schwierigkeit der Analyse in der zuverlässigen Trennung der verschiedenen Konformationen während der Bildverarbeitung.

Sip1 ermöglicht es mit seiner fassähnlichen Quartärstruktur, „topviews“ aufgrund ihrer eindeutig sichtbaren Symmetrie mittels MSA zuverlässig zu trennen. Bei „sideviews“ und schrägen Projektionen ist die jeweilige Oligomierzugehörigkeit nicht einfach feststellbar. Aufgrund ihrer Flexibilität und sehr ähnlichen Größe führt die Einteilung nach ihrem Oligomerdurchmesser nicht zu einer zuverlässigen Trennung der unterschiedlichen Oligomere. Stattdessen hat es sich als praktikabel erwiesen, referenzfreie 2D-Klassen zu erstellen und die Achsensymmetrie der Klassenmittelbilder auszuwerten (Abbildung 24).

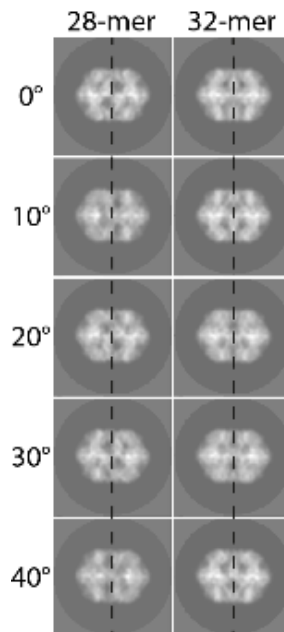


Abbildung 24: Sideview-Projektionen von Sip1 28mer und 32mer aus TEM-Rekonstruktionen. Jede Zeile stellt eine Rotation um die höchste Symmetrieachse in  $10^\circ$  Inkrementen dar. Die gestrichelte Linie repräsentiert die z-Achse durch die Mitte des Bildes. Hierbei zeigt sich, dass nur das 32mer für jeden Rotationswinkel zu dieser Linie achsensymmetrisch ist, während das 28mer für keinen Rotationswinkel achsensymmetrisch ist.

Aufgrund der Oligomergeometrie können „sideview“-Klassen bei ausreichend guter Auflösung zweifelsfrei anhand der Achsensymmetrie entlang der z-Achse in 7- und 8-fach Symmetrie getrennt werden. Die 2D-Projektion eines 32mers muss achsensymmetrisch zu einer vertikal verlaufenden Achse sein. Da die Händigkeit durch die Projektion verloren geht, spielt hierbei die Chiralität des Oligomers keine Rolle. Eine geradzahlige Symmetrie erzeugt stets achsensymmetrische Projektionen für die Seitenansichten. Die 2D-Projektion eines 28mers kann aufgrund seiner ungeradzahligen Symmetrie hingegen nicht achsensymmetrisch gegenüber der z-Achse sein und erzeugt somit asymmetrische Klassenmittelbilder. Anhand dieser Informationen wurde der Datensatz in geradzahlige und ungeradzahlige Symmetrie getrennt, wodurch eine separate Analyse der verschiedenen Oligomere ermöglicht wurde.

In der Literatur werden das 24mer, 28mer und 32mer als Bestandteile des polydispersen Ensembles von Sip1 beschrieben (Fleckenstein et al. 2015). Bei Aktivierung durch Verringerung des pH-Wertes werden zunehmend kleine Spezies gebildet. Die Analyse der Aufnahmen einer Probe mit pH 6,3 zeigt eine Verschiebung des Oligomergleichgewichts von 32mer zu 28mer, wie auch in der Literatur angegeben (Fleckenstein et al. 2015). Die Eigenbilder des gesamten Datensatzes zeigen Eigenbilder mit 6fach, 7fach und 8fach Symmetrie. Nach Abtrennung der „sideviews“ in einen separaten Datensatz, konnte durch Klassifizierung der „topviews“ keine D6 symmetrische Klasse mehr nachgewiesen werden (Abbildung 25).



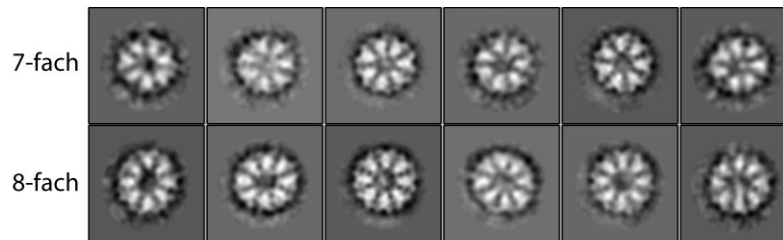


Abbildung 25: Klassifizierung der „topviews“ in Relion nach Abtrennung der „sideviews“. 7- und 8-fach Symmetrie konnte klassifiziert werden, jedoch sind keine 6-fach symmetrischen Klassen mehr vorhanden.

### 3.1.4. Symmetrische Rekonstruktion des Sip1 28mers

Zur weiteren Analyse von Sip1, wurde ein Kryo-TEM Datensatz aufgenommen. 6 988 Negative wurden mit einem Titan Krios Mikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV mit einer Gatan K2 Summit direct-detector Kamera, Volta-Phasenplatte und Gatan GIF Quantum Energiefilter bei 105 000-facher Vergrößerung mit einer Pixelgröße von 1,35 Å aufgezeichnet. Nach Alignierung, Normalisierung und Summierung der movies mit dem Programm UCSF Motioncorr (39 e-/Å<sup>2</sup>, 9x9 Patches, „dose-weighting“ with 1.0 e-/Å<sup>2</sup>/frame) wurden 4 449 Negative für die weitere Analyse ausgewählt. Parameter für die Selektion waren Thonringe mit einer Auflösung über 4 Å, eine Phasenverschiebung zwischen 0,2 und 0,8, Astigmatismus kleiner als 650 nm, ein maximalen Defokus von 3 000 nm sowie visuelle Inspektion in Real- und Fourierraum. Die CTF wurde an „non-doseweighted“ Negativen mit dem Programm Gctf (sphärische Abberation 2,7 mm, min. Auflösung 15 Å, max. Auflösung 3 Å, min. Defocus 300 nm, min. Phasenverschiebung 0°, max. Phasenverschiebung 180°, Phasenverschiebungsschrittweite 10°, Pixelgröße 1.35 Å) bestimmt. Die Auswahl der Einzelpartikel erfolgte automatisch mit dem Programm Gautomatch und ergab einen Datensatz mit 1 415 569 Partikeln.

Um dem Problem der konformationellen Heterogenität in der Probe zu begegnen, wurde eine zweistufige Sortierung durch 2D- und 3D-Klassifizierung in Relion vorgenommen. Es zeigte sich, dass die vorherrschende Population bei den untersuchten Präparationsbedingungen das D7-symmetrische 28mer ist. Daher wurde sich für die weiteren Analysen auf das 28mer konzentriert. Hierzu wurden Klassen, mit geringer Auflösung sowie Klassen mit 8-fach Symmetrie von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die Startmodelle wurden mittels SGD-Algorithmus in Cryosparc2 mit D7 und C1 Symmetrieeerstellt. Abbildung 26 zeigt, dass in der C1 Struktur bereits die zu erwartende 7-fach Symmetrie auftrat, was auf eine gute Sortierung der Daten im vorhergehenden

Schritt schließen lässt. Für das weitere Refinement wurde das Startmodell mit D7 Symmetrie verwendet, da die Symmetrie durch die C1 Rekonstruktion verifiziert werden konnte. Ein anschließendes Refinement mit D7 Symmetrie führte zu einer Struktur mit einer Auflösung von 6,5 Å. Diese Rekonstruktion weist eine hohe Übereinstimmung mit veröffentlichten Sip1 28mer Rekonstruktionen auf (Fleckenstein et al. 2015). Zur Vermeidung eines „reference bias“ wurden aber bereits vorhandene Rekonstruktionen nicht verwendet. Für das weitere Refinement wurde der Datensatz „symmetry expanded“ (siehe Seite 27) um die strukturelle Redundanz zu nutzen. Ein symmetrisches Refinement, bei dem die Winkelanpassung der Partikelorientierung auf maximal 10° beschränkt wurde, erzielte eine Rekonstruktion mit einer Auflösung von 5,2 Å.

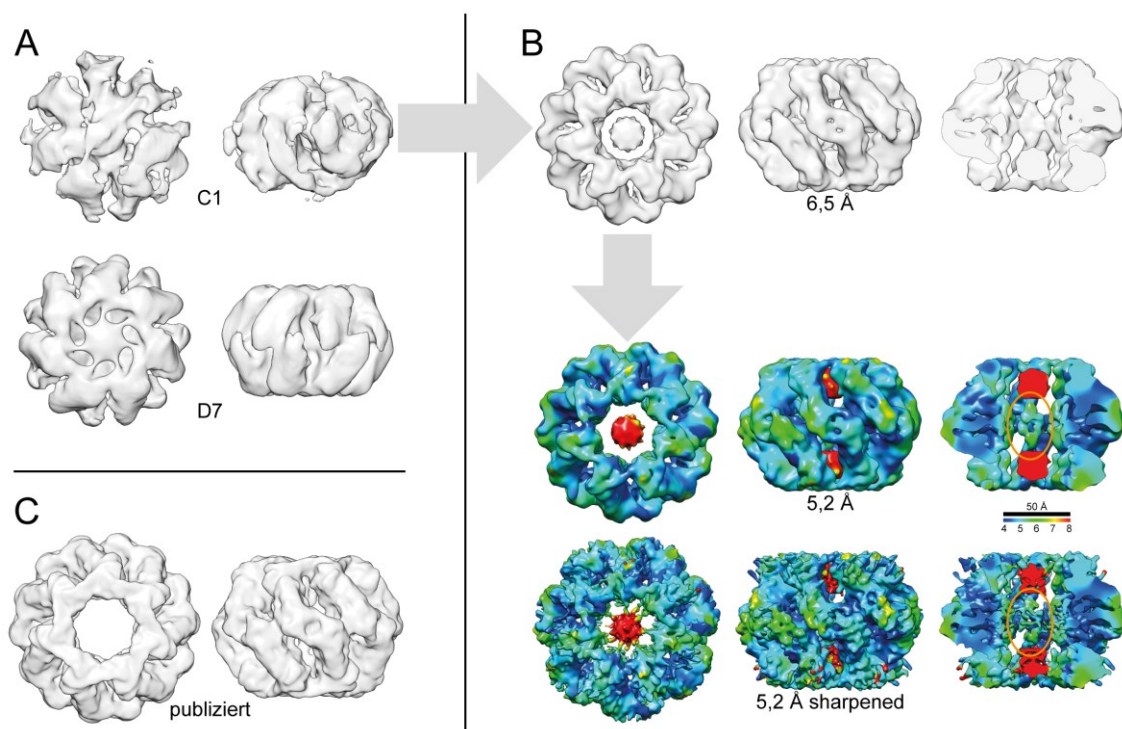


Abbildung 26: Verlauf der Sip1 Rekonstruktion. A: Ab-initio Rekonstruktionen mit C1 und D7 Symmetrie. B: Rekonstruktionen mit D7 Symmetrie (oben) und lokales Refinement des „symmetry-expanded“ Datensatzes auf 5,2 Å gefiltert (mitte) und nach „B-Factor sharpening“ (unten). Die finale Struktur ist als „local-resolution map“ dargestellt. Im inneren der Rekonstruktion konnte eine in der Kristallstruktur nicht aufgelöste Dichte rekonstruiert werden (orange) C: Publizierte Struktur des Sip1 28mers. Scalebar: 50 Å.

Die Rekonstruktion zeigte eine in der Kristallstruktur nicht beschriebene Dichte auf der Innenseite des Oligomers an der äquatorialen Verbindung innerhalb einer Speiche (Abbildung 26, orange markiert). Unterhalb dieser Dichte liegen die in der Kristallstruktur aufgelösten NTR der äquatorialen Monomere. Die beobachtete Dichte zeigt demnach wahrscheinlich einen Teil des weiteren Verlaufs der NTR, der nicht kristallisiert werden konnte.

Die weitere Rekonstruktion dieser Struktur erwies sich als außerordentlich schwer. Insbesondere die Anwendung von Symmetrioperationen resultierte in einer unidentifizierbaren Masse im Zentrum des Moleküls und führte zu Überschneidungen von Merkmalen nahe der Symmetrieachse. Die Nutzung von fokussierter Klassifizierung und „signal subtraction“ (siehe Seite 28) erwies sich ebenso als schwierig, da keine eindeutige Zuordnung der Kerndichte zu den jeweiligen Dimeren möglich ist und das Verhältnis von fokussiertem Bereich und Rest des Moleküls in starkem Ungleichgewicht steht. Aus diesem Grund wurde eine asymmetrische Rekonstruktion nach „symmetry expansion“ zur Strukturaufklärung in diesem Bereich angestrebt.

### **3.1.5. Asymmetrische Rekonstruktion zeigt Unregelmäßigkeiten in der Oligomerstruktur**

Da das Sip1 28mer signifikante konformationelle Heterogenität innerhalb des Oligomers zeigt, wurde „symmetry expansion“ mit D7 Symmetrie auf den Datensatz angewandt, um die strukturelle Redundanz des Moleküls zu nutzen. Im Vergleich zur konventionellen Symmetrisierung entfällt der Nachteil, dass das Modell Mittelungen verschiedener Speichenkonformationen an allen Speichenpositionen enthält. Die Klassifizierung dieses erweiterten Datensatzes ohne extensives Alignieren eröffnet somit die Möglichkeit, verschiedene Speichenkonformationen höher aufzulösen. Da apikale und äquatoriale Monomere von Sip1 keine identische Konformation besitzen, wurde das Dimer als asymmetrische Einheit gewählt. Der erweiterte Datensatz enthält die Strukturinformation aller Dimere an jeder Dimerposition, sodass nun eine Klassifizierung der Dimerkonformationen möglich wird, selbst wenn sie Teil desselben Oligomers sind. Eine asymmetrische Klassifizierung in 50 Klassen eröffnete einen ersten Einblick in das konformationelle Ensemble von Sip1.

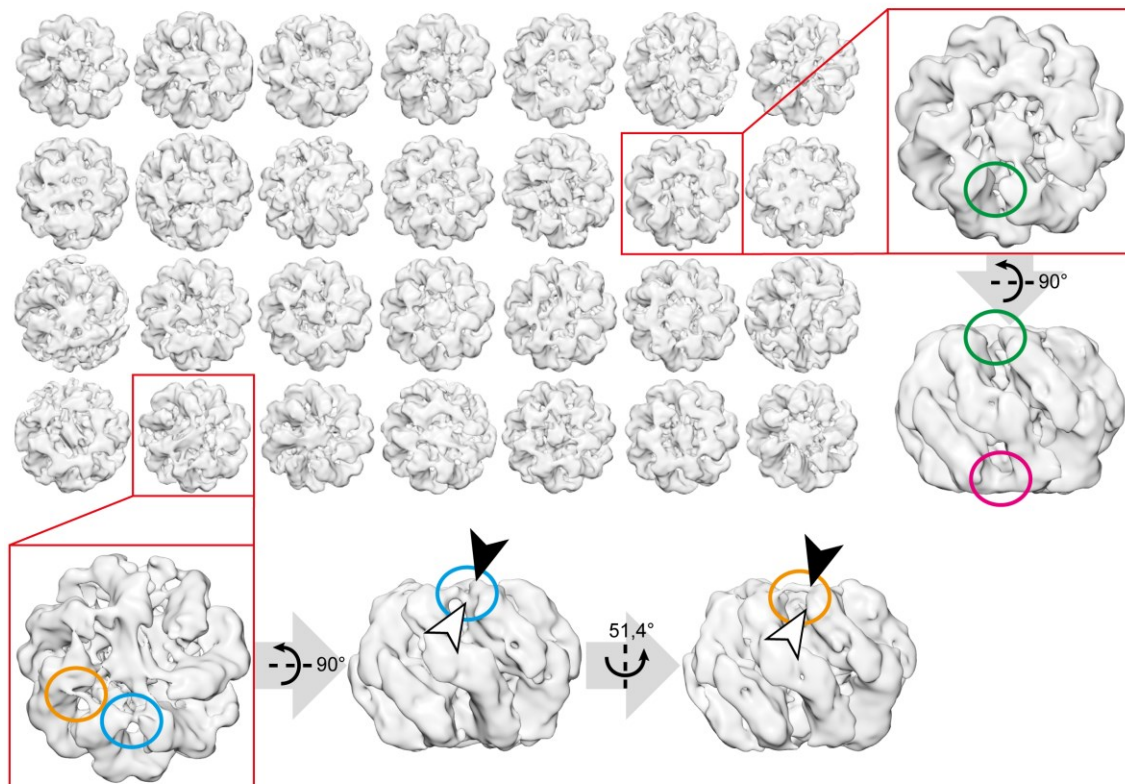


Abbildung 27: Galerie von 28 Klassen mit asymmetrischer Rekonstruktion. Rechts: Klasse mit fehlender (grün) und vorhandener (magenta) Verbindung der Speichen eines Sip1 Oligomers. Unten: Klasse mit unterschiedlicher Verknüpfung zwischen den Speichen. Die Pfeile zeigen auf die Stelle der Struktur, wo der Übergang zwischen ACD und NTR (weiß) bzw. ACD und CTR (schwarz) liegt. Die Verbindung der Dimere kann NTR- (blau) und CTR-vermittelt (orange) vorliegen.

Die asymmetrischen Rekonstruktionen zeigen, dass die apikalen Verbindungen zwischen den Oligomerspeichen dynamisch sind. Nahezu alle Rekonstruktionen zeigen, dass die Oligomere sowohl untereinander verbundene, wie auch nicht verbundene Speichen besitzen (Abbildung 27 rechts; grün und magenta markiert). Bei genauerer Betrachtung kann man zudem erkennen, dass die Verbindung an der ACD eines Monomers an zwei unterschiedlichen Stellen beginnen kann. Abbildung 27 zeigt unten die zwei beobachteten Varianten. Orange markiert ist die Variante, in der die CTR ausgehend von der apikal liegenden Stelle der ACD (schwarzer Pfeil) die Verbindung knüpft. Die blaue Markierung zeigt die Variante, in der die Verbindung von einem tiefer liegenden Punkt entspringt (weißer Pfeil). An dieser Stelle befindet sich in der pseudoatomaren Struktur der ACD der Ansatzpunkt der NTR (Abbildung 28, weißer Pfeil), wodurch wir vermuten, dass die NTR in dieser Variante die Verbindung bereitstellt.

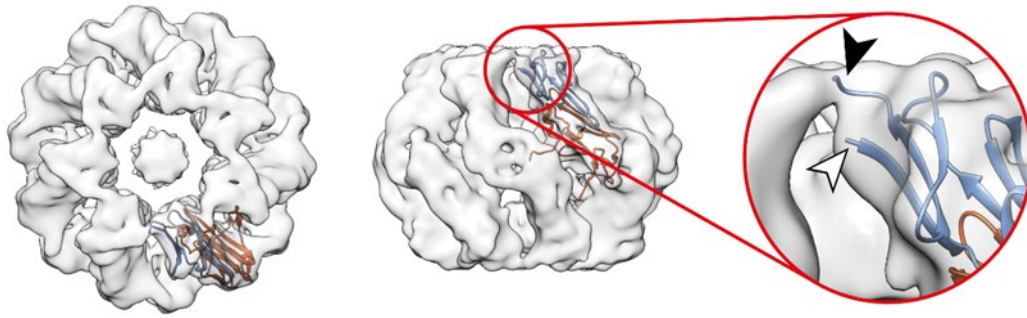


Abbildung 28: Symmetrische Rekonstruktion mit gefittetem Dimer der Kristallstruktur (4ydz). NTR und CTR des apikalen Monomers sind trunkiert (bei Aminosäure 51 bzw. 130). Der schwarze Pfeil zeigt die Position der CTR beim Übergang aus der ACD. Der weiße Pfeil deutet auf die Stelle an der die NTR in die ACD übergeht.

### 3.1.6. CTR „domain-swap“ der apikalen Monomere von Sip1

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass von den apikalen Monomeren unterschiedliche dynamische Verbindungen in das Zentrum des Moleküls gebildet werden. In Kombination mit der teilweise fehlenden Verbindung zum benachbarten Tetramer legt das die Vermutung nahe, dass die CTR eine alternative Bindungsmöglichkeit über das Zentrum des Moleküls besitzt. Abbildung 29A zeigt einen möglichen Verlauf der CTR zum Oligomerzentrum (magentafarbener Pfeil). Die dadurch unbesetzte I-x-I Bindestelle der benachbarten Speiche wird durch eine Verbindung aus dem Zentrum besetzt (blauer Pfeil rechts). Ebenso denkbar wäre eine Bindung an die eigene I-x-I Bindestelle. Abbildung 29B zeigt hingegen den Verlauf der NTR zum Zentrum. Die NTR setzt an der ACD etwas tiefer an als die CTR (Abbildung 27 unten), und kann somit von der CTR differenziert werden. Zudem zeigt die Klasse eine gleichzeitige Verbindung der CTR zur benachbarten Speiche (grüner Pfeil oben). Abbildung 29C zeigt gleichzeitig eine C-terminale Verbindung ins Zentrum und zur benachbarten Speiche. Dieses Rekonstruktionsartefakt ist der hohen Heterogenität von Sip1 geschuldet, wodurch hier zwei Konformationen der CTR gleichzeitig an derselben Position dargestellt werden. Durch die Vielzahl an möglichen Verbindungen bei gleichzeitig großer Flexibilität ist eine eindeutige, hochauflösende Klassifikation unmöglich. Somit werden ähnliche Konformationen während der Klassifikation gemischt und sind schwer interpretierbar. Insgesamt zeigt sich jedoch, dass die apikalen Monomere von Sip1 auf vielfältige Weise an der Oligomerformation beteiligt sind. Neben der in der Literatur beschriebenen C-terminalen Verbindung zwischen den Speichen gibt es eine Vielzahl an möglichen Verbindungen von und zum Oligomerzentrum. Eine N-terminale Beteiligung an der Oligomerformation durch apikale Verbrückung scheint ebenso möglich zu sein und wird im weiteren Verlauf näher betrachtet.



