

Zur molekularen Architektur von Cu(I)- Thiolatzentren in Cu-Thioneinen

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt von

Benedikt Dolderer

Tag der mündlichen Prüfung:

29.11.2004

Dekan:

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. U. Weser

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Voelter

Danksagung

Die Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Weser, Anorganische Biochemie, Physiologisch-chemisches Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, von März 2002 bis Oktober 2004 angefertigt. Unterstützt wurde ich dabei von der Begabtenförderung der Konrad-Adenauer-Stiftung durch die Gewährung eines Graduiertenstipendiums.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Weser für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, sowie für die hilfreichen Anregungen und die informativen Gespräche, die sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. H.-J. Hartmann möchte ich für seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, seine wertvollen Ratschläge und seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Anorganische Biochemie, Dr. Y. Kaup, Dr. U. Hilfrich und I. Hähnlein, danke ich für das angenehme Arbeitsklima, ihre uneingeschränkte Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, und die vielen interessanten politischen Diskussionen am Frühstückstisch.

Herrn Dr. H. Echner, Interfakultäres Institut für Biochemie, danke ich für die erfolgreiche Synthese von Apometallothioneinen. Herrn Dr. A. Beck, Klinisch-chemisches Zentrallabor der Universitätskliniken, Innere Medizin IV, Tübingen, bin ich für die Durchführung von Kontrollmassenspektren zu Dank verpflichtet.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn T. Minich, Interfakultäres Institut für Biochemie, für seine Unterstützung bei Computerproblemen recht herzlich bedanken.

I would like to thank Profs. I. Bertini and C. Luchinat, Magnetic Resonance Center (CERM) of the University of Florence, for their continuous support during the NMR measurements funded by the European Large Scale Facility 'PARABIO'.

Further thanks go to C. Del Bianco, Magnetic Resonance Center (CERM) of the University of Florence, for her help and valuable discussions in the course of structure calculation.

I am grateful to Prof. S. Mangani and PhD V. Calderone, University of Siena, for their great co-operation in the process of the crystal structure solution of yeast metallothionein.

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	2
2.1 Kupfer im biologischen Geschehen.....	2
2.2 Metallothionein	5
2.2.1 Metallbindung.....	7
2.2.2 Vertebraten-Metallothionein	7
2.2.3 Metallothionein aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
2.3 Strukturelle Aspekte von Metallothioneinen	9
2.3.1 Vertebraten-Metallothionein	9
2.3.1.1 Zn,Cd-Thionein.....	9
2.3.1.2 Cu-Thionein	10
2.3.2 Kupferthionein aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
2.3.2.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie	12
2.3.2.2 Kinetische Untersuchungen.....	14
2.3.2.3 NMR-spektroskopische Methoden.....	14
2.4 Engere Problematik	22
3 MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	23
3.2 Geräte	24
3.2.1 Spektrometer	24
3.2.1.1 Atomabsorption	24
3.2.1.2 Circular dichroismus	24
3.2.1.3 Elektronenabsorption.....	24
3.2.1.4 Lumineszenz	24
3.2.1.5 Kernspinresonanz.....	24
3.2.1.6 Elektronensynchrotron.....	24
3.2.2 Geräte zur Präparation.....	24

3.3 Methoden	26
3.3.1 Isolierung von Hefe-Cu-Metallothionein	26
3.3.2 Peptidsynthese	26
3.3.3 Rekonstitution von verkürzten Hefe-MT-Peptiden.....	27
3.3.3.1 Rekonstitution mit Cu(II) und β -Mercaptoethanol	27
3.3.3.2 Rekonstitution mit Tetraacetonitrilokupfer(I)perchlorat	27
3.3.4 Kristallisation der Hefe-MT-Fragmente	28
3.3.5 Präparation der NMR-Proben von Hefe-MT und seinen zwei Fragmenten ...	28
3.3.6 Präparation der NMR-Proben der beiden Domänen von Maus-MT-1	29
3.3.6.1 Überlegungen zur Vorgehensweise.....	29
3.3.6.2 Herstellung des Cu(I)-Agens	30
3.3.6.3 Probenpräparation.....	30
3.3.7 Analytik	31
3.3.7.1 Atomabsorption	31
3.3.7.2 Elektronenabsorption.....	31
3.3.7.3 Lumineszenz	31
3.3.7.4 Circular dichroismus	31
3.3.7.5 Kernspinresonanz.....	31
3.3.7.6 Kristallographie.....	32
3.3.8 Analyse der NMR-Daten	33
3.3.8.1 Hefe-MT und dessen verkürzte Formen	33
3.3.8.2 Domänen von Maus-MT-1	35
3.3.9 Analyse der Beugungsdaten	36
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	38
4.1 Hefe-Metallothionein	38
4.1.1 NMR-Struktur der Cu-Thionein-Fragmente	38
4.1.2 Kristallstruktur eines Cu-Thionein-Fragments	45
4.2 Domänen von Maus-Metallothionein-1	54
4.2.1 Lumineszenz und Circular dichroismus der Cu(I)-substituierten Domänen....	54
4.2.2 ^1H - ^1H -NOESY-Spektren nach den jeweiligen Cu-Titrationsschritten	62

4.2.3 Auswertung der NOESY-Spektren und Strukturberechnungen.....	66
4.2.3.1 Zn ₄ - α -Domäne.....	66
4.2.3.2 Zn ₃ - β -Domäne.....	71
4.2.3.3 Zn _x Cu ₃ - α -Domäne.....	73
4.2.3.4 Zn _y Cu ₄ - β -Domäne.....	78
4.3 Additive Inkubation von Zn _x Cu ₃ - α MT und Zn _y Cu ₄ - β MT.....	82
5 ZUR BIOLOGISCHEN BEDEUTUNG DER CU-THIONEINE.....	85
6 DATENANHANG	87
6.1 Hefe-MT und seine zwei Fragmente.....	87
6.1.1 Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid _{AS 5-40}	87
6.1.2 Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid _{AS -1-40}	88
6.1.3 Chemische Verschiebungen der Protonen vom intakten Hefe-MT.....	89
6.2 Chemisch synthetisierte Domänen von Maus-MT.....	90
6.2.1 Chemische Verschiebungen der Protonen von Maus- α -MT.....	90
6.2.2 Chemische Verschiebungen der Protonen von Maus- β -MT.....	93
7 LITERATURVERZEICHNIS	96
8 PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE	105