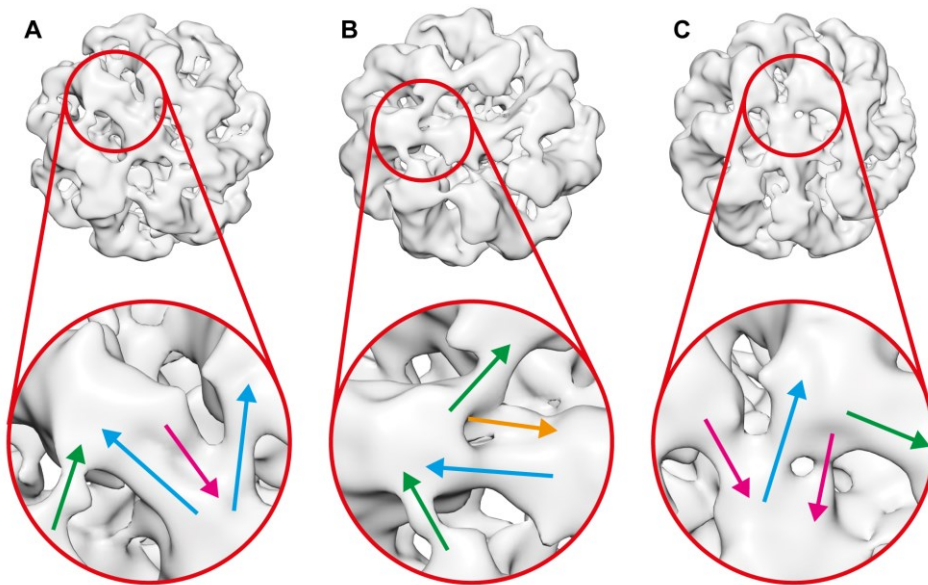


Abbildung 29: Beschreibung verschiedener Bindungen in das Oligomerzentrum am Beispiel von drei Klassen einer asymmetrischen Rekonstruktion von Sip1. Die Pfeile repräsentieren die mögliche Verbindung an dieser Stelle. Grün: C-terminale Verbindung zwischen benachbarten Speichen. Blau: Verbindung vom Zentrum an die  $\beta$ 4- $\beta$ 8 Furche der ACD. Magenta: C-terminale Verbindung in das Zentrum. Orange: N-terminale Verbindung in das Zentrum.

### 3.1.7. 3D-Variabilitäts-Analyse

Da in asymmetrischen Rekonstruktionen das gesamte Oligomer in die Klassifizierung einbezogen wird, enthalten die Klassen immer Mittelungen des Oligomers. Die asymmetrische Einheit von Sip1 ist jedoch das Dimer. Mittels 3D-Variabilitäts-Analyse lässt sich dieser Umstand nutzen, indem die einzelnen Dimere des Oligomers mittels „multi-body-refinement“ als Einzelkörper rekonstruiert werden und anschließend die Variabilität der Rekonstruktionen anhand einer Hauptkomponentenanalyse beschrieben werden. In Sip1 resultierte diese Untersuchung in einer bimodalen Verteilung des ersten Eigenwertes was einen Hinweis auf 2 diskrete Konformationen gibt. Zur Visualisierung dieser Zustände wurden die Orientierungen, denen der erste Eigenwert zugrunde liegt, auf die Einzelkörper des Refinements angewendet und rekonstruiert.

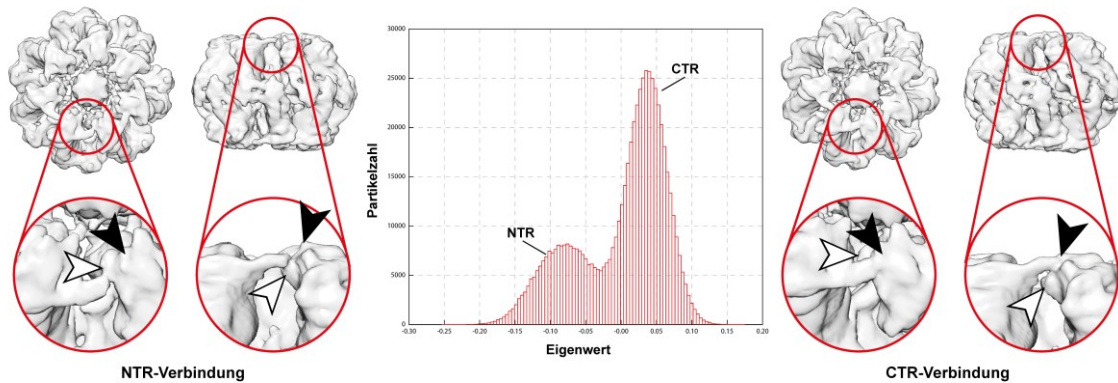


Abbildung 30: Ergebnis des „multibody-refinements“ mit 3D-Variabilitäts-Analyse. Mitte: Das Histogramm der Partikelverteilung entlang des ersten Eigenwertes zeigt eine bimodale Verteilung. Links: Verbindungen der Speichen setzen tiefer an der ACD an und lassen somit vermuten, dass die Verbindungen durch die NTR vermittelt werden. Rechts: Verbindungen der Speichen setzen hoch an der Speiche an und werden dementsprechend durch die CTR vermittelt. Schwarze Pfeile markieren den Übergang ACD/CTR, weiße Pfeile markieren den Übergang NTR/ACD.

In Abbildung 30 wird gezeigt, dass die bimodale Verteilung der Eigenwerte auf zwei Konformationen des Sip1 28mers zurückzuführen sind, die sich hinsichtlich der apikalen Verbrückung benachbarter Speichen unterscheiden. Links ist die Rekonstruktion mit den Orientierungen der niedrigen Eigenwerte dargestellt, rechts die der hohen Eigenwerte. Das Histogramm in der Mitte zeigt die Verteilung der Partikel auf die jeweiligen Eigenwerte. Auffällig ist, dass sich die beiden Rekonstruktionen hinsichtlich des Ansatzpunktes der Verbrückung benachbarter Speichen unterscheiden. Die schwarzen Pfeile in den Rekonstruktionen markieren den oberen Verbindungsansatz, während die weißen Pfeile den tiefer liegenden Ansatzpunkt zeigen. Die Verteilung der Eigenwerte ist zudem nicht gleichmäßig zwischen beiden Moden verteilt. Die Rekonstruktion, die eine Verbindung ausgehend vom äußeren Punkt der Speiche zeigt, ist deutlich stärker populiert (~71%) als die tiefer ansetzende Verbindung (~29%). Der Vergleich mit Abbildung 28 zeigt, dass die beiden beobachteten Positionen mit den Übergängen der ACD in die CTR (oben; schwarzer Pfeil) sowie der NTR in die ACD (unten; weißer Pfeil) korrelieren. Hierdurch wird die Hypothese, dass die NTR an der Verbindung benachbarter Speichen beteiligt sein kann, untermauert. Die Verbindung der Speichen über die CTR ist bereits in der Kristallstruktur beschrieben (Fleckenstein et al. 2015) und kann hier verifiziert werden.

### 3.1.8. Möglicher NTR „domain-swap“

Wie in Abbildung 28 gezeigt wird, liegen die Übergangspunkte der ACD zu CTR und NTR im gefalteten Protein unmittelbar nebeneinander. Abbildung 31 zeigt, dass die NTR von Sip1 ein I-V-P-Motiv mit ähnlicher hydrophober Umgebung wie das L-P-I-Motiv der CTR besitzt, und beide Motive in einem vergleichbaren Abstand zum Übergang in die ACD liegen (10 bzw. 11 Aminosäuren).

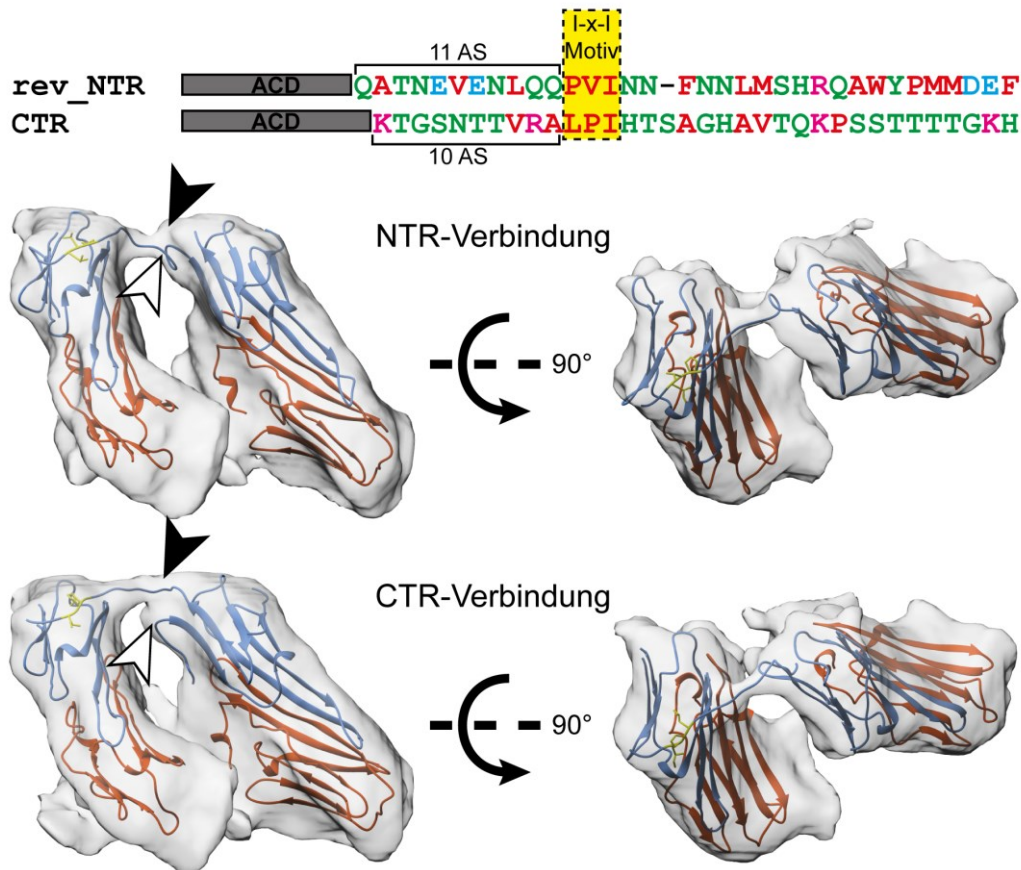


Abbildung 31: Vergleich von N-terminal und C-terminal vermittelten Verbindungen zwischen Speichen von Sip1. Oben: Sequenzalignment von NTR (invertiert um die Direktionalität zu berücksichtigen) und CTR farbcodiert nach Hydrophobizität (magenta: positiv geladen, blau: negativ geladen, rot: hydrophob, grün: polar). Unten: Modellierung mit flexibel gefitteten Termini der N-terminalen und C-terminalen Verbindung in den jeweiligen fokussierten Rekonstruktionen. Das I-x-I Motiv ist gelb eingefärbt. Schwarze Pfeile zeigen den Übergang von ACD zu CTR; weiße Pfeile den Übergang von NTR zu ACD.

Eine asymmetrische, fokussierte Klassifizierung von benachbarten Dimeren im „symmetry-expanded“ Datensatz zeigt, wie bereits beschrieben (Abbildung 27 und Abbildung 30), Klassen, in denen die Verbindung der Dimere auf unterschiedlicher Höhe verläuft. Die Verbindung beginnt entweder dort, wo die CTR das  $\beta$ -Faltblatt der ACD verlässt oder die NTR in das  $\beta$ -Faltblatt der ACD eintritt. In Abbildung 31 wird die flexibel gefittete Kristallstruktur von Sip1 mit modellierten Termini in beiden Versionen gezeigt. Die I-x-I Motive beider Termini liegen in der hydrophoben Bindestelle.



Da Sip1 hinsichtlich der Aktivität und Oligomergröße eine Veränderung im analysierten pH-Bereich aufweist, werden Histidine als mögliche molekulare Schalter vorgeschlagen. Die Histidine 139 und 144 der CTR liegen in dieser Region. Histidin 29 in der NTR liegt etwas weiter entfernt, könnte aber durch Induktion einer Konformationsänderung in der Linkerregion dennoch einen pH-Schalter darstellen.

### 3.1.9. NTR Strukturvorhersage

Um die prognostizierte N-terminale Verbindung der Speichen weiter zu untersuchen, wurde die NTR näher betrachtet. Da in der Kristallstruktur des apikalen Sip1 Monomers die ersten 44 Aminosäuren nicht aufgelöst sind, wurde zu diesem Zweck die Sekundärstruktur der NTR mittels Vorhersagealgorithmen bestimmt. Hierzu wurden 13 Strukturvorhersageprogramme parallel genutzt, um eine mittlere Helixwahrscheinlichkeit der Aminosäuren in der NTR zu berechnen (Abbildung 32).

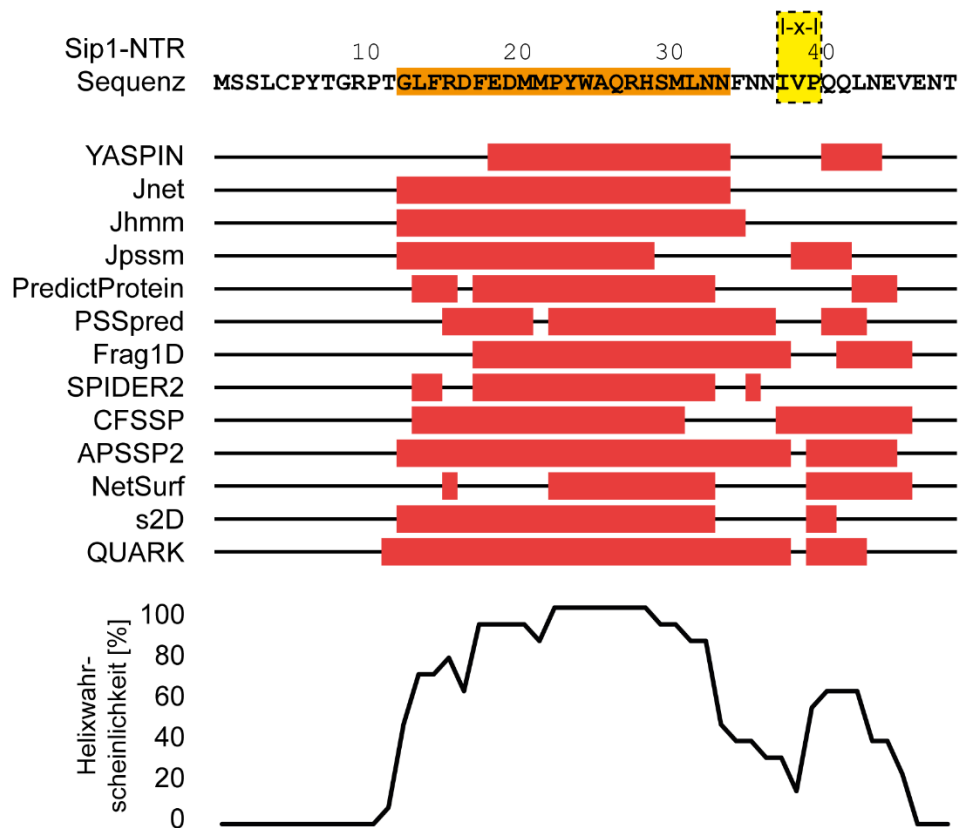


Abbildung 32: Alignment der NTR Sequenz von Sip1 mit den Ergebnissen der genutzten Sekundärstrukturvorhersagealgorithmen. Rote Bereiche wurden als helikale Bereiche vorhergesagt. Die prozentuale Helixwahrscheinlichkeit ist als Funktion des Mittelwerts aller Vorhersagealgorithmen geplottet. Der orange hinterlegte Bereich der Primärsequenz wird mit über 50% durchgängig als Helix vorhergesagt. Das I-x-I Motiv der NTR ist gelb markiert.

Die orange hinterlegte Region zwischen G13 und N34 liegt hiernach mit großer Wahrscheinlichkeit als Helix vor. Inwiefern das hier zutrifft, muss durch weitere Versuche er-



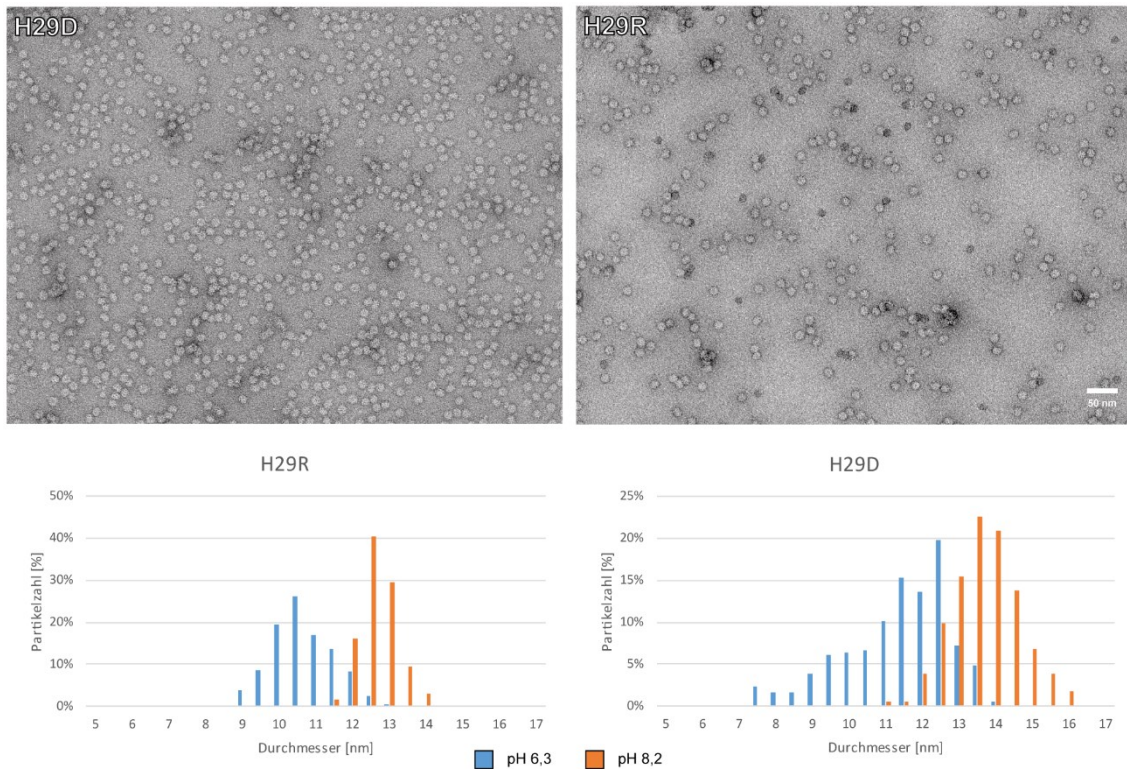


Abbildung 34: Negative stain Aufnahmen von Sip1 Histidinmutanten bei pH 8,2 sowie Histogramme der Größenanalysen dieser Mutanten. Links: Argininmutante H29R. Rechts: Asparaginsäuremutante H29D. Scalebar: 50 nm.

### 3.1.10. Histidin pH-Schalter

Der Einfluss des pH-Werts auf die Oligomerverteilung im Bereich pH 6 bis pH 8 führt zu der Vermutung, dass Histidinreste in den dynamischen N- und C-terminalen Regionen, deren  $pI$  in diesem Bereich liegen, damit in Verbindung stehen. Neben H29 in der NTR liegen zwei Histidine, H139 und H144, innerhalb der CTR. Zur Untersuchung wurden Alaninmutanten dieser beiden Histidinreste erstellt um einen Verlust von Ladungen an diesen Positionen zu untersuchen.

H139A zeigt ein, dem Wildtyp ähnliches Verhalten bei der Größenermittlung durch NS-TEM. Analytische Ultrazentrifugation (aUZ) beschreibt ebenfalls die charakteristische Verschiebung zu kleineren Oligomeren bei niedrigem pH-Wert, wobei hier ein zweiter Peak, der kleinere Spezies charakterisiert, vorhanden ist und die Verteilung deutlich heterogener als die des Wildtyps aussieht. Der Chaperone-assay zeigt Chaperonaktivität bei pH 6,3 während bei höherem pH die Chaperonaktivität vermindert ist (Abbildung 35 links).



H144A zeigt im Unterschied zum Wildtyp in der Größenverteilung durch NS-TEM keine signifikant unterschiedlichen Größen zwischen den beiden untersuchten pH Werten, dafür aber bei beiden pH-Werten insgesamt eine sehr breite Oligomergrößenvarianz. Analytische Ultrazentrifugation zeigt ebenso keine Verschiebung des hydrodynamischen Radius. Die Chaperonaktivität hingegen entspricht dem Wildtyp mit der charakteristischen Steigerung der Aktivität bei niedrigem pH (Abbildung 35 rechts).

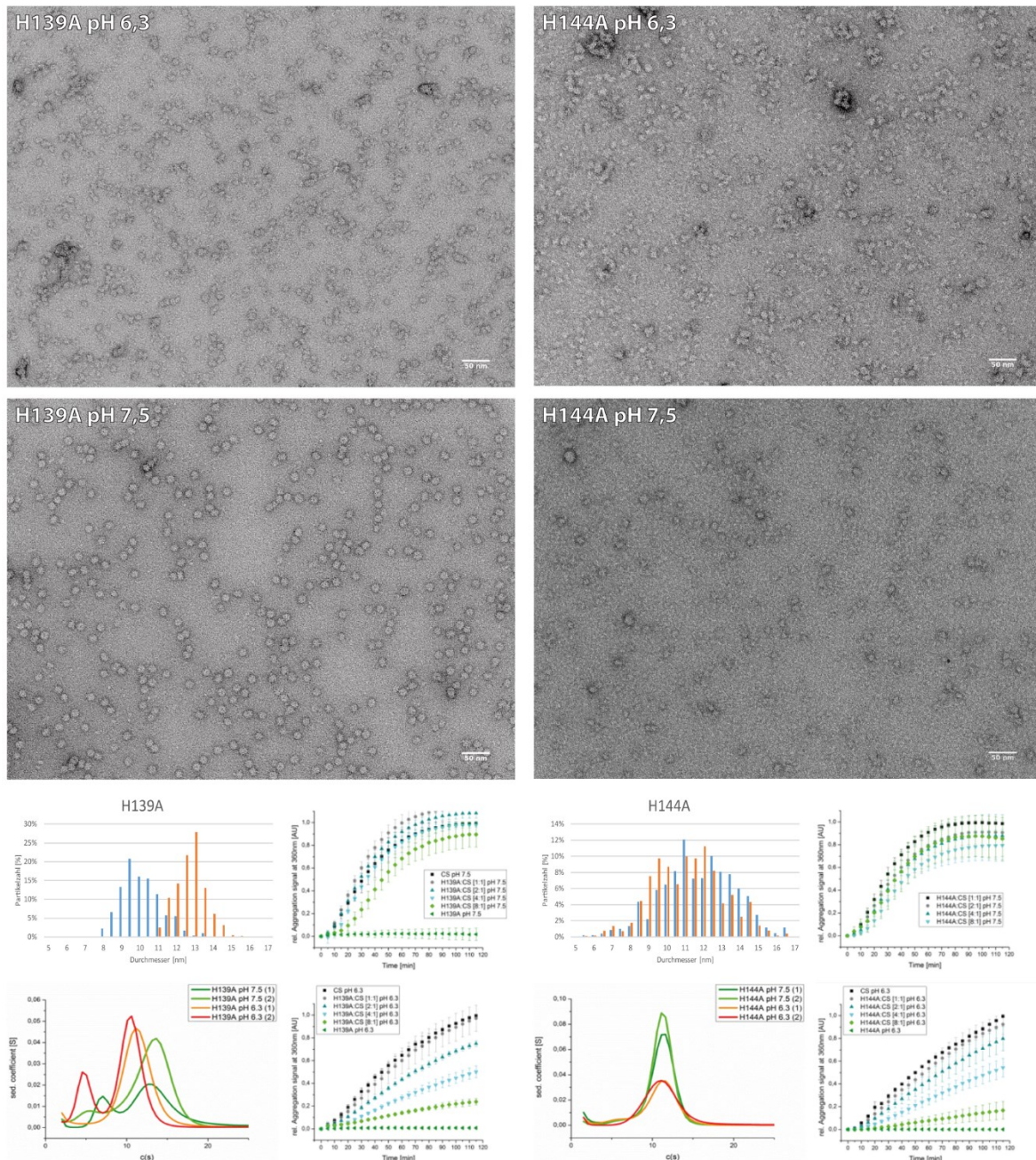


Abbildung 35: C-terminale Histidinmutanten H139A und H144A im Vergleich. Negative stain Aufnahmen bei pH 6,3 und 7,5 (Scalebars 50 nm), Histogramm der Größenanalyse (orange: pH 7,5, blau: pH 6,3), Resultat der aUZ Messungen sowie Ergebnisse der Chaperone-assays (durchgeführt von A. Strauch). Links: Sip1 H139A Rechts: Sip1 H144A.

### 3.1.11. Flexibles Fitting mittels MDFF

Da sowohl die symmetrische wie auch die asymmetrische Rekonstruktion von Sip1 zusätzliche Informationen für Regionen des Oligomers liefern, für die bisher keine Kristallstruktur bekannt sind, wurde die Struktur neu modelliert. Für eine exakte *de-novo* Modellierung ist die Auflösung nicht ausreichend. Durch die höhere Auflösung gegenüber bekannten EM-Rekonstruktionen konnte die Kristallstruktur in die Struktur eingepasst werden. Hierdurch erhält man ein pseudoatomares Modell von Sip1 in nativer Konformation. Zunächst wurde ausgehend von der bekannten Kristallstruktur (4ydz) mit D8 Symmetrie eine Variante mit D7 Symmetrie modelliert. Die D7 symmetrische Struktur wurde mittels MDFF (siehe Seite 28) flexibel in die symmetrische Rekonstruktion gefittet. Hierzu wurde aus der EM-Rekonstruktion ein zusätzliches „forcefield“ generiert, dessen Stärke im Verlauf des fittings von 1,0 auf 0,5 verringert wurde. Sekundärstrukturen, Cispeptide und Chiralitätszentren wurden während des fittings beibehalten. Um die Symmetrie des Modells zu erhalten wurde ein zusätzlicher „symmetry-restraint“ eingeführt. Dadurch werden die Kräfte auf die C $\alpha$ -Atome der Struktur in jedem Schritt der MD gemittelt.

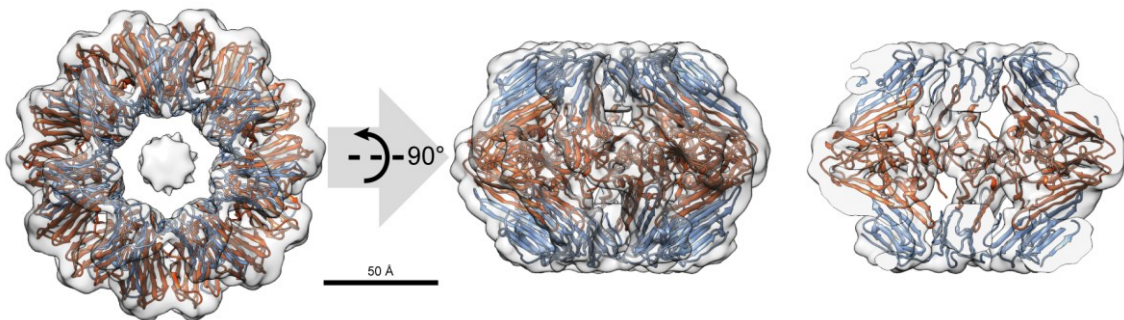


Abbildung 36: Symmetrische Sip1 Rekonstruktion mit flexibel gefitteter pseudoatomarer Struktur. Apikale Monomere sind blau eingefärbt, äquatoriale Monomere in orange. Links: „topview“; Mitte: „sideview“; Rechts halb geöffnete „sideview“-Ansicht. Scalebar: 50 Å

Abbildung 36 zeigt die flexibel gefittete Struktur in der EM-Struktur. Die Masse im Zentrum der Rekonstruktion, welche keine pseudoatomare Struktur enthält, wurde nicht, wie in vergangenen Studien (Fleckenstein et al. 2015), als Rekonstruktionsartefakt eingestuft und entfernt. Die verbesserte Rekonstruktion zeigt hingegen, neben den bereits gezeigten apikalen Verbindungen (siehe Seite 43), zahlreiche weitere Verbindungsmöglichkeiten der zentralen Masse zu den Speichen des Oligomers. Sowohl NTRs der apikalen Monomere (blau) als auch der äquatorialen Monomere (orange) tragen hierzu vermutlich bei. Der Verlauf der NTRs kann nicht zweifelsfrei rekonstruiert werden, daher kann keine genaue Aussage über die Struktur in diesem Bereich getroffen werden. Jedoch liegt der Schluss nahe, dass die NTRs im inneren des Oligomers interagieren.

## 3.2. Hsp17

### 3.2.1. Kenntnisstand

Hsp17 ist eines der 16 sHsp aus *C. elegans* (Kriehuber et al. 2010). Es wird konstitutiv exprimiert und ist durch Schwermetalle und Hitzestress induzierbar (Ezemaduka et al. 2017). Das Protein besteht aus 149 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 17,6 kDa. Hsp17 wird in jungen adulten Würmern in Pharynx, Ausscheidungstrakt, Darm und Anus exprimiert. Es wurde gezeigt, dass Hsp17 *in-vitro* bei erhöhter Temperatur zu verstärkter Aggregation von Substraten wie MDH, polyQ Proteinen und KIN-19 führt, während andere Substrate wie CS und GAPDH vor Aggregation geschützt werden und Hsp17 somit als selektive Proteinaggrogase wirkt (Iburg et al. 2020).

Hsp17 zeigte im negative stain EM sogenannte „supermolecular assemblies (SMA)“, welche aus großen Zusammenschlüssen von aneinander liegenden Oligomeren zu bestehen scheinen (Zhang et al. 2015). Zudem sind bereits Kryo-EM Rekonstruktionen bekannt, die jedoch lediglich eine Auflösung von 14,5 Å erreichten (Zhang et al. 2015). Das Oligomer zeigt hier eine tetrahedrale Symmetrie mit 24 Untereinheiten. Als pseudoatomares Modell wurde bisher die Kristallstruktur des homologen Hsp16 aus Weizen verwendet (Zhang et al. 2015).

### 3.2.2. Negative stain

Für eine initiale elektronenmikroskopische Charakterisierung von Hsp17 aus *C. elegans* wurde der Wildtyp (Hsp17 wt) sowie eine Mutante in mit deletierter NTR (Hsp17  $\Delta$ NTR) nach Negativkontrastierung analysiert (Abbildung 37 oben). Beim Wildtyp zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der Oligomere mit nur vereinzelt vorkommenden Aggregaten. Das Auftreten von SMA konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Die Deletion der NTR führte zu einer drastisch reduzierten Anzahl der Oligomere sowie zu einer Zunahme der Heterogenität bezüglich der Oligomergröße, wodurch eine weitere Analyse der Mutante mittels EM unterlassen wurde. Der Wildtyp wurde einer Größenanalyse unterzogen, wobei insgesamt 14 875 Partikel vermessen wurden. Die Analyse der Größenverteilung zeigte eine relativ breite Oligomergrößenverteilung von 10,5 bis 15,5 Å (Abbildung 37 unten).



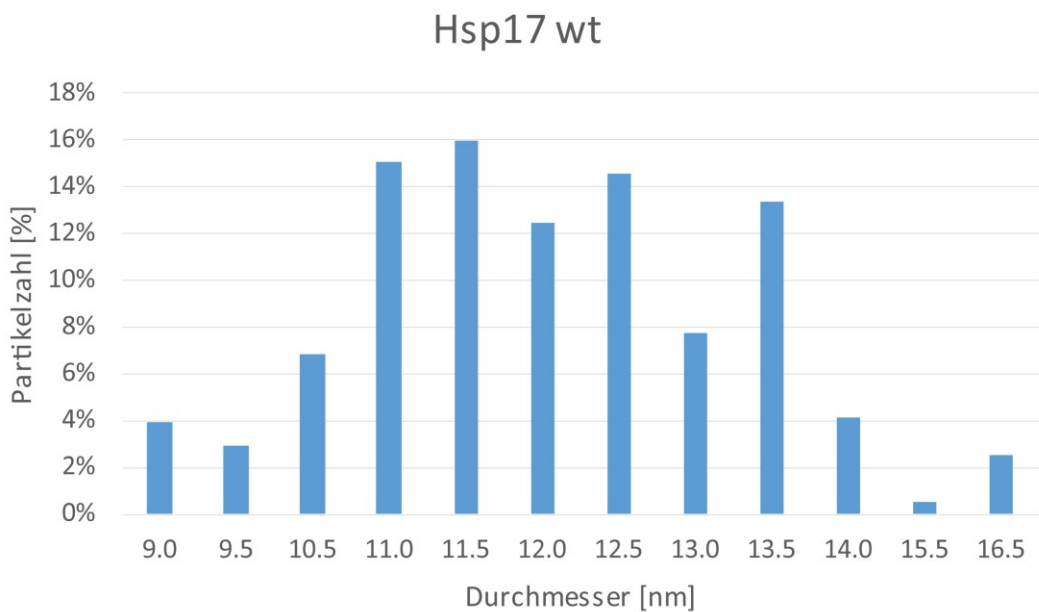
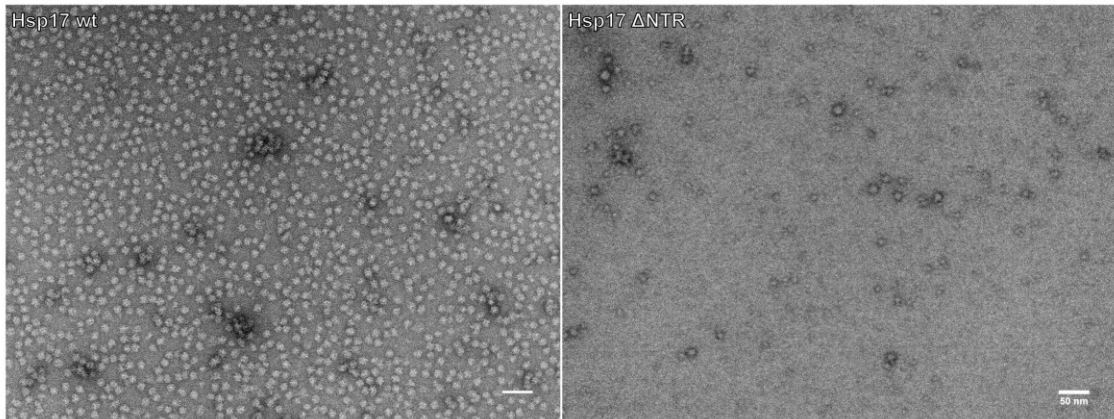


Abbildung 37: Negative stain Aufnahmen von Hsp17 wt und Hsp17  $\Delta$ NTR sowie Histogramm der Größenanalyse von Hsp17 wt aus insgesamt 14 875 Partikeln. Der Mittelwert aller Partikeldurchmesser ist 12,65 nm. Scalebar 50 nm.

Zur weiteren Analyse des Hsp17 wt wurde eine MSA des Datensatzes durchgeführt. Die Eigenbilder (Abbildung 38) zeigen deutlich 3- und 2-fach Symmetrien, was auf das Vorliegen einer tetrahedralen Struktur deutet und somit die bestehenden Ergebnisse verifiziert (Zhang et al. 2015).

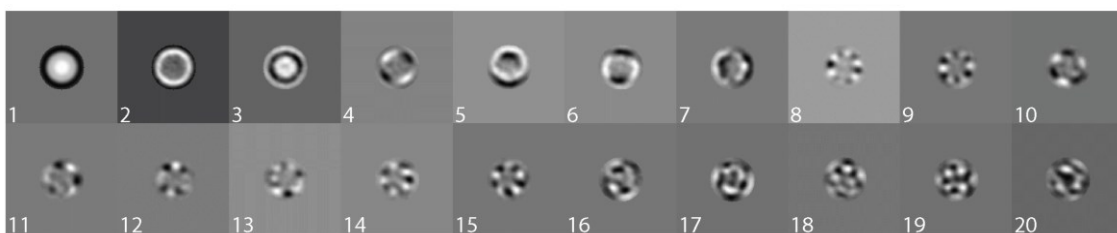


Abbildung 38: Eigenbilder von Hsp17 wt. Eigenbilder 4 und 6 zeigen 2-fach Symmetrie, während die Eigenbilder 10 und 11 eine 3-fach Symmetrie belegen. Daraus resultiert die in Eigenbilder 8 und 9 auftretende 6-fach Symmetrie. Zudem zeigen die Eigenbilder 2 und 3 eine deutliche Größenvarianz.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Protein für die weitere Charakterisierung mittels Kryo-EM untersucht. Parallel wurden negative stain Experimente von Hsp17wt-Aggregationsassays mit Citratsynthase (CS), Malatdehydrogenase (MDH) und Insulin als Substratproteine durchgeführt. Abbildung 39 zeigt, dass die Oligomerstruktur von Hsp17 in Proben ohne Substrat nach Hitzeschock erhalten bleibt. Die Größe von 12 bis 14 nm entspricht den Ergebnissen der Größenanalyse (Abbildung 37). Proben ohne Hitzeschockprotein zeigten bei allen Substratproteinen die Bildung großer, amorpher Aggregate.

Die Zugabe von Hsp17 zu CS im Verhältnis von 1:1 vor Hitzeschock führte zur Bildung globulärer Aggregate mit einer Größe von etwa 30-80 nm. Bei einem vierfachen Überschuss von Hsp17 blieb die globuläre Struktur der Aggregate erhalten, während sich die Größe auf etwa 10-50 nm verkleinerte und die Anzahl der Aggregate stark zunahm (Abbildung 39 oben).

Die Zugabe von Hsp17 zu MDH im Verhältnis 1:1 vor Hitzeschock zeigte hingegen die Bildung großer, amorpher Aggregate, ähnlich der Proben ohne Hitzeschockprotein. Hierbei waren sowohl die Anzahl als auch die Größe der Aggregate höher als in der Kontrolle. Bei vierfachem Überschuss von Hsp17 nahmen Größe und Anzahl weiter deutlich zu (Abbildung 39 Mitte).

Insulin als Substratprotein zeigte die Bildung kleiner, kompakter Aggregate bei niedriger Hsp17-Konzentration, während bei hoher Konzentration große unstrukturierte Aggregate gebildet wurden (Abbildung 39 unten). Um die Beobachtung mit Insulin als Substrat weiter zu charakterisieren wurden zusätzliche Hsp17-Konzentrationen untersucht, sowie Proben während des Verlaufs des Aggregationsassays genommen. Hierbei zeigte sich, dass Proben mit niedrigerer Hsp17-Konzentration eine geringere Insulinaggregation hervorriefen. Zudem fiel der Anstieg der Aggregatgröße während des Assays in Anwesenheit hoher Hsp17-Konzentrationen geringer aus (Abbildung 40).



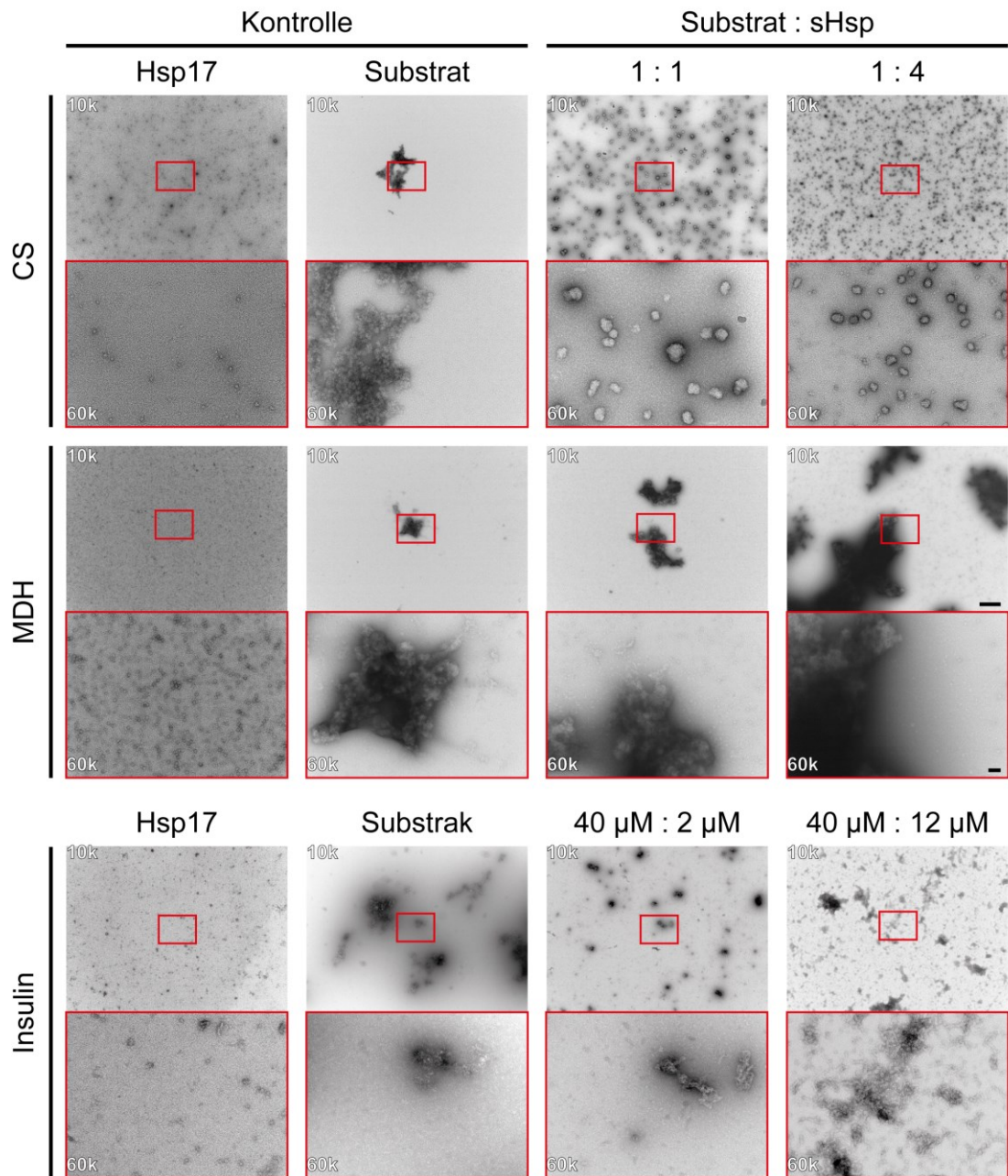


Abbildung 39: Vergleich der Chaperone-assays von Hsp17 mit Citratsynthase (oben), Malatdehydrogenase (mitte) und Insulin (unten) als Substrat bei 10k und 60k Vergrößerung. Scalebars zeigen 500 nm (10k) und 50 nm (60k).