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
BCS	Bathocuproinsulfonat
CD	Circulardichroismus
Da	Dalton
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
ESI-MS	Electron Spray Ionisation Mass Spectroscopy
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence transfer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KPP	Kaliumphosphat-Puffer
M_r	relative Molekülmasse
β -MSH	β -Mercaptoethanol
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Mass Spectroscopy
MT	Metallothionein
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE(SY)	Nuclear Overhauser Effect (Spectroscopy)
ppm	parts per million
RMSD	random mean square deviation
Tab.	Tabelle
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
TPPI	Time Proportional Phase Incrementation
UV	Ultraviolett

1 Zusammenfassung

Zwei mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellte Fragmente von Hefe-MT wurden mit spektroskopischen Methoden, die Rückschlüsse auf die räumliche Struktur zulassen, untersucht und mit den Eigenschaften des intakten Proteins verglichen. Elektronenabsorptions-, CD- und Lumineszenzspektren der mit Cu(I) rekonstituierten Polypeptide waren nahezu identisch mit denen des isolierten intakten Hefe-MT. Die Spinsysteme in den 2D-¹H-¹H-NOESY-Spektren blieben durch die Verkürzung unbeeinträchtigt. Aus den NMR-Daten wurden die 3D-Strukturen des längeren Fragments und des intakten MT ermittelt. Die Proteinfaltung war in beiden Fällen dieselbe, insbesondere die Cysteinylschwefel fanden sich an unveränderten Positionen innerhalb der jeweiligen Polypeptidmatrix wieder.

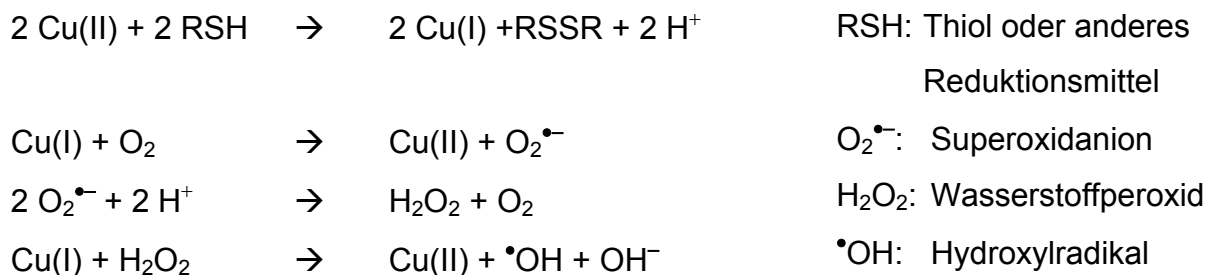
Das kürzere der beiden Fragmente kristallisierte als Einkristall. Die Kristallstruktur lieferte Erkenntnisse über die Art der Kupferkoordination in diesem Protein. Insgesamt waren 8 Cu(I) an 10 Cysteinylthiolate gebunden. Während 6 Cu(I) trigonale Koordinationsgeometrie besaßen, wurden zwei Cu(I) von je zwei Thiolatschwefeln koordiniert.

Durch Messung der Lumineszenz-, CD- und ¹H-¹H-NOESY-Spektren wurde die Cu(I)-Titration der chemisch synthetisierten Domänen von Maus-MT-1 verfolgt. Lumineszenz- und CD-Daten, die zur Bewertung der Probenpräparationsbedingungen herangezogen wurden, stimmten weitgehend mit denen bereits veröffentlichter Arbeiten überein. Für die Ausgangspunkte der Titration, Zn₄-α-MT und Zn₃-β-MT, wurden NOESY-Spektren erhalten, die mit den publizierten Daten für Cd₇-MT übereinstimmten. Aufgrund dessen wurde postuliert, dass die Proteinfaltung der beiden Domänen unabhängig davon, ob Zn(II) oder Cd(II) gebunden ist, die gleiche sei. Im Fall von Zn₄-α-MT wurde dies durch Strukturberechnungen bestätigt. Nach Zugabe von 3 Äquivalenten Cu(I) zu α-MT und 4 Äquivalenten zu β-MT bildeten sich Spezies, deren NOESY-Spektren auf ordentlich gefaltete Strukturen schließen ließen. Bereits deren Spinmuster wiesen große Unterschiede zu denen von Zn₃-α-MT und Zn₄-β-MT auf. Strukturberechnungen für diese Spezies bestätigten jeweils eine im Cu(I)-beladenen Zustand veränderte Proteinfaltung, die auch bei gemeinsamer Inkubation von Zn_xCu₃-αMT und Zn_yCu₄-βMT erhalten blieb.

2 Einleitung

2.1 Kupfer im biologischen Geschehen

Kupfer ist wegen seiner Redoxaktivität unentbehrlicher Bestandteil katalytischer Zentren einiger Enzyme, wie z.B. der Superoxiddismutase (SOD) und der Cytochrom-c-Oxidase, und daher für jegliches Leben essentiell. Andererseits stellt eben diese Reaktivität, sobald diese nicht von biologischen Systemen kontrolliert wird, eine große Gefahr für den jeweiligen Organismus dar, da durch Fenton-Chemie für zelluläre Bestandteile äußerst reaktive Sauerstoffspezies entstehen können. Diese wiederum sind verantwortlich für Schäden an Biomakromolekülen und Lipiden^[Poulos 1999].



Fenton-Chemie

Um diese unkontrollierten Reaktionen zu verhindern, haben sich zelluläre Systeme entwickelt, die überschüssige Kupferionen abfangen und dieses spezifisch den entsprechenden Kupferenzymen zuführen. Die Kenntnisse über die physiologische Chemie von Metallionen sind begrenzt, doch wurden in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte beim Verständnis von Transport und Speicherung von Metallionen in pro- und eukaryontischen Zellen erzielt. Einige interessante Details aus dem Kupferstoffwechsel sollen im Folgenden skizziert werden.

Kupfer wird im Gastrointestinaltrakt absorbiert und gelangt ins Blut, wo es als Cu(II) an Albumin oder niedermolekulare Komponenten wie Aminosäuren gebunden ist^[Sarkar 1999]. Nach Kupferapplikation in das Darmlumen von Ratten wurde zudem Metallothionein (MT) im Pfortaderblut nachgewiesen. Offensichtlich stellt auch MT eine Transportform für Metalle auf dem Weg zur Leber und zu anderen Zielorganen dar^[Felix et al. 1990]. Die Aufnahme in die Zelle geschieht über Ctr-Membrantransporter (cell surface transporter) nach vorheriger Reduktion zu Cu(I)^[Sarkar 1999]. Die ins Cytoplasma importierten Cu(I)-Ionen werden sofort von Kupfer komplexierenden

Proteinen abgefangen. Tatsächlich lässt sich über die Konzentrationen der entsprechenden Proteine und deren Dissoziationskonstanten errechnen, dass es innerhalb der Zelle eine Überkapazität für die Bindung von Kupferionen gibt, d.h. kein Kupferion liegt in freier ausschließlich hydratisierter Form vor^[Rae et al. 1999; Finney & O'Halloran 2003]. Dies wirft mehrere Fragen auf: Wie kommen apo-Kupferenzyme zu ihrem Cofaktor? Was geschieht mit überschüssigen Kupferionen? Wie geht der Transport zwischen den Speichersystemen und den Zielenzymen vor sich? Und wie hält ein Kupferenzym in der geschilderten Konkurrenzsituation seinen Cofaktor gebunden?