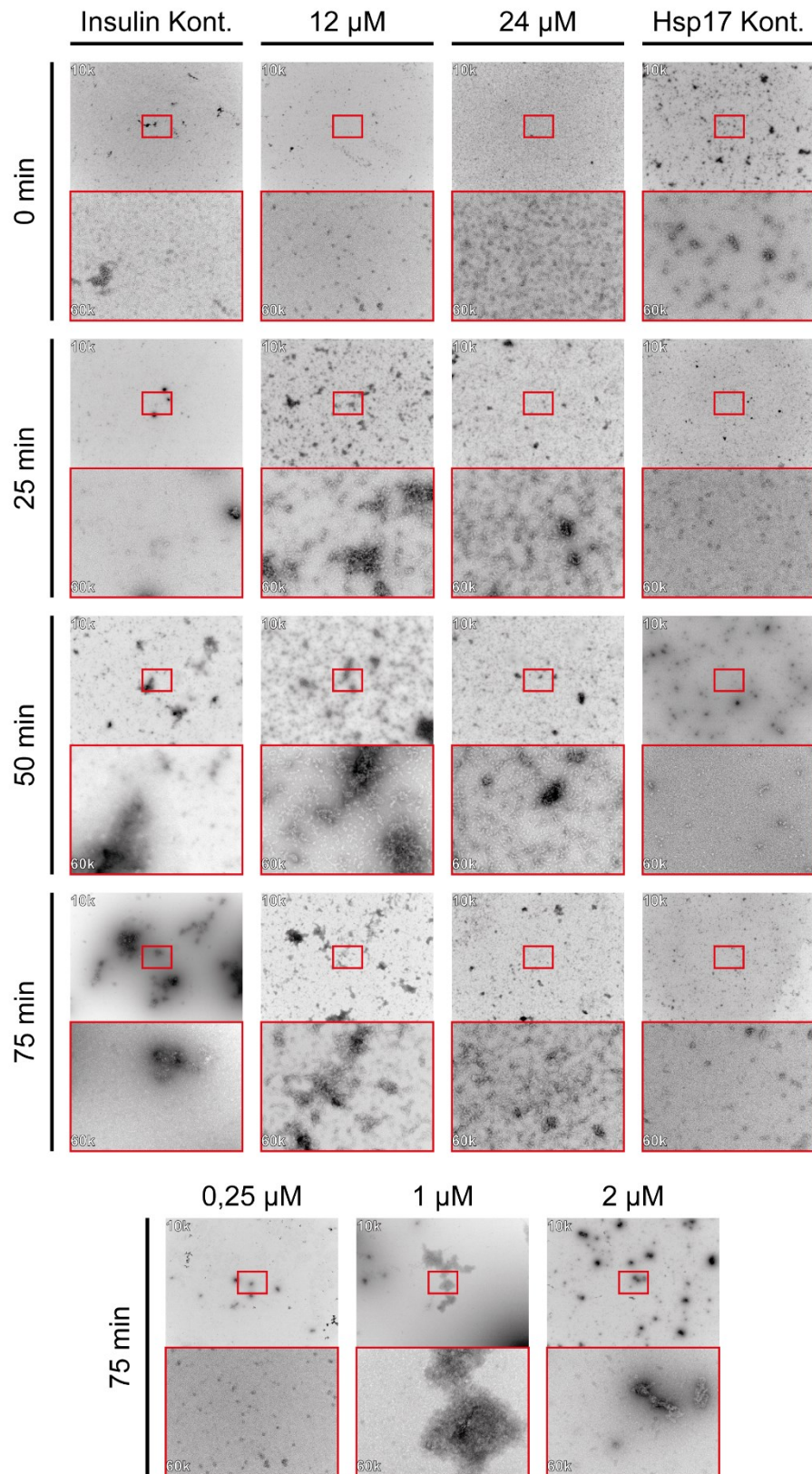


Abbildung 40: Zeitlicher Verlauf des Chaperone-assays von Hsp17 mit Insulin als Substratprotein bei 20 °C. Neben den in Abbildung 39 verwendeten Hsp17 Konzentrationen (2  $\mu\text{M}$  und 12  $\mu\text{M}$ ) werden zusätzlich die Endpunkte der Assays mit den Konzentrationen 0,25  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$ , sowie die zeitlichen Verläufe der Kontrollproben und der Assays mit den Konzentrationen 12  $\mu\text{M}$  und 24  $\mu\text{M}$  dargestellt. Vergrößerung 10k und 60k. Scalebars zeigen 500 nm (10k) und 50 nm (60k).

Neben den Assays bei 20 °C wurden identische Versuche bei 37 °C durchgeführt. Dabei trat die selbe Konzentrationsabhängigkeit der Chaperonfunktion auf. Bei niedriger Hsp17-Konzentration konnte eine Holdase-Funktion beobachtet werden, während mit steigender Konzentration eine Aggregase-Funktion auftrat (Abbildung 41).

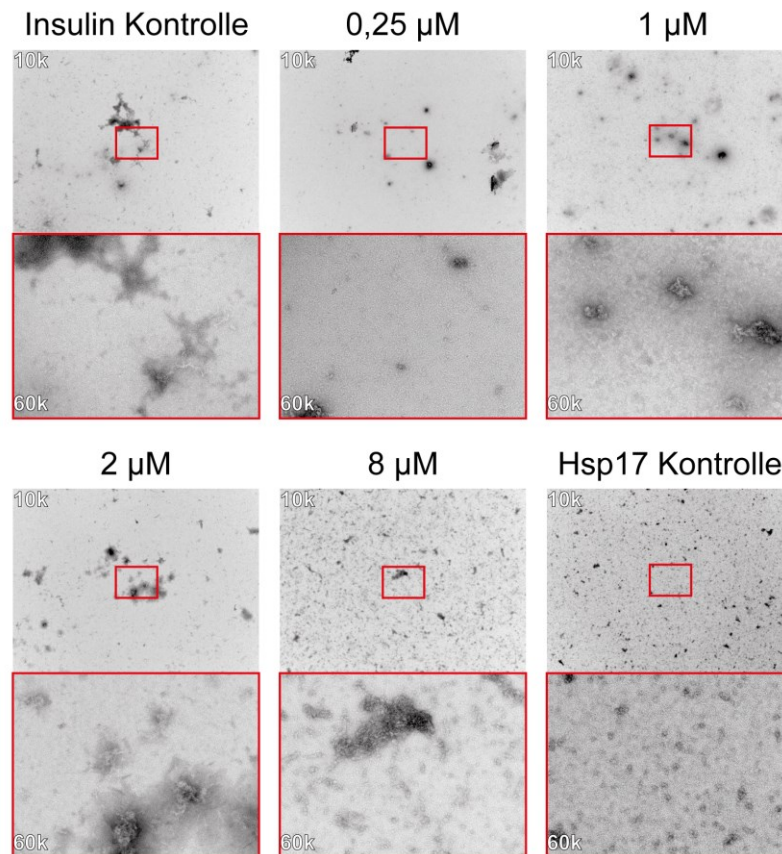


Abbildung 41: Chaperone Assays von Hsp17 mit Insulin als Substratprotein bei 37 °C. Aufnahmepaare zeigen identische Bildausschnitte bei 10k und 60k Vergrößerung. Scalebars zeigen 500 nm (10k) und 50 nm (60k).

### 3.2.3. Kryo-TEM

Zur weiteren Analyse der Hsp17 wt Struktur, wurde ein Kryo-TEM Datensatz aufgenommen. 2 568 Negative wurden mit einem Titan Krios Mikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV mit einer Gatan K3 direct-detector Kamera im CDS Modus mit einer Pixelgröße von 1,09 Å aufgezeichnet. Der Defokus variierte im Bereich zwischen -0,5 und -2,5 µm. Die aufgezeichneten movies enthielten 30 Einzelaufnahmen mit einer Gesamtelektronendosis von 55 e-/Å<sup>2</sup>. Nach Alignierung, Normalisierung und Summierung der movies mit dem Programm UCSF Motioncorr (55 e-/Å<sup>2</sup>, 9x9 Patches) wurde die CTF mit dem Programm Gctf (sphärische Abberation 2.7 mm, min. Auflösung 15 Å, max. Auflösung 3 Å, min. Defocus 300 nm, Pixelgröße 1.09 Å) bestimmt. Nach visuellem kuratieren der Ergebnisse bestand der Datensatz aus 2 134 Negativen. Mit dem Pro-



gramm Gautomatch wurden während der Aufnahme bereits Einzelpartikel von den Negativen automatisch und ohne Templat ausgewählt. Die so gepickten Koordinaten wurden genutzt, um einen ersten Datensatz in Cryosparc2 zu erstellen. Nach 2D-Klassifizierung in 50 Klassen wurden schließlich 31 Klassen als Templat für ein verbessertes Picking ausgewählt. Die Auswahl der Einzelpartikel erfolgte schließlich automatisch mit dem Template Picker in Cryosparc2 und ergab einen Datensatz mit 663 141 Partikeln. Anschließend erfolgte ein zweistufiges Sortieren des Datensatzes mittels 2D-Klassifizierung bei dem Partikel, die keine sinnvollen Informationen für die Strukturbestimmung beinhalten von der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen wurden. Aus den verbliebenen 344 489 Partikeln wurde mittels SGD-Algorithmus eine Startstruktur berechnet (3 Klassen, C3 Symmetrie). Aus 187 116 Partikeln der besten Startstruktur wurde schließlich eine symmetrische Rekonstruktion durch Anwendung der Tetraedersymmetrie während des Refinements erstellt und in der EMDB veröffentlicht (EMD-13346) (Abbildung 42).

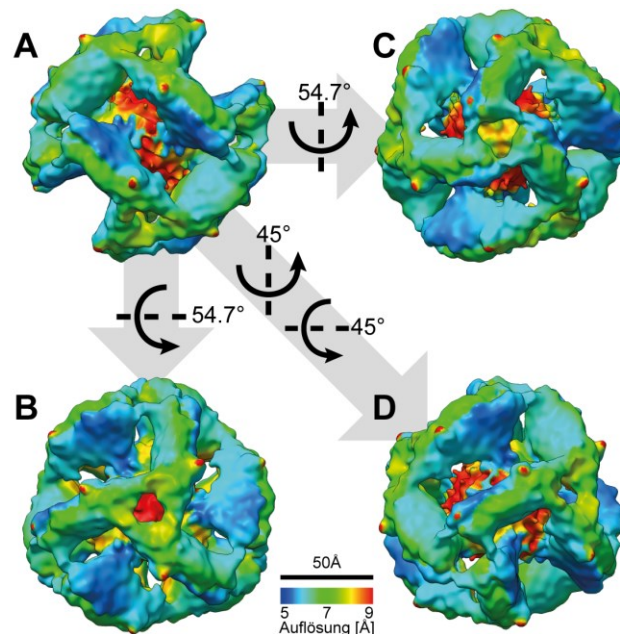


Abbildung 42: Local resolution map der symmetrischen Rekonstruktion von Hsp17. Die ACD weist eine gute Auflösung um 5 Å auf, während die NTRs entweder nicht aufgelöst werden konnten oder nur eine schlechte Auflösung (>9 Å) zeigen.

Die symmetrische Rekonstruktion ermöglichte ein präzises fitting der ACD, da die beta-Faltblätter eindeutig zu erkennen waren. Das Hsp17 Oligomer weist eine kubische Geometrie mit der Symmetrie eines einbeschriebenen Tetraeders auf. Die Kanten des Würfels werden durch ACD-Dimere gebildet, wodurch man eine 24mer Struktur erhält. Alternative Oligomerspezies, wie z.B. bei Sip1 (Fleckenstein et al. 2015) oder  $\alpha$ A-Kristallin (Kaiser et al. 2019) konnten für Hsp17 nicht identifiziert werden. Für die symmetrische Rekonstruktion konnte eine Auflösung von 6,49 Å erzielt werden. Aufgrund der höheren Rigidität ist die ACD besser aufgelöst (unter 5 Å) während die NTR und CTR aufgrund

der höheren Flexibilität eine Auflösung von etwa 7 Å erreicht. Im Zentrum des Oligomers zeigt sich eine schlecht aufgelöste Masse, die durch die hochflexiblen Enden der Peptidkette verursacht wird und über einen breiten Bereich mit den ACDs verbunden ist (Abbildung 42).

Ein wichtiger Schritt bei der Oligomerformation von sHsps ist die ACD-Dimerisierung. Für Hsp17 wird der „non-metazoan fold“ in der Literatur beschrieben (Zhang et al. 2015). Bei Sip1, das ebenfalls in *C. elegans* vorkommt, liegt hingegen der „metazoan fold“ vor (Fleckenstein et al. 2015). Um das Auftreten verschiedener Dimerisierungstypen im selben Organismus zu verifizieren, wurde die Lage der ACD in der Rekonstruktion genauer betrachtet. Die Auflösung der Rekonstruktion in diesem Bereich ermöglicht eine eindeutige Lokalisierung der  $\beta$ -Faltblätter des ACD-Dimers (Abbildung 43).

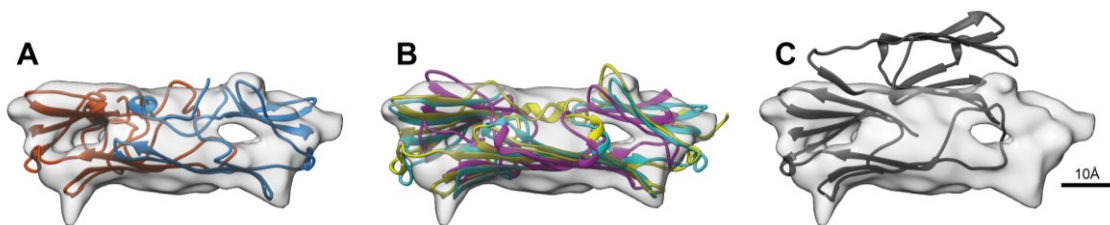


Abbildung 43: Fitting von sHsp ACDs in die Dichte der ACD der Rekonstruktion von Hsp17. Der „threshold“ wurde so gewählt, dass die  $\beta$ -Faltblätter der ACD gut sichtbar sind. A: Fitting des Hsp17 Modells. B: Fitting von Sip1 (4ydz, gelb),  $\alpha$ A-Crystallin (3l1f; cyan) und  $\alpha$ B-Crystallin (3l1g; magenta), die alle den metazoan fold einnehmen, passen gut in die Rekonstruktion. C: Die Struktur von Weizen Hsp16.9 (1gme, grau) passt nicht in die Rekonstruktion.

Das Fitting einer Kristallstruktur der ACD eines sHsps mit „non-metazoan fold“ führt zu relativ schlechter Kreuzkorrelation, wie am Beispiel von Weizen Hsp16 (1gme) mit einer Korrelation von 0,69 gezeigt wurde. Strukturen von sHsps mit „metazoan fold“ zeigen hingegen höhere Kreuzkorrelationen, wie zum Beispiel bovines  $\alpha$ A-crystallin (3l1f) mit 0,89. Die untersuchten Strukturen sind in Tabelle 7 dargestellt. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Hsp17, entgegen der publizierten Ergebnisse (Zhang et al. 2015), den „metazoan fold“ einnimmt.

sHsp ACD	Kreuzkorrelation (bei 6,5 Å)
<i>C. elegans</i> Sip1 (4ydz)	0,89
<i>T. aestivum</i> Hsp16 (1gme)	0,69
<i>R. norvegicus</i> Hsp20 (2wj5)	0,86
<i>B. taurus</i> $\alpha$ A-Crystallin (3l1f)	0,89
<i>H. sapiens</i> $\alpha$ B-Crystallin (3l1g)	0,88

Tabelle 7: Kreuzkorrelation verschiedener sHsp Strukturen mit der Dichte der ACD von Hsp17.

### 3.2.4. Strukturmodellierung

Basierend auf den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Rekonstruktion konnte mittels Homologiemodellierung ein pseudoatomares Modell von Hsp17 erstellt werden. Als Referenz für die Modellierung diente Sip1 (4ydz). Nach initialem „rigid body fitting“ (UCSF Chimera) wurde die Struktur durch flexibles fitting mittels Molekulardynamik (VMD/NAMD2) in die Rekonstruktion gefittet. Anschließend wurde die Struktur iterativ verbessert (PHENIX) und Ramachandran- sowie Seitenkettenfehler korrigiert (Coot). Die Rekonstruktion ermöglichte das Fitten der Aminosäuren 25 bis 148 der superfacialen Monomere und 1 bis 148 der luminalen Monomere. Die ersten 24 Aminosäuren der superfacialen Monomere konnten keiner Dichterekonstruktion zugeordnet werden und wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Das Modell wurde in der PDB veröffentlicht (7pe3). Die Validierungsstatistik des Modells ist in Tabelle 8 dargestellt.

<b>Model composition</b>	
Non-hydrogen atoms	2248
Protein residues	272
<b>R.m.s. deviations</b>	
Bond lengths (Å)	0.004
Bond angles (°)	1.101
<b>Validation</b>	
MolProbity score	2.27
Clashscore	15.51
Poor rotamers (%)	0
<b>Ramachandran plot</b>	
Favored (%)	89.18
Allowed (%)	10.82
Disallowed (%)	0

Tabelle 8: Validierungsstatistik des pseudoatomaren Modells von Hsp17 (7pe3).

Aufgrund der Orientierung der ACD-Dimere im Oligomer ist es möglich, die beiden beteiligten Monomere anhand ihrer Lage als ein luminales und ein superfaciales Monomer zu unterscheiden (Abbildung 44, luminal: orange, superficial: blau). Beim superfacialen Monomer konnte die NTR nicht aufgelöst werden, während die NTR der luminalen Monomere in der Dichtekarte rekonstruiert werden konnte. Die CTR ist für die Verknüpfung der Monomere an den Ecken des Würfels verantwortlich.

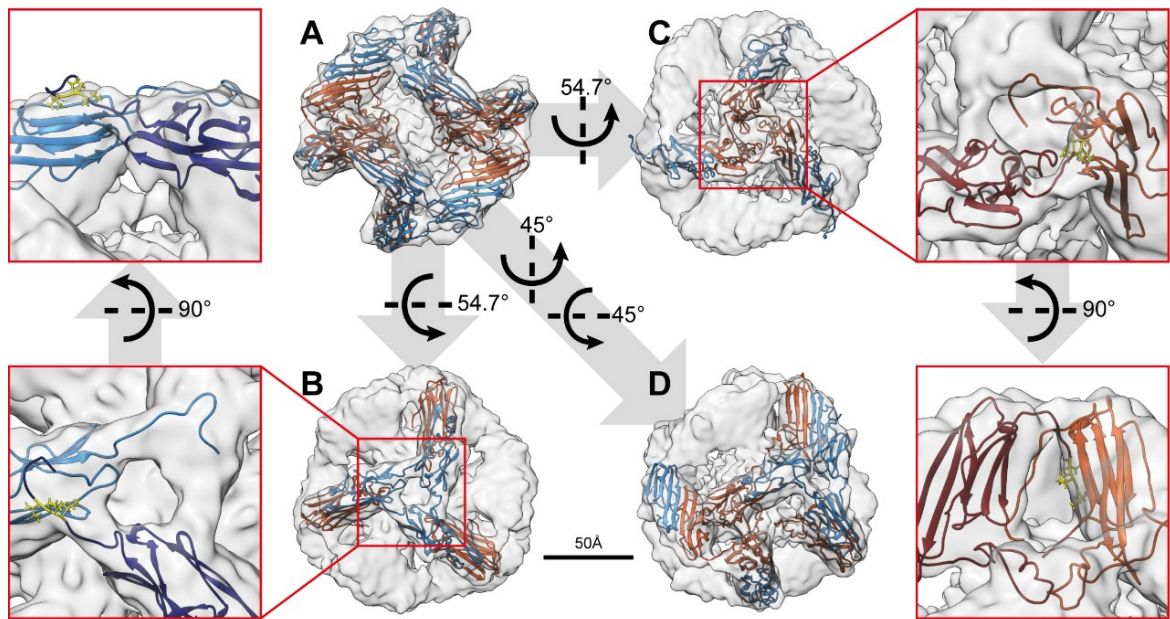


Abbildung 44: Rekonstruktionen von Hsp17 mit gefitteter pseudoatomarer Struktur. Luminale Monomere sind orange gefärbt, während superfaciale Monomere blau sind. (A) zeigt eine 2-fach symmetrische Seite. Ausgehend hiervon erhält man durch Rotation um  $54,7^\circ$  um die x- (B) oder y-Achse (C) die 3-fach symmetrische Ansicht. Die zwei Interaktionsmöglichkeiten sind in den vergrößerten Ausschnitten dargestellt.

Je nach involviertem Monomer können hier zwei verschiedene Verknüpfungen der Monomere unterschieden werden. Zum einen kann die CTR eines superfacialen Monomers mit ihrem I-x-I-Motiv die ACD eines benachbarten Dimers binden, sodass die CTR über die Außenseite des Oligomers verläuft (Abbildung 44 blau, Inset links), während an einer benachbarten Oligomerecke die CTR eines luminalen Monomers in Richtung Oligomerezentrum verläuft und die nach innengewandte I-x-I-Bindestelle kontaktiert (Abbildung 44 orange, Inset rechts).

Da die für sHsps typische, hohe Flexibilität und konformationelle Heterogenität bei symmetrischer Rekonstruktion zu Problemen führt, wurde der Datensatz mithilfe asymmetrischer Rekonstruktion und Klassifizierung analysiert. Hierbei wurde speziell die Heterogenität der Verknüpfung der Dimere an den Ecken des Oligomers untersucht. Es war möglich, alle möglichen Varianten der CTR-Verbrückung an den Oligomerecken zu klassifizieren (Abbildung 45). Sowohl luminale als auch superfaciale Monomere sind an der Oligomerisierung beteiligt. Aufgrund der Tetraedersymmetrie interagieren entweder drei luminale (Abbildung 45, A1 und B1-3) oder drei superfaciale Monomere (Abbildung 45, A2 und B4-6) an einer Oligomerecke, um eine Verbindung untereinander zu etablieren.

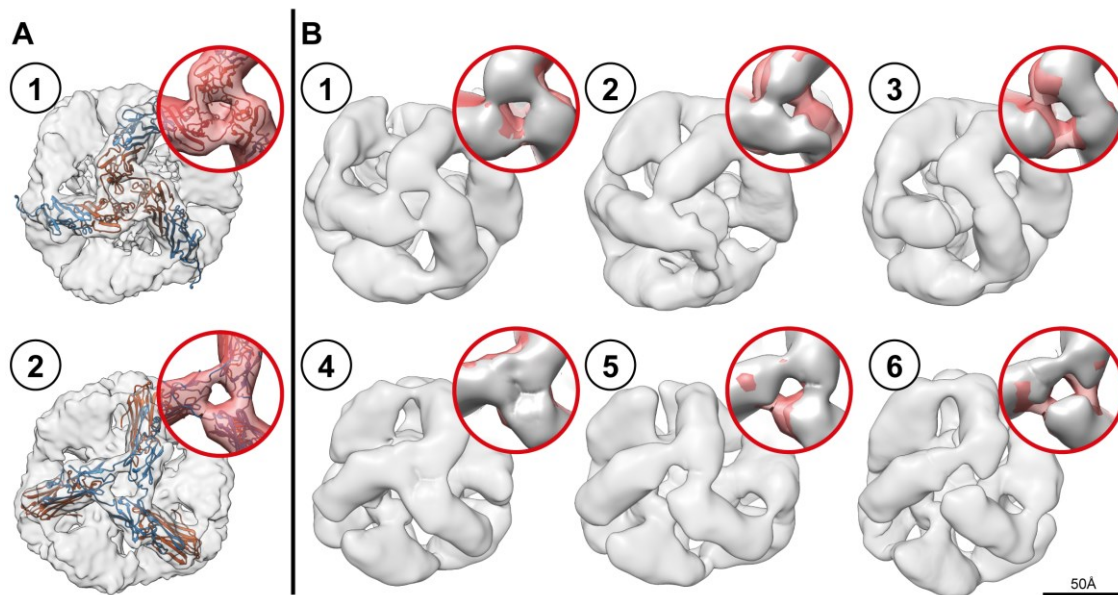


Abbildung 45: Asymmetrische Klassifizierung von Hsp17 zur Darstellung der verschiedenen C-terminalen Bindungsvarianten entlang der 3-fach Achsen. (A1) und (A2) zeigen die symmetrische Rekonstruktion mit gefitteter Struktur der betrachteten Verbindung. Die Dichte dieser Struktur ist in den roten Insets derselben Zeile zum Vergleich dargestellt. (B1-3) zeigt asymmetrische Rekonstruktionen der Interaktionsstelle dreier luminaler Monomere mit drei (B1), zwei (B2) oder einer (B3) Verbindung zwischen benachbarten Monomeren. (B4-6) zeigt asymmetrische Rekonstruktionen der Interaktionsstelle dreier superfacialen Monomere mit drei (B4), zwei (B5) oder einer (B6) Verbindung zwischen benachbarten Monomeren

An den Oligomerecken können die aufeinandertreffenden Monomere ein-, zwei- oder dreifach verbunden sein. In einer Klassifizierung mit 50 Klassen konnten 63 % der Ecken einem dieser Bindungsmodi zugeordnet werden. 76,5 % der Oligomerecken waren in einer Dreifachverknüpfung involviert (Abbildung 45, B1 und B4), 21,7 % in einer Zweifachverknüpfung (Abbildung 45, B2 und B5) und 1,8 % in einer Einzelverbindung zwischen den drei Monomeren (Abbildung 45, B3 und B6). Das Verhältnis der Verknüpfungsvarianten beträgt also 43:12:1. Die Ecken von asymmetrischen Rekonstruktionen mit dreifacher Verknüpfung weisen eine hohe Übereinstimmung mit der symmetrischen Rekonstruktion auf (Abbildung 45, A1 und A2), was in Anbetracht ihrer hohen Häufigkeit dazu führt, dass die symmetrische Rekonstruktion als Konsensmodell bestätigt werden kann. Rekonstruktionen mit Ecken, die ein- oder zweifach verknüpft sind, zeigen zudem vermehrt verzerrte Oligomergeometrien.