Was die letzte Frage angeht, so liegt die Halbwertszeit der Dissoziation der Metallionen von den entsprechenden Metalloenzymen in der Größenordnung von Tagen oder Wochen und ist somit lang verglichen mit der Verdopplungszeit der meisten pro- und eukaryontischen Zellen^[Huffman & O'Halloran 2001]. Einige Antworten bezüglich des intrazellulären Kupfertransports lieferte die Entdeckung einer neuen Klasse von Proteinen, welche ausschließlich die Aufgabe besitzen, Kupfer zu seinem spezifischen Zielprotein zu transportieren. In Anlehnung an die die Proteinfaltung kontrollierenden Chaperone, wurden deren Vertreter als Kupferchaperone bezeichnet^[Culotta et al. 1997]. Sie wurden sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Organismen identifiziert. Bisher wurden drei über Kupferchaperone verlaufende Wege beschrieben^[Huffman & O'Halloran 2001]. Der eine liefert Kupfer für den Einbau in apo-SOD^[Culotta et al. 1997]. Entsprechende Kupferchaperone heißen γ CCS in Hefe und hCCS im Menschen. Der zweite Weg läuft über Cox17, das Kupfer für die mitochondriale Cytochrom-Oxidase liefert^[Glerum, Shtanko & Tzagoloff 1996]. Cox17 ist ein kleines 8 kDa-Protein, das sechs konservierte Cysteinyreste enthält und mindestens zwei Cu(I) bindet. Bei dem dritten Weg handelt es sich um den sekretorischen Weg mit den Kupferchaperonen Atx1 in Hefe und Hah1 oder Atox1 im Menschen^[Pufahl et al. 1997; Klomp et al. 1997]. Atx1 und das menschliche Homologe liefern Cu(I) an P-Typ-ATPasen (in der Hefe Ccc2, im Menschen die Wilson- und Menkes-ATPasen), die dieses über intrazelluläre Membranen hinweg transportieren^[Rosenzweig 2001]. Da dieser Weg strukturell bisher am besten beschrieben wurde, soll in der Folge näher auf ihn eingegangen werden.

Atx1 besitzt eine Ferredoxin ähnliche $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Faltung^[Huffman & O'Halloran 2001]. Cu(I) bindet an zwei Cysteine auf einem oberflächenzugänglichen *loop*. In der für die Metallbindung verantwortlichen Region wurde ein in vielen Cu(I) übertragenden

Proteinen hoch konserviertes GMTCCXC-Motiv lokalisiert. Cu(I) wird innerhalb dieses Motivs über die zwei Cysteinyreste bigonal koordiniert. Durch die niedrige Koordinationszahl wird die zusätzliche Bindung eines weiteren von außen hinzukommenden Liganden ermöglicht. Dafür kommt zum Beispiel ein Ligand aus der Cu(I)-Koordinationssphäre des Zielproteins in Frage. Dieser Gedanke impliziert einen möglichen Übertragungsmechanismus vom Kupferchaperon auf das Zielprotein wie er in Abbildung 1 dargestellt ist^[Pufahl et al. 1997].

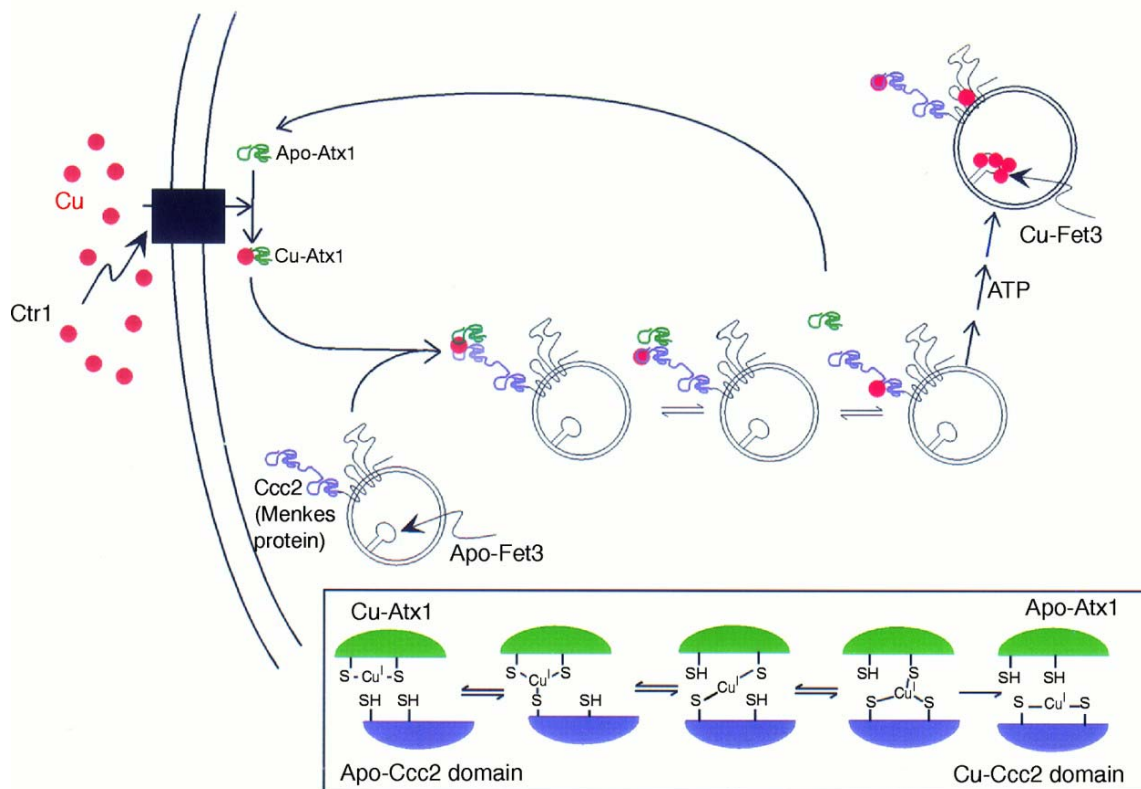


Abb. 1: Kupfertransportweg zwischen Atx1 und Kupfer-ATPasen als Beispiel für die Funktion eines Kupferchaperons. Damit Kupfer in die Multikupferoxidase Fet3 eingebaut werden kann, werden neben dem Kupferchaperon Atx1 sowohl der auf der Zelloberfläche sitzende Transporter Ctr1 als auch die P-Typ ATPase CCC2 benötigt. Im Kasten dargestellt ist der vorgeschlagene Mechanismus für die Cu(I)-Übertragung vom Kupferchaperon Atx1 auf sein Zielprotein. Dabei wird das Cu(I) intermediär trigonal gemeinsam von beiden Protein koordiniert.^[Huffman & O'Halloran 2001]