Da Hsp17 $\Delta$ NTR keine Oligomere bildet, kann davon ausgegangen werden, dass die NTR eine Rolle in der Oligomerformation spielt und die CTR alleine nicht für die Bildung von Oligomeren ausreichend ist. Die NTR der superfacialen Monomere konnte in der Rekonstruktion nicht aufgelöst werden, daher liegt der Schluss nahe, dass dieser Bereich des Moleküls über eine besonders ausgeprägte Flexibilität verfügt.



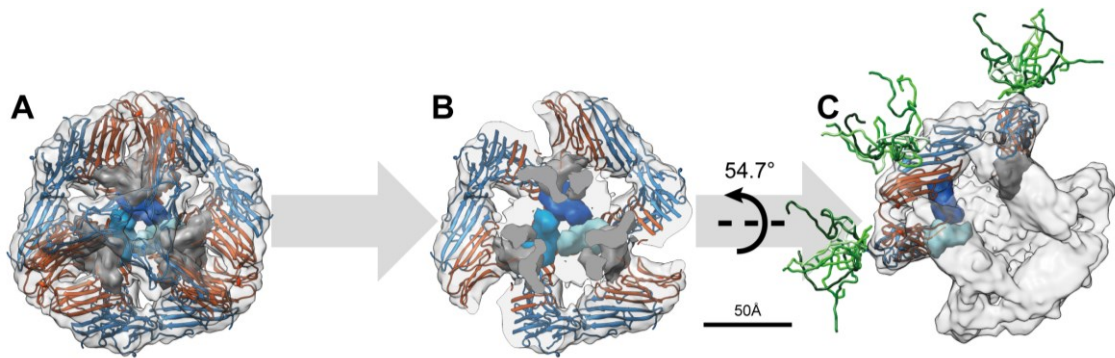


Abbildung 46: A: Rekonstruktion des Oligomers mit gefitteter pseudoatomarer Struktur. NTRs der luminalen Monomere sind als opake Dichten dargestellt. Die drei blauen Dichten zeigen die mögliche Interaktion von 3 NTRs. Die verbleibenden neun Dichten sind grau dargestellt, um den Platzbedarf darzustellen. B: Aufgeschnittene Ansicht des Oligomers aus A um die Interaktion der NTRs besser zu zeigen. C: Ansicht entlang der 2-fach Symmetrieachse mit drei gefitteten Dimeren (orange/blau) und den korrespondierenden luminalen NTRs dargestellt als opake Dichten. Die superfacialen NTRs sind als Superimposition von 10 Strukturen in verschiedenen Grüntönen dargestellt um deren Platzbedarf zu repräsentieren.

Zur Darstellung des Bewegungsspielraums der superfacialen NTRs wurden 10 mögliche Strukturen dieses Bereichs modelliert (Abbildung 46C, grüne Strukturen). Die NTR der luminalen Monomere ist in Richtung des Zentrums des Oligomers gerichtet, wo es in räumliche Nähe der NTR anderer Monomere kommt (Abbildung 46, opake Dichten). Aufgrund des begrenzten Bewegungsspielraums der NTR an dieser Position nahe des Zentrums des Oligomers sowie der Interaktion mit den anderen NTR war es möglich, diesen Teil der Struktur zu modellieren. Die Rekonstruktion zeigt eine breite Verbindung zwischen der ACD und der zentralen Masse im Zentrum des Oligomers. Die Lage der ACD führt schließlich zu der Schlussfolgerung, dass diese Verbindung sowie die zentrale Masse durch die zwölf NTR der luminalen Monomere gebildet wird. Die niedrige lokale Auflösung der Struktur an dieser Stelle deutet zum einen auf eine hohe Flexibilität der NTR hin und lässt vermuten, dass die NTR keine stabile Struktur bildet.

Der Vergleich mit der AlphaFold-Vorhersage Q20660 (Jumper et al. 2021) verifiziert das Ergebnis der pseudoatomaren Struktur. Dabei zeigt die Vorhersage ebenso den „metazoan fold“ sowie den Verlauf der luminalen NTR in die Dichte der EM-Rekonstruktion. Von der NTR des superfacialen Monomers sind die ersten 24 Aminosäuren in der Struktur nicht aufgelöst, jedoch bestätigt auch hier die AlphaFold-Vorhersage einen vergleichbaren Verlauf in der postulierten Region der superfacialen NTR. Der Verlauf der CTR der Vorhersage zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die superfaciale Struktur, während die CTR der luminalen Monomere abknickt und daher nicht mit der Vorhersage übereinstimmt.

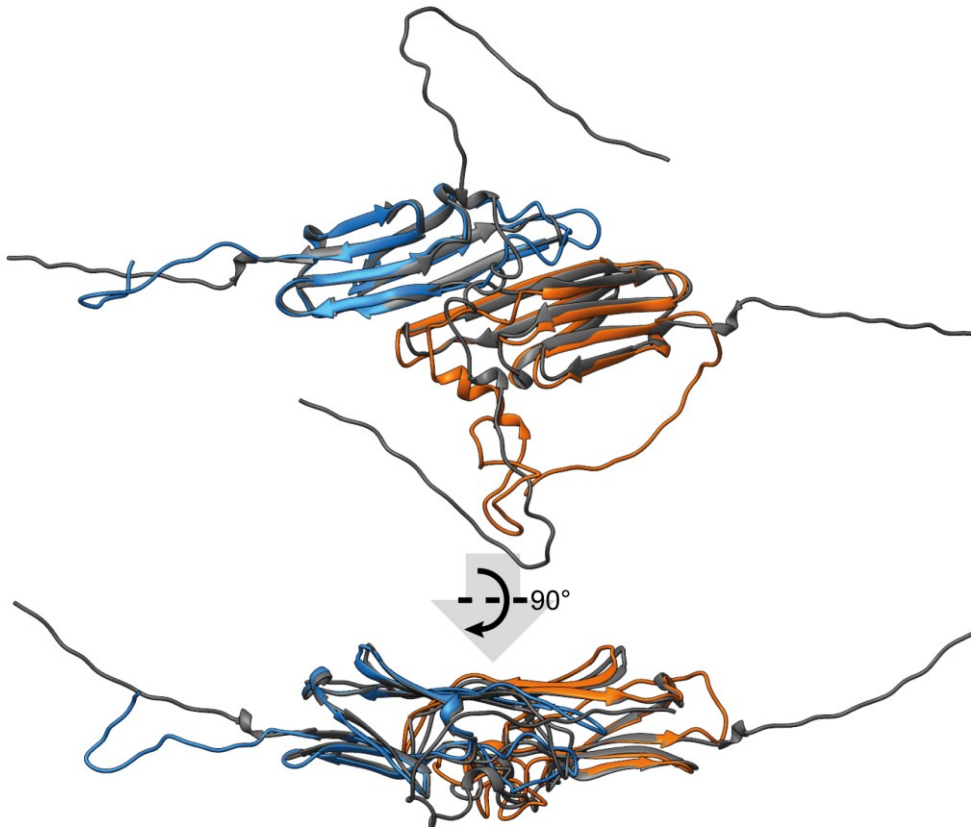


Abbildung 47: Die Überlagerung der Struktur von Hsp17 mit der Vorhersage (Q20660) des AlphaFold Servers zeigt eine hohe Übereinstimmung der ACD. Der Verlauf der CTR der AlphaFold Vorhersage verläuft ähnlich der CTR der superfacialen Monomere (blau), während der Verlauf der NTR eher dem der luminalen Monomere (orange) entspricht.

### 3.2.5. Mapping von Crosslink Daten

Die Ergebnisse von Crosslinkingexperimenten mit DSG (Disuccinimidylglutarat) als Crosslinker (durchgeführt von A. Strauch) konnten unter Berücksichtigung der Linkerlänge in die pseudoatomare Struktur eingefügt werden (Abbildung 48). Es konnten zahlreiche Cross- und Looplinks innerhalb des Hsp17-Dimers identifiziert werden (Abbildung 48 A und C). Weiterhin konnten Crosslinks zwischen Monomeren an den Ecken des Oligomers ermittelt werden. Hierbei sind die Crosslinks zwischen Lys91 und Lys137 sowie zwischen Lys91 und Lys146 charakteristisch für die C-terminale Verbindung dreier luminaler Monomere (Abbildung 48 B). Die Crosslinks zwischen Lys91 und Lys130, Lys102 und Lys146, Lys127 und Lys146 sowie Lys130 und Lys146 hingegen treten ausschließlich in C-terminalen Verbindungen zwischen superfacialen Monomeren auf (Abbildung 48 D).

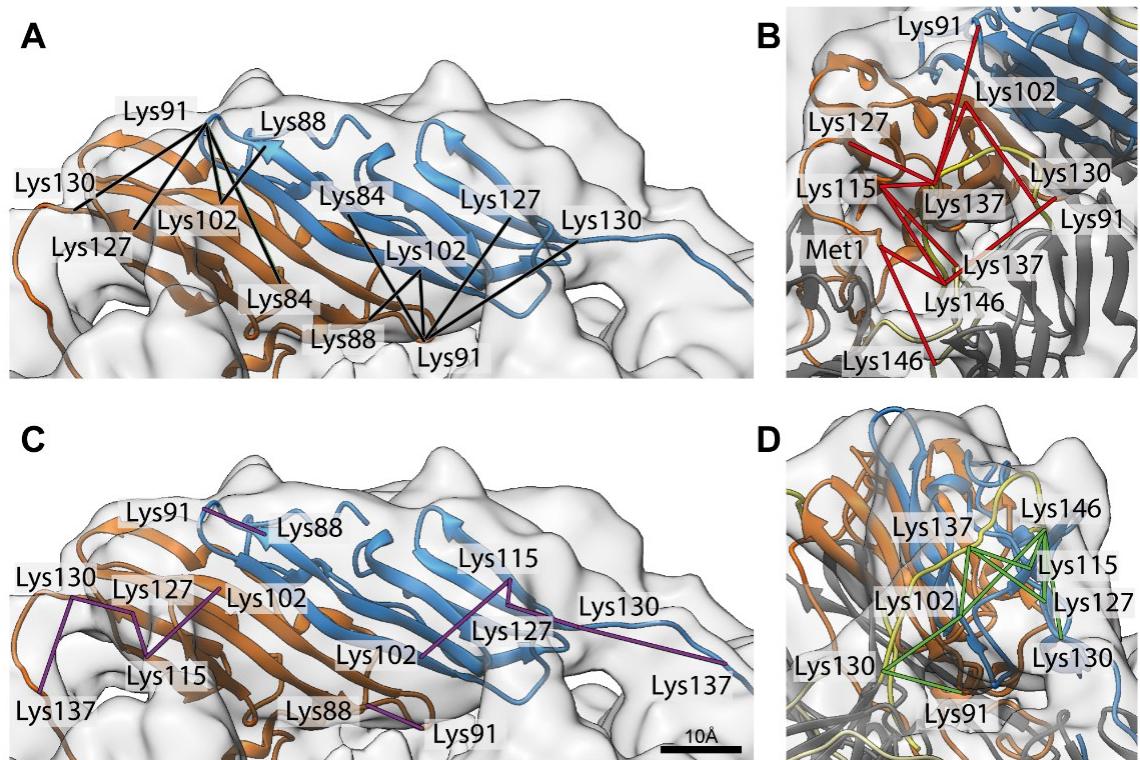


Abbildung 48: Mapping der Crosslink Daten auf die pseudoatomare Struktur. Luminalen Monomere sind orange abgebildet, während superfaciellen Monomere blau dargestellt sind. CTRs sind gelb eingefärbt. Lysin- und Methioninreste, die Crosslinks bilden sind markiert. A: Ermittelte Crosslinks (schwarz) zwischen den Monomeren eines Dimers. B: Ermittelte Crosslinks (rot) zwischen luminalen Monomeren und benachbarten CTRs. C: Ermittelte Looplinks (violett) im Dimer. D: Ermittelte Crosslinks (grün) zwischen superfaciellen Monomeren und benachbarten CTRs.

Der Crosslink zwischen Met1 und Lys146 zeigt eine Interaktion von luminalen Monomeren mit der NTR, woraus sich eine räumliche Nähe der NTRs in diesem Bereich ableiten lässt (Abbildung 48 B). Weiterhin zeigen die Ergebnisse der Crosslinkingexperimente, dass Met1 Crosslinks zu zahlreichen Lysinresten auf der Oberfläche des Oligomers bilden kann (Abbildung 49). Hierdurch wird zunehmend die Annahme unterstützt, dass die NTRs der superfaciellen Monomere über eine stark ausgeprägte Flexibilität und hohe Reichweite verfügen.

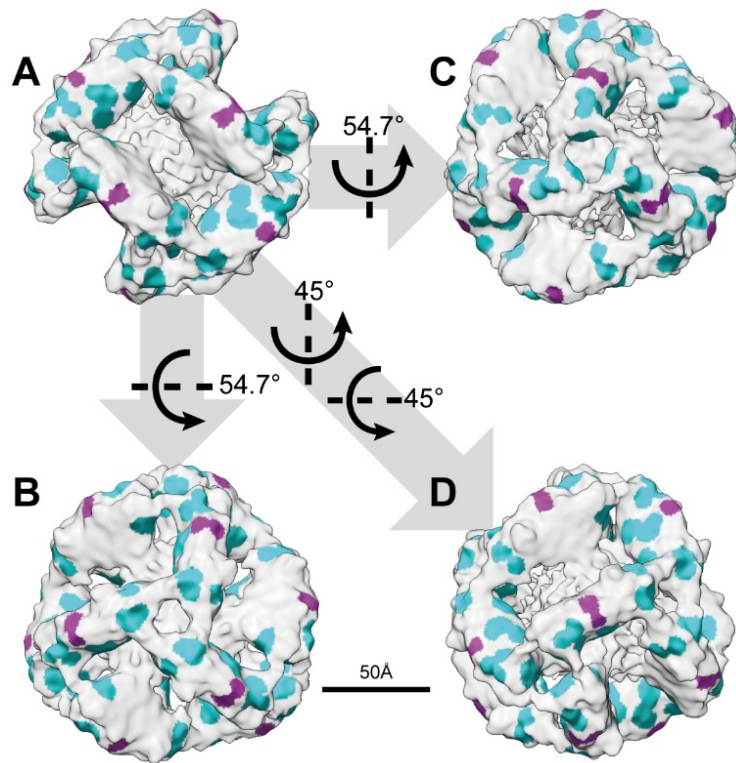


Abbildung 49: Rekonstruktion von Hsp17 mit Farbcodierung der Ergebnisse der Crosslinkexperimente. Bereiche in magenta markieren den Punkt der Rekonstruktion an dem die NTR in die ACD übergeht. Bereiche in cyan zeigen die Verbindungspunkte der ermittelten Crosslinks zwischen der NTR und dem Oligomer.

## 4. Diskussion

### 4.1. Sip1

#### 4.1.1. Native Struktur zeigt im Gegensatz zur Kristallstruktur D7 Symmetrie

Neben den bekannten Größenanalysen mittels negative stain EM wurde in dieser Arbeit eine Größenanalyse auf Basis der Kryo-EM Daten durchgeführt. Es konnte auch hier gezeigt werden, dass Sip1 bei niedrigerem pH kleinere Oligomere bildet. Jedoch liegt bei den Daten ein großer Überlappungsbereich hinsichtlich der Oligomergröße vor. Zusammen mit der erhöhten Chaperonaktivität bei niedrigem pH untermauert das die publizierte Annahme, dass die größeren Oligomerformen eine Art Speicherform darstellen und durch Aktivierung kleinere Spezies (Dimere, Tetramere) freigesetzt werden (Fleckenstein et al. 2015). Der Mechanismus dieser Freisetzung bleibt ungelöst.

Die publizierte Kristallstruktur von Sip1 zeigt das D8 symmetrische 32mer (Fleckenstein et al. 2015). Die mittels Kryo-EM aufgenommenen Daten zeigen hingegen, dass das D7 symmetrische 28mer in nativer Umgebung häufiger vorkommt als das 32mer. In dieser Arbeit wurde das 28mer als verbreitetste Oligomerspezies rekonstruiert. Hierzu war eine aufwändige Sortierung der Daten notwendig.

#### 4.1.2. D6 Symmetrie ist ein Artefakt der Oligomergeometrie von Sip1

Da die unterschiedlich großen Oligomerspezies in einem chemischen Gleichgewicht vorliegen, ist es nicht möglich homogene Proben zu generieren. Da die vorhandene Heterogenität jedoch massive Probleme für die Bildverarbeitung bereitstellt, wurden neben der üblichen 2D- und 3D-Klassifizierung, Symmetrieeigenheiten der „sideviews“ von geradzahligen und ungeradzahligen Dihedralsymmetrien genutzt um die unterschiedlichen Oligomergrößen besser zu trennen.

Da hierzu zunächst „sideviews“ und „topview“ getrennt analysiert wurden, eröffnete sich die Möglichkeit die unterschiedlichen Ansichten separat zu klassifizieren und deren Symmetrieeigenschaften zu untersuchen. Dabei konnten in dieser Arbeit Rekonstruktionen mit 7- und 8-fach Symmetrie erstellt werden. Die publizierte 6-fach symmetrische Oligomerspezies (Fleckenstein et al. 2015) konnte hingegen nicht reproduziert werden, obwohl die Analyse der Eigenbilder von Sip1 eine 6-fach Symmetrie im Datensatz zeigt. Ein 6-fach symmetrisches 24mer setzt eine 6-fach Symmetrie in den „topviews“ voraus. Die Anwesenheit von 6-fach symmetrischen Eigenbildern im gesamten Datensatz wird

hingegen von Seitenansichten der verschiedenen Oligomere hervorgerufen. Die Wölbung der Tetramere zusammen mit den ringförmig angeordneten apikalen Monomeren führt zu einem sechseckigen Profil der Oligomere (Abbildung 24). Da es sich hierbei um ein nahezu gleichseitiges, regelmäßiges Sechseck handelt wurde die 6-fach Symmetrie in der Vergangenheit zusammen mit 7-fach und 8-fach Symmetrie als mögliche Oligomersymmetrie angenommen. Das Fehlen dieser Symmetrie im „topview“-Datensatz widerspricht dieser Annahme, somit ist eine in vorangehenden Studien beschriebene 24mer Struktur nicht ausgeschlossen, scheint aber nach den Ergebnissen in dieser Arbeit zumindest sehr selten zu sein. Diese These wird gestützt durch die durchwegs schlechte Auflösung der Rekonstruktionen mit D6 Symmetrie in der Literatur (Fleckenstein et al. 2015).

#### **4.1.3. Symmetrische Kryo-EM Rekonstruktion mit lokaler Auflösung**

Der sortierten Datensatz ermöglicht es eine verbesserte Rekonstruktion des 28mers zu generieren. Die „gold-standard“ Auflösung der D7 symmetrischen Rekonstruktion liegt bei 5,2 Å. Zudem wurde die lokale Auflösung der Rekonstruktion bestimmt, wodurch die Rigidität der ACD durch eine hohe lokale Auflösung und die Flexibilität der Termini durch eine schlechte Auflösung erkannt werden konnte. Im Bereich der äquatorialen Verbindung zweier Dimere innerhalb der Speiche eines Oligomers konnte eine bisher nicht beschriebene Dichte in der Rekonstruktion ausgemacht werden. Aufgrund der Lage nahe der äquatorialen NTR wird vermutet, dass diese Verbindung durch den, in der Kristallstruktur nicht aufgelösten, Teil der NTR gebildet wird. Zudem trat im Zentrum der Rekonstruktion eine nicht näher interpretierbare Masse auf, die durch N- und C-terminale Ketten, welche nicht an der Oligomerformation beteiligt sind, gebildet wird.

#### **4.1.4. Flexibles Fitting mittels MDFF führt zu erster 28mer Struktur in nativer Umgebung**

Da die publizierte Kristallstruktur das Sip1 32mer repräsentiert, wurde im Zuge dieser Arbeit ausgehend von der Kristallstruktur das erste Modell eines Sip1 28mers modelliert. Hierzu wurde, das pseudoatomare Modell einer Speiche der Kristallstruktur, mittels Symmetrisierung und anschließenden Molekulardynamik Simulationen in die symmetrische Rekonstruktion flexibel gefittet. Dieses Vorgehen erlaubt die Modellierung nahe am nativen Zustand, da sowohl die Rekonstruktion den quasi-nativen Zustand der Kryo-EM Abbildung entspricht, als auch die Molekulardynamik die physiologischen Bedingungen durch Verwendung entsprechender „forcefields“ simuliert.



#### 4.1.5. Asymmetrische Rekonstruktion offenbart großes konformationelles Spektrum von Sip1

Neben den unterschiedlichen Oligomergößen von Sip1 stellt das große konformationelle Spektrum der Oligomere ein zusätzliches Hindernis für die 3D-Rekonstruktion dar. Konformationsänderungen an einer Stelle des Oligomers treten nicht koinzident in allen symmetrischen Äquivalenten im Oligomer auf. Eine symmetrische Rekonstruktion führt hierbei unweigerlich zu einer Mittelung unterschiedlicher Konformationen. Da diese Mittelung nun Informationen aller Konformationen enthält, führt das in einem iterativen Refinement dazu, dass alle Konformationen zu dieser Referenz passen und die Rekonstruktion weitere, unterschiedliche Konformationen zusammenmittelt. Dies führt dazu, dass die symmetrische Rekonstruktion apikale Verbindungen zwischen allen Speichen aufweist und zudem von jeder Speiche mehrere Verbindungen in das Zentrum vorliegen. Die Verbindungen sind zudem relativ breit, da auch hier verschiedene Konformationen gemittelt wurden. Die symmetrische Rekonstruktion bildet somit den nativen Zustand nur ungenau ab. Des Weiteren kann die Dichte im Zentrum nicht entschlüsselt werden, da auch hier durch die symmetrische Mittelung das ohnehin schwer interpretierbare Zentrum noch unübersichtlicher wird. Um diesem Umstand zu begegnen wurden asymmetrische Rekonstruktionen ausgehend von der symmetrischen Konsensstruktur erstellt. Um dennoch die strukturelle Redundanz der Oligomersymmetrie zu nutzen, wurde der Datensatz „symmetry expanded“. Alle nachfolgenden Schritte ließen nur noch winkellimitierte Alignierung zu, um ein Aufeinanderalignieren identischer Daten zu verhindern. Die hierdurch erzeugten, asymmetrischen 3D-Klassen weisen eine deutlich schlechtere Auflösung als die Konsensstruktur auf, da durch die Klassifizierung die Datengrundlage für jede Rekonstruktion deutlich geringer wurde. Auffällig ist jedoch, dass die apikale Verbindung der Speichen durch die CTR nicht immer koinzident zwischen allen Speichen auftritt. Es konnten zahlreiche Permutationen aus vorhandener und absenter Verbindung rekonstruiert werden, wodurch wir zu dem Schluss kommen, dass diese Konformationsänderungen unabhängig voneinander sind. Hieraus ergibt sich, dass die Anzahl der möglichen Klassen aufgrund der Dihedralsymmetrie als „k-ary bracelet“ mit ungerader Länge nach Formel (13) berechnet werden kann (Gilbert & Riordan 1961, Sawada 2001).

$$B_k(n) = \frac{1}{2} \left( \frac{1}{n} \sum_{d|n} \varphi(d) k^{\frac{n}{d}} + k^{\frac{n+1}{2}} \right) \quad (13)$$

Mit Länge  $n=7$ , Alphabetgröße  $k=4$  (Verbindung oben, Verbindung unten, beide Verbindungen, keine Verbindung) und eulerscher Phi-Funktion  $\varphi$  erhält man 1 300 mögliche

Klassen. Eine Klassifizierung mit dieser Anzahl an Klassen bräuchte für eine hinreichend gute Auflösung etliche Millionen Partikel und würde nach derzeitigem Stand der Technik extrem viel Rechenzeit benötigen. Zudem wird bei der Berechnung nach Formel (13) die Symmetrie des Oligomers berücksichtigt, was jedoch bei dem hier genutzten „symmetry expanded“ Datensatz nicht möglich ist. Das bedeutet, dass der „symmetry expanded“ Datensatz des Sip1 28mers, aufgrund der 14 betrachteten Verbindungen im Oligomer, 16384 ( $= 2^{14}$ ) Permutationen der apikalen Verbindung der CTR bilden kann. Da eine Klassifizierung mit dieser Anzahl an Klassen nicht möglich ist, stellen die Klassen auch in diesem Fall eine Mittelung aus ähnlichen Konformationen dar.

Aufgrund der exponierten Lage konnten insbesondere die apikalen Verbindungen genauer untersucht werden. Jedoch zeigen auch andere Bereiche des Oligomers konformationelle Unterschiede in der Klassifizierung. Die in der symmetrischen Rekonstruktion sichtbare Dichte im Zentrum des Oligomers weist Verbindungen zu dem NTR und CTR auf, die in der Kristallstruktur nicht aufgelöst werden konnten. Jedoch ist selbst eine asymmetrische Rekonstruktion nicht ausreichend, um eine exakte Aussage über den Verlauf der Termini zu treffen. Der Versuch dies durch fokussierte Klassifizierung und „signal subtraction“ zu verbessern lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Hierbei waren vor allem Randeffekte durch die verwendeten Masken sowie das starke Ungleichgewicht von fokussierter Dichte und abgezogener Dichte problematisch. Es ist jedoch denkbar, dass die Entwicklung besserer Algorithmen, das Aufnehmen größerer Datensätze sowie wachsende Rechenleistung eine Möglichkeit bieten diese Idee weiter zu verfolgen. Die erhaltenen Ergebnisse würden dann jedoch nicht mehr das gesamte Oligomer darstellen, sondern nur eine bestimmte Verbindung charakterisieren. Damit würde sich dann die Herausforderung ergeben, dieses erlangte Wissen erneut in einen Oligomerkontext zu bringen.

#### **4.1.6. Multibody Variabilitätsanalyse zeigt bimodale Verteilung**

Als Alternative zum klassischen fokussierten Refinement wurde eine multibody Variabilitätsanalyse durchgeführt. Hierbei wurden die Sip1-Dimere als Einzelkörper definiert und fokussiert rekonstruiert. Zudem wurde die Lage dieser Einzelkörper im Oligomerkontext mittels Hauptkomponentenanalyse untersucht. Hierbei konnte eine bimodale Verteilung der Lage des Dimers im ersten Eigenvektor gezeigt werden. Die Rekonstruktion des Oligomers unter Anwendung der ermittelten Eigenwerte ergibt eine Sequenz von Rekonstruktionen, die die Bewegung zwischen beiden Zuständen der bimodalen Verteilung zeigt. Die Verbindung der Speichen in diesen Rekonstruktionen weist auch in diesem Fall unterschiedlich hohe Ansatzpunkte relativ zur ACD auf und bestätigt somit



die Beobachtung aus der asymmetrischen Klassifizierung. Da die multibody-Variabilitätsanalyse jedoch symmetrische Rekonstruktionen erzeugt, konnten die anderen Informationen der asymmetrischen Klassifizierung nicht verifiziert werden.

#### **4.1.7. Vielfalt der apikalen Verbindungen zeigen „domain-swap“**

Aufgrund der Ergebnisse der asymmetrischen Klassifizierung und der Variabilitätsanalyse lässt sich auch ohne hochaufgelöste Termini sagen, dass neben der bekannten Funktion der CTR, benachbarte Speichen zu verbinden, eine vergleichbare Funktion der NTR vermutet wird. Anhand der erstellten Rekonstruktionen werden folgende Verbindungen postuliert:

- Apikaler CTR „domain-swap“, der wie in der Literatur beschrieben zur Oligomerformation beiträgt (Fleckenstein et al. 2015). Zudem ist bekannt, dass diese Verbindung transient und flexibel ist.
- Apikaler CTR „non-domain-swap“, wobei die CTR hierbei in das Zentrum des Oligomers ragt. Hierbei ist keine stabile Konformation oder Bindung der CTR bekannt, wodurch die Rekonstruktion der Struktur in diesem Bereich nur schwer möglich ist.
- Apikaler NTR „domain-swap“, der ähnlich der CTR die Möglichkeit besitzt, benachbarte Speichen zu verbinden und im Folgenden diskutiert wird.
- Apikaler NTR „non-domain-swap“, mit einer nicht aufgelösten Struktur der NTR. Die NTR ragt hierbei ebenfalls in Richtung des Zentrums, wo eine mögliche Interaktion mit den NTR (bzw. CTR) anderer Monomere möglich scheint. Aufgrund der amphipathischen Helix, die für diesen Bereich prognostiziert wird, ist zudem ein Verlauf an der Proteinoberfläche im inneren des Oligomers denkbar.

#### **4.1.8. N-terminales I-x-I-Motiv**

In der Literatur werden N-terminale I-x-I Motive und die Bindung in die  $\beta 4/\beta 8$  Furche beschrieben (Stamler et al. 2005, Sluchanko et al. 2017). Die Analyse der Primärsequenz der NTR von Sip1 zeigt bei Position 38 ein I-x-I Motiv mit der Sequenz I-V-P, von dem angenommen wird, dass es die, in den Rekonstruktionen beobachtete, Bindung der NTR an die  $\beta 4/\beta 8$  Furche der Nachbarspeiche bilden kann. Zudem ist die Entfernung des N-terminalen I-x-I Motivs von der ACD mit 11 Aminosäuren nur eine Aminosäure länger als die Entfernung des C-terminalen I-x-I von der ACD, wodurch sich die gleichbleibende Verbindungslänge beider Konformationen erklären lässt. Bei Betrachtung der

Hydrophobizität der Aminosäurereste beider Termini fällt auf, dass beide Ketten vorwiegend polare Reste beherbergen. Im Bereich zwischen ACD und I-x-I besitzt die NTR zwei negative Ladungen während die CTR hier zwei positive Ladungen vorweist. Auf der, der ACD abgewandten Seite des I-x-I Motivs lassen sich die nächsten 11 Aminosäuren beider Sequenzen bis auf eine Lücke in der NTR hinsichtlich ihrer Hydrophobizität alignieren. Zusammenfassend deuten das Vorhandensein der I-V-P Sequenz in der NTR, deren polare Umgebung und die ähnliche Länge des Linkers darauf hin, dass Sip1 ebenfalls die Möglichkeit besitzt, die  $\beta 4/\beta 8$  Furche benachbarter Speichen über die NTR zu verbinden. Diese Schlussfolgerung bestätigt zudem die, in den asymmetrischen Rekonstruktionen, beobachtete N-terminale Verbindung.

#### **4.1.9. NTR-Strukturvorhersage**

Um die N-terminale Verbindung näher zu charakterisieren wurde eine Strukturvorhersage der NTR durchgeführt. Hierzu wurden helikale Bereiche in der NTR durch 13 Strukturvorhersagealgorithmen parallel bestimmt. Aus diesen Ergebnisse wurden anschließend eine Helixwahrscheinlichkeit für die Aminosäurereste der NTR berechnet. Als vorhergesagte Helix wird in dieser Arbeit der Bereich angesehen, der durchgehend über 50 % Helixwahrscheinlichkeit vorweist. Somit prognostizieren wir eine Helix in der NTR zwischen G13 und N34. Das helix wheel Diagramm der vorhergesagten Helix zeigt zudem, dass diese Helix amphipatisch ist. Eine amphipatische Helix am Anfang der NTR erlaubt sowohl eine Interaktion mit der Oligomeroberfläche, als auch mit der wässrigen Umgebung, Hierdurch wird die These, dass ein apikaler NTR-domain-swap möglich ist, untermauert. Das hierfür nötige I-x-I-Motiv befindet sich an Position 38-40 und somit in der Primärsequenz hinter der amphipatischen Helix, wodurch die Bindung des I-x-I Motivs an die  $\beta 4/\beta 8$  Furche nicht beeinträchtigt wird.

#### **4.1.10. Prolin als möglicher konformationeller Schalter innerhalb der NTR**

Da die Helix an Position 23 ein Prolin aufweist, stellt sich die Frage inwiefern das die Helix an dieser Stelle beeinflusst:

- Durch die Abwesenheit eines Wasserstoffatoms in der Peptidbindung kann sich Prolin nicht an den Wasserstoffbrückenbindungen der Helix beteiligen. Somit wäre eine Möglichkeit, dass die Helix an dieser Stelle unterbrochen ist.
- Allerdings befindet sich P23 an der überwiegend polaren Seite der amphipatischen Helix. In der Literatur wird beschrieben, dass die Wasserstoffbrückenbindungen hierbei durch das umgebende Wasser vermittelt werden können. Dabei weist die Helix einen Knick auf, ist jedoch nicht unterbrochen (Woolfson & Williams 1990). In diesem Fall kommt den Aminosäuren an den Positionen -3

und +4 relativ zum Prolin eine besondere Rolle zu, da diese Reste ober- und unterhalb des Prolins liegen und für die Stabilisierung der Sekundärstruktur von Bedeutung sind. In Sip1 besitzen sowohl D20 als auch Q27 die Möglichkeit H-Brücken auszubilden.

Eine solche Helix könnte wiederum für NTRs, die in das Zentrum des Oligomers ragen, von Bedeutung sein. Neben der Möglichkeit über hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen in Kontakt zu treten, wurde in *S. solfataricus* gezeigt, dass über die Konformationsänderung der N-terminalen Helix die Chaperonaktivität von Hsp14.1 reguliert wird. Dabei wird durch Temperaturerhöhung die hydrophobe Wechselwirkung zwischen L16 und F20 verstärkt, was zu einem Bruch der Helix führt. Im weiteren Verlauf können nun hydrophobe Regionen der amphipathischen Helix interagieren und eine L-förmige bzw. Haarnadelstruktur bilden (Liu et al. 2015). Im Fall von Sip1 liegt möglicherweise ebenso eine amphipathische Helix in der NTR vor. Allerdings kann hier der Bruch der Helix durch Destabilisierung der Wasserstoffbrücken von D20 und Q27 hervorgerufen werden. Protonierung von D20 durch absenken des pH-Werts würde die Fähigkeit H-Brücken auszubilden vermindern. Q27 hingegen hat die Möglichkeit eine H-Brücke mit S30 zu bilden. In direkter Nachbarschaft beider Reste innerhalb der Helix befindet sich H29 welches ebenso als pH-Schalter denkbar ist. P23 könnte anschließend als Helixbrecher fungieren und eine Konformationsänderung der Helix verursachen. Wie in Hsp14.1 könnten dann hydrophobe Bereiche der amphipathischen Helix im Kontakt treten und die Konformationsänderung verstärken.

#### **4.1.11. Histidin 144 hat Einfluss auf Oligomergröße**

Die pH-Abhängigkeit der Sip1 Aktivität liegt im Bereich des isoelektrischen Punkts von Histidin. Daher wurden neben dem eben erwähnten H29 zusätzlich H139 und H144 in der CTR untersucht. H144 zeigte hierbei die Besonderheit, dass die für sHsps typische Verkleinerung der Oligomere bei Aktivierung nicht vorlag. Stattdessen zeigt die Mutante, eine große Heterogenität hinsichtlich der Oligomergröße während die Chaperonaktivität dem des Wildtyps entspricht. Die Mutation von Histidin 144 zu Alanin führt somit zur Entkopplung von Chaperonaktivität und Oligomergröße. Die alleinige Freisetzung kleiner Sip1-Spezies scheint somit nicht für die Erhöhung der Chaperonaktivität ausreichend zu sein. Da die Chaperonaktivität durch die Mutation von H144 jedoch nicht beeinflusst wurde, stellt dieses Histidin ebenfalls keinen pH-Schalter für die Aktivierung dar.

## 4.2. Hsp17

### 4.2.1. Unterschiede in der Chaperonreaktion bei verschiedenen Substratproteinen

Die meisten sHsps bilden lösliche Komplexe bei substöchiometrischer Substratkonzentration und koaggregieren zusammen mit dem Substrat, wenn es im Überschuss vorliegt (Jakob et al. 1993, Haslbeck et al. 2005b). Die Chaperonfunktion von Hsp17 weist die Besonderheit auf, dass je nach vorliegendem Substratprotein entweder die Bildung löslicher Komplexe oder Koaggregation beobachtet werden kann (Iburg et al. 2020). Die Komplexbildung konnte in dieser Arbeit bei CS als Substrat beobachtet werden, während Koaggregation bei MDH auftrat. Die Verwendung von Insulin als Substrat führte zu beiden Beobachtungen, abhängig von Substratkonzentration und Temperatur. Es konnte gezeigt werden, dass bei niedriger Hsp17 Konzentration globuläre Komplexe geformt werden, während bei hoher Hsp17 Konzentration Aggregate vorlagen. Zudem fiel der Anstieg der Aggregatgröße bei höherer Hsp17 Konzentration geringer aus. Neben der bereits beschriebenen Abhängigkeit vom Substrat gibt es also noch weitere Faktoren, die die Art der Chaperonreaktion beeinflussen.

### 4.2.2. NTR ist wichtig für Oligomerisierung

Die NTR ist essentiell für die Oligomerformation, da in Proben von Hsp17 $\Delta$ NTR keine Oligomere auftraten. Diese Beobachtung wird durch SEC-HPLC und „thermal stability assays“ mit einem Stabilitätsunterschied von 8,5 °C bestätigt (von A. Strauch durchgeführt). Für die NTRs von Hsp17, die im Inneren des Oligomers liegen, wird postuliert, dass sie durch Interaktion mit anderen Monomeren die Oligomerbildung begünstigen. In der Literatur wird zudem für weitere sHsps ein Beitrag der NTRs zur Oligomerstabilität beschrieben (Moutaoufik et al. 2017). Die Ergebnisse der Crosslinkingexperimente verifizieren die räumliche Nähe der NTRs im inneren des Oligomers.

### 4.2.3. Hsp17 bildet tetrahedrale Oligomere

Die Analyse der Eigenbilder bestätigt das Vorliegen einer Tetraedersymmetrie. Dabei bildet Hsp17 die für sHsps typischen Oligomere. Wie bereits in der Literatur beschrieben bildet Hsp17 24-mere (Zhang et al. 2015, Iburg et al. 2020), jedoch konnten die ebenfalls beschriebenen supermolekularen Assemblies in dieser Arbeit nicht verifiziert werden (Zhang et al. 2015).

### 4.2.4. Symmetrische Kryo-EM Rekonstruktion mit lokaler Auflösung

In dieser Arbeit konnte eine Rekonstruktion berechnet werden, die einen besseren Einblick in die Struktur von Hsp17 erlaubt, als die publizierte Rekonstruktion (Zhang et al.

2015). Im Bereich der ACD konnten die  $\beta$ -Faltblätter eindeutig rekonstruiert werden. In diesem Bereich liegt aufgrund der hohen Rigidität auch die höchste Auflösung (besser als 5 Å) der Rekonstruktion vor. Aufgrund der höheren Flexibilität ist die lokale Auflösung im Zentrum des Oligomers deutlich geringer (über 7 Å). Dennoch lassen sich im Zentrum Bereiche identifizieren, die mit den NTRs der luminalen Monomere korrelieren. Bereiche der Rekonstruktion, in denen die Verbindungen zwischen den Hsp17 Dimeren liegen, sind ebenfalls schlechter aufgelöst als die ACD, was auf eine hohe Dynamik der Verbindung hinweist.

#### **4.2.5. Hsp17 liegt im „metazoan fold“ vor**

Die hohe Auflösung der ACD ermöglicht ein eindeutiges Fitting der Struktur in diesem Bereich. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Hsp17 über den „metazoan fold“ dimerisiert und nicht mittels des bakteriellen „non-metazoan fold“ wie in der Literatur beschrieben (Zhang et al. 2015).

#### **4.2.6. Vergleich von Hsp17 mit anderen sHsps**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hsp17 nur das 12,6 nm große, tetrahedrale 24-mer bildet. Das, ebenfalls aus *C. elegans* stammende Sip1 bildet hingegen, wie viele andere gut untersuchte sHsps, ein Ensemble von interkonvertierenden Oligomeren unterschiedlicher Dihedralsymmetrie (Fleckenstein et al. 2015). Die ACDs beider sHsps dimerisieren via des „metazoan fold“ und bilden höhere Oligomere durch Verknüpfung der Dimere über C- und N-terminalen Verbindungen. Die CTRs auf beiden Seiten des Dimers bilden dabei unterschiedliche Verbindungen. In Sip1 wird hierbei zwischen äquatorialen CTRs, die zwei Dimere zu einer Speiche des Oligomers verknüpfen, und apikalen CTRs, die diese Speichen untereinander verbinden, unterschieden (Fleckenstein et al. 2015). In Hsp17 wird hierbei zwischen den beiden Orientierungen der C-terminalen Verbindung (luminal und superficial) unterschieden.

Im Menschen gibt es ein vergleichbares Paar sHsps mit  $\alpha$ A und  $\alpha$ B-Kristallin, wobei  $\alpha$ A-Kristallin drei bis fünffach-dihedralsymmetrische Oligomere ähnlich zu Sip1 bildet (Kaiser et al. 2019).  $\alpha$ B-Kristallin bildet hingegen tetrahedrale Oligomere, vergleichbar mit Hsp17 (Braun et al. 2011), wobei für  $\alpha$ B-Kristallin auch höhere Oligomerstrukturen bekannt sind.

#### **4.2.7. NTRs von Hsp17 sind in zwei Gruppen organisiert**

Aufgrund der hohen Flexibilität können NTRs von sHsps oft nicht aufgelöst werden (Hanazono et al. 2013). Für Hsp14.1 aus *S. solfataricus* konnte gezeigt werden, dass die NTRs im Inneren der Struktur liegen (Liu et al. 2015). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass bei Hsp17 jeweils zwölf NTRs nach innen und nach außen zeigen. Die NTRs auf

der Außenseite des Oligomers konnten aufgrund ihrer Flexibilität nicht rekonstruiert werden, jedoch lassen Crosslinkingexperimente auf eine große Reichweite der flexiblen NTRs schließen. Im Inneren der Rekonstruktion konnte ein Bereich identifiziert werden, der durch NTRs mehrerer luminaler Monomere gebildet wird. Während die superfacialen NTRs, aufgrund ihrer exponierten Lage, mit Substratproteinen interagieren können, stabilisieren die luminalen NTRs durch Interaktion untereinander das Oligomer.