Die Cu(I)-Freisetzung von Atx1 hat Änderungen der Konformation zur Folge. Diese treten insbesondere im Metall bindenden *loop* auf, mit der Folge, dass die beiden Cysteinylseitenketten für das Lösungsmittel zugänglicher werden. Auf der Oberfläche von Atx1 sitzen mehrere Lysinreste, denen man eine Funktion bei der Erkennung der

Zielmoleküle zuschreibt. Modelle für die Bindung des menschlichen Homologen Hah1 an die entsprechende Domäne der Menkes-ATPase sagen elektrostatische Interaktionen zweier Lysinreste von Hah1 mit zwei Aspartatresten der ATPase voraus [Huffman & O'Halloran 2001].

Neben diesen relativ neuen Mitgliedern in der Familie der kupferbindenden Proteine gibt es die schon seit fast 50 Jahren bekannten und oben bereits erwähnten Metallothioneine. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die verschiedene Schwermetalle darunter auch Cu(I) binden. Verschiedene physiologische Funktionen wurden für MT vorgeschlagen, unter anderem die eines Speichers für Kupfer, das für den Transfer in apo-Kupferproteine [Hartmann et al. 1983; Morpurgo et al. 1983] und apo-Kupferchaperone [Culotta et al. 1999; O'Halloran & Culotta 2000] bestimmt ist. Eine Schwermetall- und Kupferentgiftungsfunktion der Metallothioneine aus Hefe und Säugetieren wurde auf Basis unterschiedlicher Arbeiten ins Spiel gebracht [Felix, Hartmann & Weser 1989; Dameron & Harrison 1998; Vasak & Hasler 2000]. Für beide Rollen sollte Metallothionein Kupfer fest binden und, zumindest für die erste genannte Möglichkeit, auch schnell wieder abgeben können, wenn es benötigt wird.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit strukturellen Aspekten von Hefe- und Maus-MT, um anhand der Struktur einen Anhaltspunkt für die Bewertung der verschiedenen Hypothesen zu haben.

2.2 Metallothionein

1957 wurde erstmals ein cadmiumreiches Protein aus Pferdenierenrinde isoliert und charakterisiert [Margoshes & Vallee 1957; Kägi & Vallee 1960, 1961]. Neben einem hohen Cadmiumgehalt traten ein hoher Zink- und Cysteinylgehalt dieses Makromoleküls, dessen Molekulargewicht damals auf ungefähr 10000 Da bestimmt wurde, auffällig in Erscheinung. Wegen seiner ellipsoiden Gesamtstruktur wandert das 6 kDa-Protein wie ein 10 kDa-Protein während der Gel-Ausschlusschromatographie. Andere Metalle wie zum Beispiel Kupfer wurden gleichfalls gebunden. Diese Eigenschaft und der hohe Schwefelgehalt führten zu der Bezeichnung Metallothionein (MT). Diese Nomenklatur wurde in der Folge ausgedehnt, so dass heute allgemein Proteine, die einige der typischen Charakteristika des ursprünglich isolierten Pferdenieren-MT besitzen, als MT bezeichnet werden. Typische Eigenschaften sind [Kägi et al. 1979; Fowler et al. 1987].

- ein Molekulargewicht von 6000 – 7000 Da,
- hoher Metallgehalt,
- charakteristische Aminosäurezusammensetzung: hoher Cysteinylgehalt, keine aromatischen Aminosäuren,
- Besonderheiten in der Primärstruktur: die Sequenz der Cysteinylreste ist konserviert und zeigt bestimmte Motive,
- für Metallthiolate charakteristische optische Eigenschaften,
- Auftreten von Metallthiolatclustern.

In der Zwischenzeit wurden derartige Schwermetall bindende Proteine im gesamten biologischen Geschehen entdeckt^[Kägi & Kojima 1987]. Strukturell bilden sie eine recht heterogene Gruppe niedermolekularer Makromoleküle, die in drei Klassen unterteilt werden kann^[Fowler et al. 1987].

Der Klasse I werden solche MT zugeordnet, die in Bezug auf die Cysteinylpositionen innerhalb der Polypeptidkette dem zuerst isolierten Pferdenieren-MT sehr nahe verwandt sind. Zu diesen gehören vor allem Vertebraten-MT. Sie bestehen aus 59-63 AS und enthalten 20 Cysteinylreste, welche allesamt an invarianten Stellen im jeweiligen Protein sitzen. Typische Muster der Cysteinylverteilung in der Polypeptidkette sind Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys und Cys-Cys, wobei X und Y für andere AS als Cys stehen. Die Metallbindung erfolgt in zwei unterschiedlichen Domänen unter Ausbildung von zwei Metallthiolatclustern^[Otvos & Armitage 1980; Winge & Miklossy 1982]. Die meisten Spezies mit MT der Klasse I zeigen einen ausgeprägten Genpolymorphismus. Säugetiergewebe besitzen meist zwei Hauptgruppen von Iso-MT, MT 1 und MT 2, die sich bei neutralem pH nur um eine negative Ladung unterscheiden. Oft kommen neben diesen Hauptgruppen noch zahlreiche Subformen vor, welche zum Teil gewebsspezifisch exprimiert werden.

Zu den MT der Klasse II werden diejenigen Polypeptide gezählt, deren Verwandtschaft hinsichtlich der Cysteinylpositionen in der Sequenz entweder weit entfernt zu den Säugetier-MT oder nicht nachweisbar ist. Zu diesen zählen MT aus Weizen, Hefe, Seeigel und bestimmten Prokaryonten^[Winge et al. 1985; Nemer et al. 1985].

Klasse III-MT sind atypische, in Pflanzen vorkommende, nichttranslatorisch synthetisierte Metallthiolatpolypeptide. Sie besitzen oft oligomere Struktur bestehend aus zwei oder mehr Poly(γ -glutamylcysteinyl)glycin-Ketten verschiedener Länge^[Grill et al. 1985; Jackson et al. 1987; Kägi & Kojima, 1987].

2.2.1 Metallbindung

Der außergewöhnlich hohe Cysteinylgehalt von bis zu 33% der Aminosäurereste und die oben beschriebene Anordnung derselben zu Motiven von Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys und Cys-Cys prädestiniert MT zur Komplex- und Clusterbildung mit weichen Metallzentren. Säugetier-MT werden gewöhnlich als cadmium- bzw. zinkhaltige Proteine isoliert. Durch Ansäuern können die Metallionen entfernt und das apo-MT gewonnen werden. In Rekonstitutionsexperimenten wurden MT mit sieben Äquivalenten Zn(II), Cd(II), Hg(II), Pb(II), Bi(III), Sn(II), Co(II), Ni(II), Fe(II) und TcO(III) erhalten. Andere Stöchiometrien von bis zu 20 Metallionen pro Molekül werden mit den univalenten d^{10} -Kationen der 1. Nebengruppe beschrieben. Inwieweit hier der Thiolatschwefel oxidiert wurde und eine unspezifische Metallbindung an anderen Stellen des Proteins in Frage kommt, ist offen. Generell steigt die Affinität der Metalle für MT in der auch für Modellthiolatkomplexe charakteristischen Reihenfolge Zn(II) < Pb(II) < Cd(II) < Cu(I), Ag(I), Hg(II), Bi(III) an^[Kägi & Kojima 1987].

Aus *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* wurden MT isoliert, die ausschließlich Cu(I) in ihrem Metallthiolatzentrum besitzen. Die Stöchiometrien reichen von sechs bis acht Äquivalenten Cu(I) für das Hefe-MT^[Winge et al. 1985; Weser & Hartmann 1988]. Im Fall von *Neurospora crassa* wurden sechs Cu(I) pro MT-Molekül gefunden^[Lerch 1980].

Die Metallbindung verleiht Hefe-Cu-MT Proteolyseresistenz. Während H_2O_2 -oxidiertes Cu-MT und apo-MT durch Proteasen in beträchtlichem Maße abgebaut werden, bleibt natives Cu-MT durch gleiche Behandlung intakt^[Weser et al. 1986]. Dies gilt auch für MT aus Säugetieren. So wurden die einzelnen Domänen durch proteolytischen Verdau nur dann erhalten, wenn die jeweils andere Domäne nicht ausreichend mit Metallen besetzt war^[Nielsen & Winge 1985].

2.2.2 Vertebraten-Metallothionein

Säugetier-MT besitzen abhängig von Spezies und Isoform etwa 60 Aminosäurereste und bilden eine Struktur mit zwei Domänen aus^[Winge & Miklossy 1982]. In beiden Domänen befindet sich je ein Metallthiolatcluster, der sich von dem der anderen Domäne hinsichtlich Präferenz für bestimmte Metallionen und Clusterstruktur unterscheidet. So lassen sich die unterschiedlichen Domänen durch Vorinkubation mit entweder Cu(I) oder Cd(II) und anschließendem proteolytischem Verdau selektiv gewinnen.

Vorinkubation mit Cu(I) liefert bei diesem Verfahren die aminoternale Domäne, auch β -Domäne genannt^[Nielson & Winge, 1985]. Dies zeigt die Präferenz des Cu(I) für diese Domäne. Umgekehrt ist die selektive Isolierung der α -Domäne durch Cd(II)-Vorbehandlung auf dessen Präferenz für letztere Domäne zurückzuführen^[Winge & Miklossy 1982]. Die gleiche Stöchiometrie der verschiedenen Metalle sowohl im intakten MT als auch in den isolierten Domänen wurde dahingehend gedeutet, dass die Clusterbildung in beiden Domänen unabhängig voneinander verläuft^[Nielson & Winge, 1985]. Während Cu(I) und Ag(I) in beiden Domänen gleichermaßen mit einer Stöchiometrie von sechs Ionen pro Domäne binden^[Li & Weser 1992; Bofill et al. 2001], entsteht mit Cd(II) in der α -Domäne ein Cluster mit vier und in der β -Domäne einer mit drei Metallionen^[Otvos & Armitage 1980]. Zur Komplexierung dieser stehen in der α -Domäne elf und in der β -Domäne neun Cysteinyreste zur Verfügung.

2.2.3 Metallothionein aus *Saccharomyces cerevisiae*

Aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde 1975 zum ersten Mal ein cysteinylreiches Schwermetall bindendes Polypeptid isoliert^[Prinz & Weser 1975]. Mit einem Anteil von etwa 20% besitzt es einen weit geringeren Cysteinygehalt als die damals schon bekannten MT aus Säugetieren, bei denen er bei etwa 30% lag. Wegen der großen Unterschiede zu den MT war es zuerst auch unter dem Namen Kupfer-Chelatin bekannt, wurde später aber der Klasse II der MT zugeordnet^[Fowler et al. 1987].

Das Protein wird mit einer Länge von 53 Aminosäurenresten (Abb. 8, Kapitel 3.3.2) isoliert und besitzt in der apo-Form ein Molekulargewicht von 5655 Da^[Winge et al. 1985]. Im Gegensatz zu MT aus Säugetieren bindet das Hefeprotein unter physiologischen Bedingungen ausschließlich Cu(I)-Ionen in einer Stöchiometrie von sechs bis acht Cu(I)-Ionen pro Molekül. In Rekonstitutionsexperimenten wird die größte Proteolysestabilität mit acht gebundenen Cu(I) erreicht^[Winge et al. 1985; Weser & Hartmann 1988]. *In vitro* wurden Cu(I)-Ionen erfolgreich durch andere Schwermetalle wie Ag(I), Cd(II), Zn(II), Co(II) und Fe(II) substituiert. Von diesen wird lediglich das Silber in gleicher Stöchiometrie wie das Kupfer gebunden. Da Ag(I) und Cu(I) zum Teil ähnliche komplexchemische Eigenschaften zeigen, wurde diese Substitution auch als isomorph betrachtet^[Narula et al. 1991]. Die bivalenten Metallionen werden in einer Stöchiometrie von 4 pro Molekül gebunden^[Winge et al. 1985; Ding et al. 1994]. Hefe-MT besitzt

also zwei verschiedene Bindungskonfigurationen mit auch mindestens zwei verschiedenen Strukturen für den Metallthiolatcluster.

2.3 Strukturelle Aspekte von Metallothioneinen

Bereits die oben erwähnte Tatsache, dass die Metallbindung an MT wichtig für dessen Proteolyseresistenz ist, ist ein Hinweis dafür, dass die korrekte Faltung der Polypeptidkette in dieser Gruppe von Proteinen einzig davon abhängt, ob Metalle an die Cysteinyreste gebunden sind. Wie oben beschrieben resultieren unterschiedliche komplexchemische Eigenschaften der Metalle in unterschiedlicher Bindungsstöchiometrie und damit unterschiedlicher Bindungskonfiguration. Diese wiederum könnten die gesamte Proteinfaltung des jeweiligen MT beeinflussen. In diesem Kapitel sollen die bisherigen Erkenntnisse über die Strukturen von Hefe- und Säugetier-MT zusammengefasst werden.