#### **4.2.8. Duale Funktion der NTRs**

Die Doppelfunktion der NTR im Kontext eines Oligomers unterscheidet Hsp17 von den in der Literatur beschriebenen sHsps (Hanazono et al. 2013, Fleckenstein et al. 2015, Liu et al. 2015). Gewöhnlich liegen sHsps als Ensemble von großen Oligomeren vor, die als Speicherform dienen und über N-terminale Interaktionen reguliert werden. Zudem liegen kleine Oligomere als aktive Spezies vor, wobei die NTRs mit den Substratproteinen interagieren (Rajagopal et al. 2015, Baughman et al. 2020). Hierzu müssen die großen Oligomere dissoziieren um die Interaktionen der NTRs zwischen den Untereinheiten zu lösen und für Substratinteraktionen zur Verfügung zu stehen. Für Hsp17 konnte keine Dissoziation beobachtet werden. Stattdessen konnte nur das 24mer identifiziert werden, das zudem nicht dissoziieren muss, um als aktives Chaperon zu fungieren. Die NTRs werden entsprechend der Lage ihrer Monomere funktionell in zwei Gruppen eingeteilt: luminalen NTRs, die zur Oligomerformation und –stabilisierung beitragen, sowie superfaciale NTRs die für Substrate zugänglich sind. Daraus ergibt sich eine permanente Chaperonfunktion, ohne dass eine Aktivierung durch Dissoziation nötig wäre. Trotz der Tatsache, dass in dieser Arbeit keine Dissoziation von Hsp17 festgestellt werden konnte, lässt sich ein solcher Mechanismus bei entsprechenden Bedingungen nicht ausschließen.

#### **4.2.9. Asymmetrische Rekonstruktion zeigt „domain-swap“ der CTRs**

Die symmetrische Rekonstruktion zeigt an den Ecken des Oligomers je eine Verbindung zu den beteiligten Monomeren. Da die symmetrische Rekonstruktion eine Mittelung über das konformationelle Spektrum darstellt, wird die damit verbundene Dynamik der C-terminalen Verbindung nicht aufgelöst. Durch asymmetrische Rekonstruktion konnte gezeigt werden, dass die CTR keine starre Verbindung bildet, sondern hochdynamisch ist. In dieser Arbeit zeigt der Großteil der Oligomerecken eine Dreifachverbindung, während Zweifach- und Einfachverbindungen weniger häufig vorliegen. Dies lässt auf eine starke Stabilisierung des Oligomers schließen. Da Hsp17 aufgrund der teilweise außenliegenden NTRs auch als 24mer als Chaperon aktiv ist, stellt dies keinen Nachteil für die Chaperonfunktion dar. Zugleich könnte hiermit eine Regulationsmöglichkeit der Chaperon-

aktivität gegeben sein. Destabilisierung der C-terminalen Verbindungen könnte zu Dissoziation führen und weitere NTRs aus dem Inneren des Oligomers freisetzen und damit die Aktivität des Chaperons modulieren.





## 5. Literaturverzeichnis

- Abbe, E.: Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv f. mikrosk. Anatomie* **9**(1), 413–468 (1873). doi: 10.1007/BF02956173
- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H.: PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**(Pt 2), 213–221 (2010). doi: 10.1107/S09074444909052925
- Adobe Inc.: Adobe Illustrator; Adobe Inc. (2012)
- Ahn, C.C.: Transmission electron energy loss spectrometry in materials science and the EELS atlas, 2. Aufl.; Wiley, Weinheim, Chichester (2004)
- Aquilina, J.A., Benesch, J.L.P., Ding, L.L., Yaron, O., Horwitz, J., Robinson, C.V.: Phosphorylation of alphaB-crystallin alters chaperone function through loss of dimeric substructure. *The Journal of biological chemistry* **279**(27), 28675–28680 (2004). doi: 10.1074/jbc.M403348200
- Arrigo, A.-P.: Human small heat shock proteins: protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: an update. *FEBS letters* **587**(13), 1959–1969 (2013). doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.011
- Arrigo, A.-P., Gibert, B.: Protein interactomes of three stress inducible small heat shock proteins: HspB1, HspB5 and HspB8. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* **29**(5), 409–422 (2013). doi: 10.3109/02656736.2013.792956
- Arrigo, A.-P., Gibert, B.: HspB1, HspB5 and HspB4 in Human Cancers: Potent Oncogenic Role of Some of Their Client Proteins. *Cancers* **6**(1), 333–365 (2014). doi: 10.3390/cancers6010333
- Ashok Kumar, T.: CFSSP: Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server (2013). doi: 10.5281/ZENODO.50733
- Bagnéris, C., Bateman, O.A., Naylor, C.E., Cronin, N., Boelens, W.C., Keep, N.H., Slingsby, C.: Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20. *Journal of molecular biology* **392**(5), 1242–1252 (2009). doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.069
- Baker, L.A., Smith, E.A., Bueler, S.A., Rubinstein, J.L.: The resolution dependence of optimal exposures in liquid nitrogen temperature electron cryomicroscopy of catalase crystals. *Journal of structural biology* **169**(3), 431–437 (2010). doi: 10.1016/j.jsb.2009.11.014
- Bakthisaran, R., Tangirala, R., Rao, C.M.: Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et biophysica acta* **1854**(4), 291–319 (2015). doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.019

- Baldwin, A.J., Hilton, G.R., Lioe, H., Bagn ris, C., Benesch, J.L.P., Kay, L.E.: Quaternary dynamics of  $\alpha$ B-crystallin as a direct consequence of localised tertiary fluctuations in the C-terminus. *Journal of molecular biology* **413**(2), 310–320 (2011). doi: 10.1016/j.jmb.2011.07.017
- Basha, E., Friedrich, K.L., Vierling, E.: The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **281**(52), 39943–39952 (2006). doi: 10.1074/jbc.M607677200
- Basha, E., Lee, G.J., Breci, L.A., Hausrath, A.C., Buan, N.R., Giese, K.C., Vierling, E.: The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *The Journal of biological chemistry* **279**(9), 7566–7575 (2004). doi: 10.1074/jbc.M310684200
- Basha, E., O'Neill, H., Vierling, E.: Small heat shock proteins and  $\alpha$ -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends in biochemical sciences* **37**(3), 106–117 (2012). doi: 10.1016/j.tibs.2011.11.005
- Bäuerlein, F.J.B.: In Situ Architecture and Cellular Interactions of PolyQ Inclusions. Dissertation, Technische Universität München (2018)
- Baughman, H.E.R., Pham, T.-H.T., Adams, C.S., Nath, A., Klevit, R.E.: Release of a disordered domain enhances HspB1 chaperone activity toward tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**(6), 2923–2929 (2020). doi: 10.1073/pnas.1915099117
- Bayes, T., Price, R.: LII. An essay towards solving a problem in the doctrine of chances. By the late Rev. Mr. Bayes, F. R. S. communicated by Mr. Price, in a letter to John Canton, A. M. F. R. S. *Phil. Trans. R. Soc.* **53**, 370–418 (1763). doi: 10.1098/rstl.1763.0053
- Bepperling, A., Alte, F., Kriehuber, T., Braun, N., Weinkauff, S., Groll, M., Haslbeck, M., Buchner, J.: Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(50), 20407–20412 (2012). doi: 10.1073/pnas.1209565109
- Bernhofer, M., Dallago, C., Karl, T., Satagopam, V., Heinzinger, M., Littmann, M., Olenyi, T., Qiu, J., Sch tze, K., Yachdav, G., Ashkenazy, H., Ben-Tal, N., Bromberg, Y., Goldberg, T., Kajan, L., O'Donoghue, S., Sander, C., Schafferhans, A., Schlessinger, A., Vriend, G., Mirdita, M., Gawron, P., Gu, W., Jarosz, Y., Trefois, C., Steinegger, M., Schneider, R., Rost, B.: PredictProtein – Predicting Protein Structure and Function for 29 Years (2021)
- Bottou, L.: Large-Scale Machine Learning with Stochastic Gradient Descent. In: Lechevallier, Y., Saporta, G. (Hrsg.) *Proceedings of COMPSTAT'2010: 19th International Conference on Computational Statistics : Pairs-France, August 22-27, 2010 : keynote, invited and contributed papers*, S. 177–186. Physica-Verlag, Heidelberg (2010)
- Braun, N., Zacharias, M., Peschek, J., Kastenmüller, A., Zou, J., Hanzlik, M., Haslbeck, M., Rappsilber, J., Buchner, J., Weinkauff, S.: Multiple molecular architectures of the

- eye lens chaperone  $\alpha$ B-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(51), 20491–20496 (2011). doi: 10.1073/pnas.1111014108
- Brilot, A.F., Chen, J.Z., Cheng, A., Pan, J., Harrison, S.C., Potter, C.S., Carragher, B., Henderson, R., Grigorieff, N.: Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film. *Journal of structural biology* **177**(3), 630–637 (2012). doi: 10.1016/j.jsb.2012.02.003
- Brüggeller, P., Mayer, E.: Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions. *Nature* **288**(5791), 569–571 (1980). doi: 10.1038/288569a0
- Bukach, O.V., Glukhova, A.E., Seit-Nebi, A.S., Gusev, N.B.: Heterooligomeric complexes formed by human small heat shock proteins HspB1 (Hsp27) and HspB6 (Hsp20). *Biochimica et biophysica acta* **1794**(3), 486–495 (2009). doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.010
- Calafiore, G., El Ghaoui, L.: *Optimization models*; Cambridge University Press, Cambridge (2014)
- Campbell, I.D.: Timeline: the march of structural biology. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**(5), 377–381 (2002). doi: 10.1038/nrm800
- Candido, E.P.M.: The small heat shock proteins of the nematode *Caenorhabditis elegans*: structure, regulation and biology. *Progress in molecular and subcellular biology* **28**, 61–78 (2002). doi: 10.1007/978-3-642-56348-5\_4
- Carver, J.A., Aquilina, J., Truscott, R.J., Ralston, G.B.: Identification by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of flexible C-terminal extensions in bovine lens  $\alpha$ -crystallin. *FEBS letters* **311**(2), 143–149 (1992). doi: 10.1016/0014-5793(92)81386-Z
- Cashikar, A.G., Duennwald, M., Lindquist, S.L.: A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *The Journal of biological chemistry* **280**(25), 23869–23875 (2005). doi: 10.1074/jbc.M502854200
- Caspers, G.J., Leunissen, J.A., Jong, W.W. de: The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *Journal of molecular evolution* **40**(3), 238–248 (1995). doi: 10.1007/BF00163229
- Cheng, G., Basha, E., Wysocki, V.H., Vierling, E.: Insights into small heat shock protein and substrate structure during chaperone action derived from hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* **283**(39), 26634–26642 (2008). doi: 10.1074/jbc.M802946200
- Ciocca, D.R., Calderwood, S.K.: Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell stress & chaperones* **10**(2), 86–103 (2005). doi: 10.1379/csc-99r.1
- Clark, A.R., Naylor, C.E., Bagn ris, C., Keep, N.H., Slingsby, C.: Crystal structure of R120G disease mutant of human  $\alpha$ B-crystallin domain dimer shows closure of a groove. *Journal of molecular biology* **408**(1), 118–134 (2011). doi: 10.1016/j.jmb.2011.02.020

- Clark, A.R., Vree Egberts, W., Kondrat, F.D.L., Hilton, G.R., Ray, N.J., Cole, A.R., Carver, J.A., Benesch, J.L.P., Keep, N.H., Boelens, W.C., Slingsby, C.: Terminal Regions Confer Plasticity to the Tetrameric Assembly of Human HspB2 and HspB3. *Journal of molecular biology* **430**(18 Pt B), 3297–3310 (2018). doi: 10.1016/j.jmb.2018.06.047
- Cole, C., Barber, J.D., Barton, G.J.: The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic acids research* **36**(Web Server issue), W197-201 (2008). doi: 10.1093/nar/gkn238
- Crowther, R.A., DeRosier, D.J., Klug, A.: The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. *Proc. R. Soc. Lond. A* **317**(1530), 319–340 (1970). doi: 10.1098/rspa.1970.0119
- Cuff, J.A., Barton, G.J.: Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins* **40**(3), 502–511 (2000). doi: 10.1002/1097-0134(20000815)40:3<502:aid-prot170>3.0.co;2-q
- Danev, R., Baumeister, W.: Cryo-EM single particle analysis with the Volta phase plate. *eLife* **5** (2016). doi: 10.7554/eLife.13046
- Danev, R., Buijsse, B., Khoshouei, M., Plitzko, J.M., Baumeister, W.: Volta potential phase plate for in-focus phase contrast transmission electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**(44), 15635–15640 (2014). doi: 10.1073/pnas.1418377111
- Danev, R., Tegunov, D., Baumeister, W.: Using the Volta phase plate with defocus for cryo-EM single particle analysis. *eLife* **6** (2017). doi: 10.7554/eLife.23006
- de Broglie, L.: *Recherches sur la Théorie des Quanta*. Dissertation (1924)
- Debenedetti, P.G.: Supercooled and glassy water. *J. Phys.: Condens. Matter* **15**(45), R1669-R1726 (2003). doi: 10.1088/0953-8984/15/45/R01
- Delbecq, S.P., Jehle, S., Klevit, R.: Binding determinants of the small heat shock protein,  $\alpha$ B-crystallin: recognition of the 'IxI' motif. *The EMBO Journal* **31**(24), 4587–4594 (2012). doi: 10.1038/emboj.2012.318
- Delbecq, S.P., Klevit, R.E.: One size does not fit all: the oligomeric states of  $\alpha$ B crystallin. *FEBS letters* **587**(8), 1073–1080 (2013). doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.021
- Dempster, A.P., Laird, N.M., Rubin, D.B.: Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* **39**(1), 1–22 (1977)
- Dubochet, J., McDowell, A.W.: VITRIFICATION OF PURE WATER FOR ELECTRON MICROSCOPY. *Journal of Microscopy* **124**(3), 3–4 (1981). doi: 10.1111/j.1365-2818.1981.tb02483.x
- Ehrensperger, M., Gräber, S., Gaestel, M., Buchner, J.: Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO Journal* **16**(2), 221–229 (1997). doi: 10.1093/emboj/16.2.221

- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K.: Features and development of Coot. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**(Pt 4), 486–501 (2010). doi: 10.1107/S0907444910007493
- Ezemaduka, A.N., Wang, Y., Li, X.: Expression of CeHSP17 Protein in Response to Heat Shock and Heavy Metal Ions. *Journal of Nematology* **49**(3), 334–340 (2017)
- Fleckenstein, T., Kastenmüller, A., Stein, M.L., Peters, C., Daake, M., Krause, M., Weinfurter, D., Haslbeck, M., Weinkauff, S., Groll, M., Buchner, J.: The Chaperone Activity of the Developmental Small Heat Shock Protein Sip1 Is Regulated by pH-Dependent Conformational Changes. *Molecular cell* **58**(6), 1067–1078 (2015). doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.019
- Frank, J.: Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies. 342 S.; Academic Press, San Diego (1996)
- Fu, X., Shi, X., Yan, L., Zhang, H., Chang, Z.: In vivo substrate diversity and preference of small heat shock protein IbpB as revealed by using a genetically incorporated photo-cross-linker. *The Journal of biological chemistry* **288**(44), 31646–31654 (2013). doi: 10.1074/jbc.M113.501817
- Gilbert, E.N., Riordan, J.: Symmetry types of periodic sequences. *Illinois J. Math.* **5**(4) (1961). doi: 10.1215/ijm/1255631587
- Grigorieff, N.: FREALIGN: An Exploratory Tool for Single-Particle Cryo-EM. *Methods in enzymology* **579**, 191–226 (2016). doi: 10.1016/bs.mie.2016.04.013
- Hanazono, Y., Takeda, K., Oka, T., Abe, T., Tomonari, T., Akiyama, N., Aikawa, Y., Yohda, M., Miki, K.: Nonequivalence observed for the 16-meric structure of a small heat shock protein, SpHsp16.0, from *Schizosaccharomyces pombe*. *Structure (London, England : 1993)* **21**(2), 220–228 (2013). doi: 10.1016/j.str.2012.11.015
- Hanßen, K.J.: The optical Transfer Theory of the Electron Microscope; Fundamental Principles and Applications. *Advances in Optical and Electron Microscopy, Bd. 4* (1971)
- Haslbeck, M.: sHsps and their role in the chaperone network. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **59**(10), 1649–1657 (2002). doi: 10.1007/pl00012492
- Haslbeck, M., Braun, N., Stromer, T., Richter, B., Model, N., Weinkauff, S., Buchner, J.: Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* **23**(3), 638–649 (2004). doi: 10.1038/sj.emboj.7600080
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D., Buchner, J.: Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature structural & molecular biology* **12**(10), 842–846 (2005a). doi: 10.1038/nsmb993
- Haslbeck, M., Miess, A., Stromer, T., Walter, S., Buchner, J.: Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *The Journal of biological chemistry* **280**(25), 23861–23868 (2005b). doi: 10.1074/jbc.M502697200

- Haslbeck, M., Vierling, E.: A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of molecular biology* **427**(7), 1537–1548 (2015). doi: 10.1016/j.jmb.2015.02.002
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H.E., Chen, S., Saibil, H.R., Buchner, J.: Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *The EMBO Journal* **18**(23), 6744–6751 (1999). doi: 10.1093/emboj/18.23.6744
- Haslbeck, M., Weinkauff, S., Buchner, J.: Regulation of the Chaperone Function of Small Hsps. In: Tanguay, R.M., Hightower, L. (Hrsg.) *The big book on small heat shock proteins. Heat shock proteins, volume 8*, S. 155–178. Springer, Cham (2015)
- Haslbeck, M., Weinkauff, S., Buchner, J.: Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity. *The Journal of biological chemistry* **294**(6), 2121–2132 (2019). doi: 10.1074/jbc.REV118.002809
- Hecht, E.: *Optics*; Pearson, Boston (2017)
- Hsu, A.-L., Murphy, C.T., Kenyon, C.: Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science (New York, N.Y.)* **300**(5622), 1142–1145 (2003). doi: 10.1126/science.1083701
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K.: VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **14**(1), 33–38 (1996). doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
- Iburg, M., Puchkov, D., Rosas-Brugada, I.U., Bergemann, L., Rieprecht, U., Kirstein, J.: The noncanonical small heat shock protein HSP-17 from *Caenorhabditis elegans* is a selective protein aggregase. *The Journal of biological chemistry* **295**(10), 3064–3079 (2020). doi: 10.1074/jbc.RA119.011185
- Ito, H., Okamoto, K., Nakayama, H., Isobe, T., Kato, K.: Phosphorylation of alphaB-crystallin in response to various types of stress. *The Journal of biological chemistry* **272**(47), 29934–29941 (1997). doi: 10.1074/jbc.272.47.29934
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., Buchner, J.: Small heat shock proteins are molecular chaperones. *The Journal of biological chemistry* **268**(3), 1517–1520 (1993)
- Jehle, S., Vollmar, B.S., Bardiaux, B., Dove, K.K., Rajagopal, P., Gonen, T., Oschkinat, H., Klevit, R.E.: N-terminal domain of alphaB-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(16), 6409–6414 (2011). doi: 10.1073/pnas.1014656108
- Jong, W.W. de, Caspers, G.-J., Leunissen, J.A.: Genealogy of the  $\alpha$ -crystallin—small heat-shock protein superfamily. *International Journal of Biological Macromolecules* **22**(3-4), 151–162 (1998). doi: 10.1016/S0141-8130(98)00013-0
- Jovcevski, B., Andrew Aquilina, J., Benesch, J.L.P., Ecroyd, H.: The influence of the N-terminal region proximal to the core domain on the assembly and chaperone activity of  $\alpha$ B-crystallin. *Cell stress & chaperones* **23**(5), 827–836 (2018). doi: 10.1007/s12192-018-0889-y

- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D.: Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**(7873), 583–589 (2021). doi: 10.1038/s41586-021-03819-2
- Kaiser, C.J.O., Peters, C., Schmid, P.W.N., Stavropoulou, M., Zou, J., Dahiya, V., Mymrikov, E.V., Rockel, B., Asami, S., Haslbeck, M., Rappsilber, J., Reif, B., Zacharias, M., Buchner, J., Weinkauff, S.: The structure and oxidation of the eye lens chaperone  $\alpha$ A-crystallin. *Nature structural & molecular biology* **26**(12), 1141–1150 (2019). doi: 10.1038/s41594-019-0332-9
- Kampinga, H.H., Garrido, C.: HSPBs: small proteins with big implications in human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**(10), 1706–1710 (2012). doi: 10.1016/j.biocel.2012.06.005
- Kang, S.H., Kang, K.W., Kim, K.-H., Kwon, B., Kim, S.-K., Lee, H.-Y., Kong, S.-Y., Lee, E.S., Jang, S.-G., Yoo, B.C.: Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability. *BMC cancer* **8**, 286 (2008). doi: 10.1186/1471-2407-8-286
- Kappé, G., Leunissen, J.A.M., Jong, W.W. de: Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins. *Progress in molecular and subcellular biology* **28**, 1–17 (2002). doi: 10.1007/978-3-642-56348-5\_1
- Karuppasamy, M., Karimi Nejadasl, F., Vulovic, M., Koster, A.J., Ravelli, R.B.G.: Radiation damage in single-particle cryo-electron microscopy: effects of dose and dose rate. *Journal of synchrotron radiation* **18**(Pt 3), 398–412 (2011). doi: 10.1107/S090904951100820X
- Kikuchi, J., Yasuhara, K.: Transmission Electron Microscopy (TEM). In: Steed, J.W., Gale, P.A. (Hrsg.) *Supramolecular chemistry: From molecules to nanomaterials / editors-in-chief, Jonathan W. Steed, Philip A. Gale*. Wiley, Chichester (2012)
- Kim, K.K., Kim, R., Kim, S.H.: Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**(6693), 595–599 (1998). doi: 10.1038/29106
- Knoll, M., Ruska, E.: Das Elektronenmikroskop. *Z. Physik* **78**(5-6), 318–339 (1932). doi: 10.1007/BF01342199
- Kotel'nikov, V.A.: On the Transmission Capacity of the “Ether” and Wire in Electrocommunications. In: Benedetto, J.J., Ferreira, P.J.S.G. (Hrsg.) *Modern sampling theory: Mathematics and applications*, S. 27–45. Birkhauser, [Place of publication not identified] (2013)
- Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M., Buchner, J.: Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American*