2.3.1 Vertebraten-Metallothionein

2.3.1.1 Zn,Cd-Thionein

Mit NMR-Techniken konnte die Existenz zweier Cluster in Hasenleber-MT nachgewiesen werden^[Otvos & Armitage 1980]. Anhand des Musters skalarer ^{113}Cd - ^{113}Cd -Kopplungen, die durch Wechselwirkung zweier miteinander über Cysteinyllthiolate verbrückter $^{113}\text{Cd}(\text{II})$ -Ionen entstehen, war zu erkennen, dass die Cd-Ionen zu zwei Clustern von vier und drei Metallionen zusammengefasst waren. Daraus erstellten die Autoren das in Abbildung 2 dargestellte Modell für die Clusterstrukturen.

Die Raumstruktur von Säugetier-MT-2 war die erste MT-Struktur, die aufgeklärt wurde. Von ihr sind sowohl die NMR- als auch die Röntgenkristallstrukturdaten bekannt. Für letztere Methode wurde natives Cd_5Zn_2 -MT-2 aus Rattenleber isoliert und dessen Struktur aus den Beugungsdaten berechnet (Abb. 3)^[Robbins et al. 1991]. Mit mehrdimensionaler heteronuklearer NMR wurden die Strukturen von ^{113}Cd -rekonstituiertem Cd_7 -MT-2 aus Hase^[Arseniev et al. 1988], Ratte^[Schultze et al. 1988] und Mensch^[Messerle et al. 1990] ermittelt. Es zeigte sich, dass sowohl die Kristall- als auch die NMR-Strukturbestimmung zu einem identischen Ergebnis gekommen waren^[Braun et al. 1992]. Ebenso wurden identische Strukturen für MT erhalten, unabhängig davon ob sie Zn(II) oder Cd(II) enthielten^[Messerle et al. 1992]. Eine etwas neuere Arbeit stellte die NMR-

Struktur von Maus- $^{113}\text{Cd}_7\text{-MT-1}$ vor^[Zangger et al. 1999]. Auch diese ist im Wesentlichen identisch zu den bekannten Strukturen von MT-2. Allerdings zeigt die β -Domäne im MT-1 eine höhere Flexibilität verglichen mit β -MT-2.

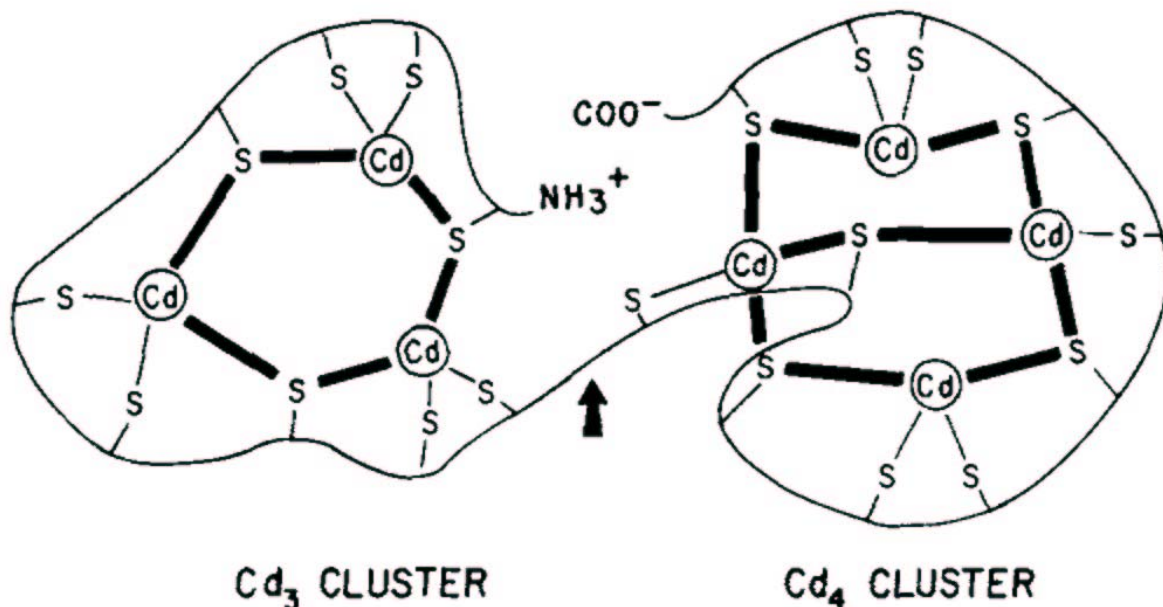


Abb. 2: Schematische Darstellung der von Otvos et al. postulierten Cd_3S_9 - und Cd_4S_{11} -Cluster in den Domänen von Rattenleber-MT.^[Winge & Miklosy 1982]

Abbildung 3 zeigt die Kristallstruktur von $\text{Cd}_5\text{Zn}_2\text{-MT-2}$. Frühere Befunde, dass die Domänen voneinander unabhängig ausgebildet werden, sie sich hinsichtlich ihrer Metallbindung unterscheiden und die Metalle tetraedrisch koordiniert sind, wurden bestätigt. Die zwei Domänen sind hantelförmig angeordnet, verbunden mit einer flexiblen Scharnierregion bestehend aus dem konservierten Lys-Lys-Segment. In der N-terminalen β -Domäne, Reste 1-30, befindet sich der $\text{Cd}_1\text{Zn}_2\text{Cys}_9$ -Cluster. Die C-terminale α -Domäne, Reste 31-61, beherbergt den $\text{Cd}_4\text{Cys}_{11}$ -Cluster. Die Metalle werden sowohl von terminalen wie verbrückenden Liganden koordiniert.

2.3.1.2 Cu-Thionein

Bei den Untersuchungen zu Cu-MT treten mehrere Probleme auf. Zum einen kommen in Vertebraten keine homometallischen Cu-MT vor; diese können also nur durch *in vitro* Substitution erhalten werden. Zum anderen sind diese weitaus oxidationsempfindlicher als die auch *in vivo* vorkommenden Cu-MT aus

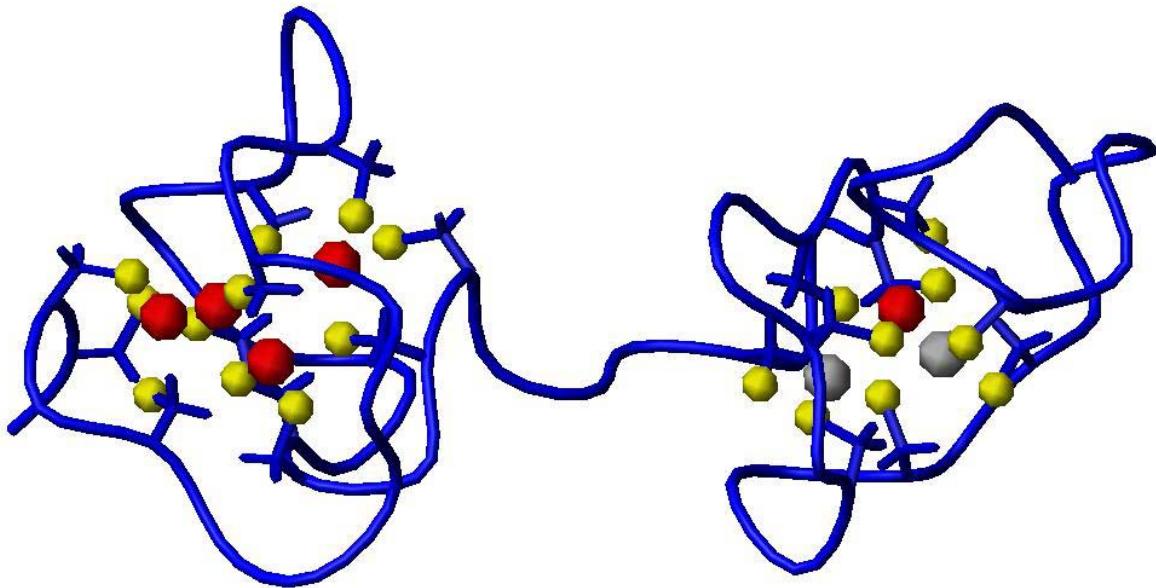


Abb. 3: Kristallstruktur von $\text{Cd}_5\text{Zn}_2\text{-MT-2}$ aus Rattenleber. Zu sehen sind das Proteinrückgrat in Bänderdarstellung, die Cysteinylseitenketten und als Kugeln die Schwefelatome (gelb), die Cadmiumionen (rot) und die Zinkionen (grau). Die N-terminale β -Domäne umschließt einen $\text{Cd}_7\text{Zn}_2\text{Cys}_9$ -Cluster, die C-terminale α -Domäne einen $\text{Cd}_4\text{Cys}_{11}$ -Cluster. Die Koordinaten für die Struktur wurden aus der Brookhaven protein data bank (4MT2) übernommen.

Saccharomyces cerevisiae und *Neurospora crassa*, was die Handhabung bedeutend erschwert.

EXAFS-Untersuchungen an der Cu-substituierten β -Domäne, die wie oben dargestellt die größere Präferenz für Cu(I) hat, führten zu dem Ergebnis, dass der Cu-S-Bindungsabstand $2,25 \pm 0,03 \text{ \AA}$ beträgt. Dies spricht durch Vergleich mit Röntgenstrukturdaten von Modellkomplexen am ehesten für eine trigonale Koordination der Kupferionen durch den Thiolatschwefel. Als Modell für eine trigonale Bindung der sechs Cu(I) in einem Cluster wurde eine Prismenstruktur vorgeschlagen^[George et al. 1986].

Eine Untersuchung zu lysosomalem Hundeleber-MT gelangte dagegen zu dem Ergebnis, dass das Cu(I) in diesem Protein tetragonal von Thiolat-Schwefeln

umgeben sei. Die Autoren dieser Arbeit schlugen für die Clusterstruktur ein Adamantanmodell vor^[Freedman et al. 1986].

Neuere Studien zu Mäuse-Cu-MT basierend auf Elektronenabsorption, CD und ESI-MS kamen zu dem Schluss, dass Zn(II) für die korrekte Faltung in zwei Domänen notwendig sei^[Bofill et al. 2001]. MT wurden unter verschiedenen Bedingungen wie unterschiedlichem pH und Anwesenheit von Zn(II) zwar mit Cu(I) zu Spezies gleicher Cu-Stöchiometrie titriert. Jedoch unterschieden sich die entsprechenden CD-Spektren. Laut Interpretation der Autoren seien die beschriebenen Unterschiede auf eine unterschiedliche Clusterstruktur zurückzuführen. Diese hänge in ihrem Ergebnis vom beschrittenen Reaktionsweg ab.

NMR- und Kristallstrukturuntersuchungen zu kupferhaltigen Vertebraten-MT sind bisher nicht bekannt.

2.3.2 Kupferthionein aus *Saccharomyces cerevisiae*

Nach 30-jährigen Bemühungen ist es vor kurzem gelungen, die räumliche Struktur des Kupferthiolatclusters von Cu-MT aus *Saccharomyces cerevisiae* aufzuklären. Bisherige Versuche, Cu-MT für Röntgenbeugungsuntersuchungen zu kristallisieren, waren fehlgeschlagen. Zudem kamen 2D-NMR-Experimente zur Aufklärung der Clusteranordnung kommen nicht in Frage, da die beiden Kupferisotope, ⁶¹Cu und ⁶³Cu, mit einem Kernspin $I=5/2$ ein sehr großes elektrisches Quadrupolmoment besitzen. Dies führt bei NMR-Messungen zu einer starken Linienverbreiterung und geringer Signalintensität.

Um sich dennoch der Struktur anzunähern, musste man sich deshalb anderer spektroskopischer Methoden, wie der Röntgenabsorptionsspektroskopie und ¹H-NMR, bedienen. Damit ließen sich immer nur Teilinformationen wie Cu-Cu- und Cu-S-Bindungsabstände, Koordinationszahlen der Kupferionen und räumliche Struktur der Polypeptidkette gewinnen. Die exakte räumliche Anordnung der Kupferatome im Metallthiolatcluster blieb mit diesen Methoden unbekannt.