- Societies for Experimental Biology **24**(10), 3633–3642 (2010). doi: 10.1096/fj.10-156992
- Krivanek, O.L., Mooney, P.E.: Applications of slow-scan CCD cameras in transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy* **49**(1-4), 95–108 (1993). doi: 10.1016/0304-3991(93)90216-K
- Kühlbrandt, W.: Biochemistry. The resolution revolution. *Science (New York, N.Y.)* **343**(6178), 1443–1444 (2014). doi: 10.1126/science.1251652
- La Rosa-Trevín, J.M. de, Quintana, A., Del Cano, L., Zaldívar, A., Foche, I., Gutiérrez, J., Gómez-Blanco, J., Burguet-Castell, J., Cuenca-Alba, J., Abrishami, V., Vargas, J., Otón, J., Sharov, G., Vilas, J.L., Navas, J., Conesa, P., Kazemi, M., Marabini, R., Sorzano, C.O.S., Carazo, J.M.: Scipion: A software framework toward integration, reproducibility and validation in 3D electron microscopy. *Journal of structural biology* **195**(1), 93–99 (2016). doi: 10.1016/j.jsb.2016.04.010
- Laganowsky, A., Benesch, J.L.P., Landau, M., Ding, L., Sawaya, M.R., Cascio, D., Huang, Q., Robinson, C.V., Horwitz, J., Eisenberg, D.: Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. *Protein science : a publication of the Protein Society* **19**(5), 1031–1043 (2010). doi: 10.1002/pro.380
- Langmore, J.P., Smith, M.F.: Quantitative energy-filtered electron microscopy of biological molecules in ice. *Ultramicroscopy* **46**(1-4), 349–373 (1992). doi: 10.1016/0304-3991(92)90024-E
- Leapman, R.D., Sun, S.: Cryo-electron energy loss spectroscopy: observations on vitrified hydrated specimens and radiation damage. *Ultramicroscopy* **59**(1-4), 71–79 (1995). doi: 10.1016/0304-3991(95)00019-W
- Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R., Vierling, E.: A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *The EMBO Journal* **16**(3), 659–671 (1997). doi: 10.1093/emboj/16.3.659
- Lentze, N., Narberhaus, F.: Detection of oligomerisation and substrate recognition sites of small heat shock proteins by peptide arrays. *Biochemical and biophysical research communications* **325**(2), 401–407 (2004). doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.043
- Levin, M., Hashimshony, T., Wagner, F., Yanai, I.: Developmental milestones punctuate gene expression in the *Caenorhabditis* embryo. *Developmental cell* **22**(5), 1101–1108 (2012). doi: 10.1016/j.devcel.2012.04.004
- Lin, K., Simossis, V.A., Taylor, W.R., Heringa, J.: A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics (Oxford, England)* **21**(2), 152–159 (2005). doi: 10.1093/bioinformatics/bth487
- Linder, B., Jin, Z., Freedman, J.H., Rubin, C.S.: Molecular characterization of a novel, developmentally regulated small embryonic chaperone from *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry* **271**(47), 30158–30166 (1996). doi: 10.1074/jbc.271.47.30158



- Liu, L., Chen, J.-Y., Yang, B., Wang, F.-H., Wang, Y.-H., Yun, C.-H.: Active-State Structures of a Small Heat-Shock Protein Revealed a Molecular Switch for Chaperone Function. *Structure* (London, England : 1993) **23**(11), 2066–2075 (2015). doi: 10.1016/j.str.2015.08.015
- Mastrorade, D.N.: SerialEM: A Program for Automated Tilt Series Acquisition on Tecnai Microscopes Using Prediction of Specimen Position. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* **9**(S02), 1182–1183 (2003). doi: 10.1017/S1431927603445911
- Mastrorade, D.N.: Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *Journal of structural biology* **152**(1), 36–51 (2005). doi: 10.1016/j.jsb.2005.07.007
- McHaourab, H.S., Godar, J.A., Stewart, P.L.: Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry* **48**(18), 3828–3837 (2009). doi: 10.1021/bi900212j
- McMullan, G., Chen, S., Henderson, R., Faruqi, A.R.: Detective quantum efficiency of electron area detectors in electron microscopy. *Ultramicroscopy* **109**(9), 1126–1143 (2009). doi: 10.1016/j.ultramic.2009.04.002
- McMullan, G., Faruqi, A.R., Clare, D., Henderson, R.: Comparison of optimal performance at 300keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy. *Ultramicroscopy* **147**, 156–163 (2014). doi: 10.1016/j.ultramic.2014.08.002
- Meents, A., Gutmann, S., Wagner, A., Schulze-Briese, C.: Origin and temperature dependence of radiation damage in biological samples at cryogenic temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(3), 1094–1099 (2010). doi: 10.1073/pnas.0905481107
- Microsoft Corp.: Microsoft Excel; Microsoft Corp. (2018)
- Milazzo, A.-C., Leblanc, P., Duttweiler, F., Jin, L., Bouwer, J.C., Peltier, S., Ellisman, M., Bieser, F., Matis, H.S., Wieman, H., Denes, P., Kleinfelder, S., Xuong, N.-H.: Active pixel sensor array as a detector for electron microscopy. *Ultramicroscopy* **104**(2), 152–159 (2005). doi: 10.1016/j.ultramic.2005.03.006
- Mochel, M.E., Mochel, J.M.: A CCD imaging and analysis system for the VG HB5 STEM. *Proc. annu. meet. Electron Microsc. Soc. Am.* **44**, 616–617 (1986). doi: 10.1017/S0424820100144528
- Mogk, A., Bukau, B., Kampinga, H.H.: Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. *Molecular cell* **69**(2), 214–226 (2018). doi: 10.1016/j.molcel.2018.01.004
- Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E., Bukau, B.: Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Molecular microbiology* **50**(2), 585–595 (2003a). doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03710.x

- Mogk, A., Schlieker, C., Friedrich, K.L., Schönfeld, H.-J., Vierling, E., Bukau, B.: Re-folding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *The Journal of biological chemistry* **278**(33), 31033–31042 (2003b). doi: 10.1074/jbc.M303587200
- Mól, A.R., Castro, M.S., Fontes, W.: NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections. *bioRxiv*, 416347 (2018). doi: 10.1101/416347
- Moor, H.: Die Gefrier-Fixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie. *Zeitschrift für Zellforschung* **62**(4), 546–580 (1964). doi: 10.1007/BF00338850
- Moutaoufik, M.T., Morrow, G., Finet, S., Tanguay, R.M.: Effect of N-terminal region of nuclear *Drosophila melanogaster* small heat shock protein DmHsp27 on function and quaternary structure. *PloS one* **12**(5), e0177821 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0177821
- Mymrikov, E.V., Daake, M., Richter, B., Haslbeck, M., Buchner, J.: The Chaperone Activity and Substrate Spectrum of Human Small Heat Shock Proteins. *The Journal of biological chemistry* **292**(2), 672–684 (2017). doi: 10.1074/jbc.M116.760413
- Mymrikov, E.V., Haslbeck, M.: Medical implications of understanding the functions of human small heat shock proteins. *Expert review of proteomics* **12**(3), 295–308 (2015). doi: 10.1586/14789450.2015.1039993
- Mymrikov, E.V., Seit-Nebi, A.S., Gusev, N.B.: Heterooligomeric complexes of human small heat shock proteins. *Cell stress & chaperones* **17**(2), 157–169 (2012). doi: 10.1007/s12192-011-0296-0
- Narberhaus, F.: Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR **66**(1), 64-93; table of contents (2002). doi: 10.1128/mmbr.66.1.64-93.2002
- NobelPrize.org (2021) The Nobel Prize in Chemistry 2017. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2017/press-release/>. Zugegriffen: 24. Juni 2021
- Ojha, J., Karmegam, R.V., Masilamoni, J.G., Terry, A.V., Cashikar, A.G.: Behavioral defects in chaperone-deficient Alzheimer's disease model mice. *PloS one* **6**(2), e16550 (2011). doi: 10.1371/journal.pone.0016550
- Oka, T., Futai, M.: Requirement of V-ATPase for ovulation and embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry* **275**(38), 29556–29561 (2000). doi: 10.1074/jbc.M002756200
- OriginLab Corp.: Origin(Pro); OriginLab Corp. (2013)
- Orloff, J.: Handbook of charged particle optics, 2. Aufl.; CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (2009)
- Peschek, J., Braun, N., Rohrberg, J., Back, K.C., Kriehuber, T., Kastenmüller, A., Weinkauff, S., Buchner, J.: Regulated structural transitions unleash the chaperone

- activity of  $\alpha$ B-crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(40), E3780-9 (2013). doi: 10.1073/pnas.1308898110
- Petersen, B., Petersen, T.N., Andersen, P., Nielsen, M., Lundegaard, C.: A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC structural biology* **9**, 51 (2009). doi: 10.1186/1472-6807-9-51
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E.: UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* **25**(13), 1605–1612 (2004). doi: 10.1002/jcc.20084
- Phillips, J.C., Hardy, D.J., Maia, J.D.C., Stone, J.E., Ribeiro, J.V., Bernardi, R.C., Buch, R., Fiorin, G., Hénin, J., Jiang, W., McGreevy, R., Melo, M.C.R., Radak, B.K., Skeel, R.D., Singharoy, A., Wang, Y., Roux, B., Aksimentiev, A., Luthey-Schulten, Z., Kalé, L.V., Schulten, K., Chipot, C., Tajkhorshid, E.: Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *The Journal of chemical physics* **153**(4), 44130 (2020). doi: 10.1063/5.0014475
- Punjani, A., Rubinstein, J.L., Fleet, D.J., Brubaker, M.A.: cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nature methods* **14**(3), 290–296 (2017). doi: 10.1038/nmeth.4169
- Radermacher, M., Wagenknecht, T., Verschoor, A., Frank, J.: Three-dimensional structure of the large ribosomal subunit from *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* **6**(4), 1107–1114 (1987)
- Raghava, G.P.: APSSP2: A combination method for protein secondary structure prediction based on neural network and example based learning. *CASP5 A-132* (2002)
- Rajagopal, P., Tse, E., Borst, A.J., Delbecq, S.P., Shi, L., Southworth, D.R., Klevit, R.E.: A conserved histidine modulates HSPB5 structure to trigger chaperone activity in response to stress-related acidosis. *eLife* **4** (2015). doi: 10.7554/eLife.07304
- Ratajczak, E., Zietkiewicz, S., Liberek, K.: Distinct activities of *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB promote efficient protein disaggregation. *Journal of molecular biology* **386**(1), 178–189 (2009). doi: 10.1016/j.jmb.2008.12.009
- Reimer, L., Kohl, H.: *Transmission electron microscopy: Physics of image formation / L. Reimer, H. Kohl, 5. Aufl. Springer series in optical sciences, Bd. 36; Springer, New York, NY (2008)*
- Rohou, A., Grigorieff, N.: CTFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *Journal of structural biology* **192**(2), 216–221 (2015). doi: 10.1016/j.jsb.2015.08.008
- Rose, H.: Information transfer in transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy* **15**(3), 173–191 (1984). doi: 10.1016/0304-3991(84)90038-X
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y.: I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* **5**(4), 725–738 (2010). doi: 10.1038/nprot.2010.5

- Russo, C.J., Passmore, L.A.: Progress towards an optimal specimen support for electron cryomicroscopy. *Current opinion in structural biology* **37**, 81–89 (2016). doi: 10.1016/j.sbi.2015.12.007
- Sali, A., Blundell, T.L.: Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of molecular biology* **234**(3), 779–815 (1993). doi: 10.1006/jmbi.1993.1626
- Sawada, J.: Generating Bracelets in Constant Amortized Time. *SIAM J. Comput.* **31**(1), 259–268 (2001). doi: 10.1137/S0097539700377037
- Schafer, W.R.: Egg-laying. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1–7 (2005). doi: 10.1895/wormbook.1.38.1
- Scheres, S.H.W.: A Bayesian view on cryo-EM structure determination. *Journal of molecular biology* **415**(2), 406–418 (2012a). doi: 10.1016/j.jmb.2011.11.010
- Scheres, S.H.W.: RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *Journal of structural biology* **180**(3), 519–530 (2012b). doi: 10.1016/j.jsb.2012.09.006
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A.: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* **9**(7), 676–682 (2012). doi: 10.1038/nmeth.2019
- Schofield, R., King, L., Tayal, U., Castellano, I., Stirrup, J., Pontana, F., Earls, J., Nicol, E.: Image reconstruction: Part 1 - understanding filtered back projection, noise and image acquisition. *Journal of cardiovascular computed tomography* **14**(3), 219–225 (2020). doi: 10.1016/j.jcct.2019.04.008
- Shaikh, T.R., Gao, H., Baxter, W.T., Asturias, F.J., Boisset, N., Leith, A., Frank, J.: SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs. *Nature protocols* **3**(12), 1941–1974 (2008). doi: 10.1038/nprot.2008.156
- Siddique, M., Gernhard, S., Koskull-Döring, P. von, Vierling, E., Scharf, K.-D.: The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties. *Cell stress & chaperones* **13**(2), 183–197 (2008). doi: 10.1007/s12192-008-0032-6
- Sluchanko, N.N., Beelen, S., Kulikova, A.A., Weeks, S.D., Antson, A.A., Gusev, N.B., Strelkov, S.V.: Structural Basis for the Interaction of a Human Small Heat Shock Protein with the 14-3-3 Universal Signaling Regulator. *Structure (London, England : 1993)* **25**(2), 305–316 (2017). doi: 10.1016/j.str.2016.12.005
- Sormanni, P., Camilloni, C., Fariselli, P., Vendruscolo, M.: The s2D method: simultaneous sequence-based prediction of the statistical populations of ordered and disordered regions in proteins. *Journal of molecular biology* **427**(4), 982–996 (2015). doi: 10.1016/j.jmb.2014.12.007

- Sorzano, C.O.S., Marabini, R., Velázquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J.R., Scheres, S.H.W., Carazo, J.M., Pascual-Montano, A.: XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *Journal of structural biology* **148**(2), 194–204 (2004). doi: 10.1016/j.jsb.2004.06.006
- Spector, A., Freund, T., Li, L.K., Augusteyn, R.C.: Age-dependent changes in the structure of alpha crystallin. *Investigative ophthalmology* **10**(9), 677–686 (1971)
- Stamler, R., Kappé, G., Boelens, W., Slingsby, C.: Wrapping the alpha-crystallin domain fold in a chaperone assembly. *Journal of molecular biology* **353**(1), 68–79 (2005). doi: 10.1016/j.jmb.2005.08.025
- Stromer, T., Ehrnsperger, M., Gaestel, M., Buchner, J.: Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *The Journal of biological chemistry* **278**(20), 18015–18021 (2003). doi: 10.1074/jbc.M301640200
- Sun, Y., MacRae, T.H.: The small heat shock proteins and their role in human disease. *The FEBS journal* **272**(11), 2613–2627 (2005). doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04708.x
- Tabuse, Y., Nabetani, T., Tsugita, A.: Proteomic analysis of protein expression profiles during *Caenorhabditis elegans* development using two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* **5**(11), 2876–2891 (2005). doi: 10.1002/pmic.200401154
- Takeda, K., Hayashi, T., Abe, T., Hirano, Y., Hanazono, Y., Yohda, M., Miki, K.: Dimer structure and conformational variability in the N-terminal region of an archaeal small heat shock protein, StHsp14.0. *Journal of structural biology* **174**(1), 92–99 (2011). doi: 10.1016/j.jsb.2010.12.006
- Tang, G., Peng, L., Baldwin, P.R., Mann, D.S., Jiang, W., Rees, I., Ludtke, S.J.: EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *Journal of structural biology* **157**(1), 38–46 (2007). doi: 10.1016/j.jsb.2006.05.009
- Thon, F.: Notizen: Zur Defokussierungsabhängigkeit des Phasenkontrastes bei der elektronenmikroskopischen Abbildung. *Zeitschrift für Naturforschung A* **21**, 476–478 (1966)
- Tissiéres, A., Mitchell, H.K., Tracy, U.M.: Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *Journal of molecular biology* **84**(3), 389–398 (1974). doi: 10.1016/0022-2836(74)90447-1
- Tivol, W.F., Briegel, A., Jensen, G.J.: An improved cryogen for plunge freezing. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* **14**(5), 375–379 (2008). doi: 10.1017/S1431927608080781
- Trabuco, L.G., Villa, E., Schreiner, E., Harrison, C.B., Schulten, K.: Molecular dynamics flexible fitting: a practical guide to combine cryo-electron microscopy and X-ray crystallography. *Methods (San Diego, Calif.)* **49**(2), 174–180 (2009). doi: 10.1016/j.ymeth.2009.04.005

- Treweek, T.M., Meehan, S., Ecroyd, H., Carver, J.A.: Small heat-shock proteins: important players in regulating cellular proteostasis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **72**(3), 429–451 (2015). doi: 10.1007/s00018-014-1754-5
- Treweek, T.M., Rekas, A., Walker, M.J., Carver, J.A.: A quantitative NMR spectroscopic examination of the flexibility of the C-terminal extensions of the molecular chaperones,  $\alpha$ A- and  $\alpha$ B-crystallin. *Experimental eye research* **91**(5), 691–699 (2010). doi: 10.1016/j.exer.2010.08.015
- Ungelenk, S., Moayed, F., Ho, C.-T., Grousl, T., Scharf, A., Mashaghi, A., Tans, S., Mayer, M.P., Mogk, A., Bukau, B.: Small heat shock proteins sequester misfolding proteins in near-native conformation for cellular protection and efficient refolding. *Nature communications* **7**, 13673 (2016). doi: 10.1038/ncomms13673
- van Heel, M.: Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules). *Ultramicroscopy* **13**(1-2), 165–183 (1984). doi: 10.1016/0304-3991(84)90066-4
- van Heel, M.: Angular reconstitution: A posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy* **21**(2), 111–123 (1987). doi: 10.1016/0304-3991(87)90078-7
- van Heel, M., Frank, J.: Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy* **6**(1), 187–194 (1981). doi: 10.1016/S0304-3991(81)80197-0
- van Heel, M., Keegstra, W.: IMAGIC: A fast, flexible and friendly image analysis software system. *Ultramicroscopy* **7**(2), 113–129 (1981). doi: 10.1016/0304-3991(81)90001-2
- van Montfort, R.L., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C., Vierling, E.: Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature structural biology* **8**(12), 1025–1030 (2001). doi: 10.1038/nsb722
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., Goloubinoff, P.: The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *The Journal of biological chemistry* **273**(18), 11032–11037 (1998). doi: 10.1074/jbc.273.18.11032
- Verschuur, G.L., Kellermann, K.I., Hobbs, R.W.: Galactic and Extra-Galactic Radio Astronomy. *Physics Today* **29**(1), 72–73 (1976). doi: 10.1063/1.3023268
- Wagner, T., Merino, F., Stabrin, M., Moriya, T., Antoni, C., Apelbaum, A., Hagel, P., Sitsel, O., Raisch, T., Prumbaum, D., Quentin, D., Roderer, D., Tacke, S., Siebolds, B., Schubert, E., Shaikh, T.R., Lill, P., Gatsogiannis, C., Raunser, S.: SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM. *Communications biology* **2**, 218 (2019). doi: 10.1038/s42003-019-0437-z
- Walther, D.M., Kasturi, P., Zheng, M., Pinkert, S., Vecchi, G., Ciryam, P., Morimoto, R.I., Dobson, C.M., Vendruscolo, M., Mann, M., Hartl, F.U.: Widespread Proteome Remodeling and Aggregation in Aging *C. elegans*. *Cell* **161**(4), 919–932 (2015). doi: 10.1016/j.cell.2015.03.032

- Webb, B., Sali, A.: Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current protocols in bioinformatics* **54**, 5.6.1-5.6.37 (2016). doi: 10.1002/cpbi.3
- Williams, D.B., Carter, C.B.: *Transmission electron microscopy: A textbook for materials science* / David B. Williams and C. Barry Carter; Plenum, New York, London (1996)
- Wintrode, P.L., Friedrich, K.L., Vierling, E., Smith, J.B., Smith, D.L.: Solution structure and dynamics of a heat shock protein assembly probed by hydrogen exchange and mass spectrometry. *Biochemistry* **42**(36), 10667–10673 (2003). doi: 10.1021/bi034117m
- Woolfson, D.N., Williams, D.H.: The influence of proline residues on  $\alpha$ -helical structure. *FEBS letters* **277**(1-2), 185–188 (1990). doi: 10.1016/0014-5793(90)80839-B
- Xu, D., Zhang, Y.: Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins* **80**(7), 1715–1735 (2012). doi: 10.1002/prot.24065
- Yan, R., Xu, D., Yang, J., Walker, S., Zhang, Y.: A comparative assessment and analysis of 20 representative sequence alignment methods for protein structure prediction. *Scientific reports* **3**, 2619 (2013). doi: 10.1038/srep02619
- Yang, J., Zhang, Y.: I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic acids research* **43**(W1), W174-81 (2015). doi: 10.1093/nar/gkv342
- Yang, Y., Heffernan, R., Paliwal, K., Lyons, J., Dehzangi, A., Sharma, A., Wang, J., Sattar, A., Zhou, Y.: SPIDER2: A Package to Predict Secondary Structure, Accessible Surface Area, and Main-Chain Torsional Angles by Deep Neural Networks. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1484**, 55–63 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6406-2\_6
- Zantema, A., Verlaan-De Vries, M., Maasdam, D., Bol, S., van der Eb, A.: Heat shock protein 27 and alpha B-crystallin can form a complex, which dissociates by heat shock. *The Journal of biological chemistry* **267**(18), 12936–12941 (1992)
- Zhang, K.: Gctf: Real-time CTF determination and correction. *Journal of structural biology* **193**(1), 1–12 (2016). doi: 10.1016/j.jsb.2015.11.003
- Zhang, K.: Gautomatch; MRC Laboratory of Molecular Biology (2017)
- Zhang, K., Ezemaduka, A.N., Wang, Z., Hu, H., Shi, X., Liu, C., Lu, X., Fu, X., Chang, Z., Yin, C.-C.: A novel mechanism for small heat shock proteins to function as molecular chaperones. *Scientific reports* **5**, 8811 (2015). doi: 10.1038/srep08811
- Zheng, S.Q., Palovcak, E., Armache, J.-P., Verba, K.A., Cheng, Y., Agard, D.A.: MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nature methods* **14**(4), 331–332 (2017). doi: 10.1038/nmeth.4193
- Zhou, T., Shu, N., Hovmöller, S.: A novel method for accurate one-dimensional protein structure prediction based on fragment matching. *Bioinformatics (Oxford, England)* **26**(4), 470–477 (2010). doi: 10.1093/bioinformatics/btp679





# Eigenständigkeitserklärung

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

---

Benjamin Rossa

München, den 25. Juli 2022