2.3.2.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie

EXAFS-Untersuchungen an der Kupferabsorptionskante wiesen durch Vergleich mit den Daten für Cu(Thioharnstoff)₃Cl auf eine tetraedrische Koordination des Kupfers durch vier Thiolatschwefel hin. Zwei der Thiolatliganden besäßen demnach einen

Abstand von 2,22 Å, die anderen zwei einen von 2,36 Å^[Bordas et al. 1982, 1983]. Die Ergebnisse der EXAFS-Messungen wurden jedoch noch unter der Annahme, dass im Hefe-Kupferthionein vier Cu(I) von acht Thiolatschwefeln komplexiert würden, interpretiert. Analog dem Fe₄S₄-Cluster in Ferredoxinen wurde daraufhin für den Kupferthiolatcluster ein Modell mit kubischer Gestalt erstellt.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden im Rahmen einer weiteren EXAFS-Studie Cu-S-Abstände von 2,23 Å ermittelt, was typisch für trigonale Kupferkoordination ist^[George et al. 1988]. Des Weiteren wurden zwei verschiedene Cu-Cu-Abstände, 2,7 Å und 3,9 Å, gefunden. Nach dem damaligen Stand der Dinge und im Gegensatz zur früheren Annahme von Bordas et al. 1982, 1983 ging man davon aus, dass im Hefe-Kupferthionein acht Cu(I) von zwölf Thiolatschwefeln koordiniert würden. Als Modell wurde ein abgeflachter Würfel mit je einem Cu(I) in jeder Ecke vorgeschlagen:

Zudem wurden Untersuchungen an C-terminal verkürzten Mutanten des Proteins (T48 bzw. T35), denen zwei bzw. vier der zwölf Cysteinyreste fehlten, durchgeführt. EXAFS-Experimente resultierten in nahezu identischen Daten für die Mutanten wie für das native Protein^[George et al. 1988]. Fluoreszenz- und Elektronenabsorptionsexperimente ergaben, dass sich die längere der beiden Mutanten in ihren Eigenschaften nicht vom nativen Protein unterschied, was die Identität des Chromophors belegte. Die kürzere Mutante hingegen zeigte in ihrem Verhalten größere Unterschiede. Daraus konnte geschlossen werden, dass die beiden C-terminalen Cysteinyreste nicht, die beiden darauf folgenden Cysteinyreste jedoch schon an der Clusterbildung beteiligt sind^[Byrd et al. 1988].

In einer 1990 veröffentlichten EXAFS-Studie wurden die Spektren von isoliertem Cu-MT und von lyophilisiertem Zellmaterial aus intakten, mit Cu angereicherten Hefezellen verglichen^[Desideri et al. 1990]. Die Daten für das isolierte Cu-MT bestätigten im Wesentlichen die Befunde von George et al. 1988. Es wurden Cu-S-Abstände von 2,21 Å und damit trigonale Koordination der Cu(I) gefunden. Die Analyse der Spektren des lyophilisierten Zellmaterials ergab einen Cu-S-Abstand von 2,19 Å, deutete jedoch auf eine Cu(I)-Koordinationszahl von zwei hin. In keinem der Spektren waren Cu(II)-Signale zu erkennen. Da eine unabhängige Untersuchung zu intra- und extrazellulärem Cu₈-Thionein gezeigt hatte, dass diese beiden Spezies spektroskopisch und chemisch identisch waren^[Felix et al. 1989], wurden die unterschiedlichen Koordinationszahlen der EXAFS-Studie dahingehend interpretiert, dass eine andere Komponente des zellulären Systems diese Unterschiede

verursacht habe. Als möglichen Kandidaten dafür wurde der Cu(I)-Glutathion-Komplex benannt, der in Cu-resistenten Ratten-Hepatomazellen schon nachgewiesen worden war^[Freedman et al. 1989].

2.3.2.2 Kinetische Untersuchungen

Bathocuproinsulfonat (BCS) und Cuproin sind Cu(I)-Chelatoren, welche mit Cu(I) spezifisch farbige Komplexe bilden und elektronenabsorptionsspektrometrisch quantifiziert werden können. Durch Inkubation eines Überschusses eines dieser Komplexbildner mit Cu₈-Thionein wurde Cu(I) aus dem Kupferthiolatcluster herausgelöst und die Kinetik der Herauslösung von Cu(I) aufgezeichnet. Diese verlief in zwei Stufen, wobei 2 Cu(I) innerhalb weniger Sekunden, die restlichen 6 Cu(I) erst nach ungefähr 20 Stunden mit den Chelatoren reagiert hatten^[Weser & Hartmann 1988]. Dies ist auf unterschiedlich starke Bindung der Cu-Ionen im Cluster zurückzuführen. Aufgrund dieser Beobachtung und der EXAFS-Studien, die auf tetraedrisch koordiniertes Kupfer hinwiesen, wurde ein theoretisches Modell vorgeschlagen, in dem sechs Cu(I)-Ionen von zwölf Cysteinen jeweils tetraedrisch gebunden werden und mit diesen eine adamantanartige Struktur ausbilden. Ein siebtes und ein achtes Cu(I) kann pyramidal an diese Struktur gebunden werden und entspräche somit dem labiler gebundenen Cu(I), das in der Reaktion mit BCS schnell nachgewiesen werden konnte^[Hartmann et al. 1992].

2.3.2.3 NMR-spektroskopische Methoden

Über den qualitativen Vergleich der eindimensionalen ¹H-NMR-Spektren von apo-MT und Cu-MT im Bereich von 6,5 – 7,5 ppm und um 8 ppm, der Bereich der C(4)- bzw. C(2)-Protonen-Resonanzen von Histidin, konnte Histidin als Ligand für Cu(I) ausgeschlossen werden^[Bordas et al. 1983]. Größeren Änderungen zwischen den beiden Spektren waren in diesem Bereich nicht zu erkennen.

Wie schon zuvor erläutert gibt es keine für die NMR-Spektroskopie geeigneten Kupferisotope. Das Problem könnte mit einem isomorphen Ersatz für Cu(I) umgangen werden. Es müsste durch ein Metallion ersetzt werden, das in seinen komplexchemischen Eigenschaften dem Cu(I) weitgehend gleicht und annähernd gleichen Ionenradius besitzt, so dass der Cluster durch den Ersatz in seiner Geometrie nicht beeinflusst wird. Zudem müsste das gesuchte Metallion für diesen Zweck noch NMR-aktiv sein. Narula et al. entschieden sich dafür, Cu(I) im Cu-MT

durch ^{109}Ag , das einen Kernspin von $I=1/2$ besitzt, zu substituieren^[Narula et al. 1991, 1993]. Sie führten ^1H - ^{109}Ag -HMQC-Experimente (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence transfer) an ^{109}Ag -substituiertem MT durch und konnten damit die Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigen, dass Histidin und die beiden Cysteinyreste 49 und 50 nicht an der Cu(I)-Bindung beteiligt sind. Zudem waren in den HMQC-Spektren nur sieben Silberfrequenzen vorhanden. Die Frequenzen der Silberionen (chemische Verschiebungen zwischen 790 ppm und 1250 ppm) differierten trotz gleichartiger Liganden ungewöhnlich stark. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Ag(I) im Metallthiolatkomplex mit unterschiedlicher Koordinationszahl vorkommt. Folgende Ag(I)-Cystein-Konnektivitäten konnten gefunden werden:

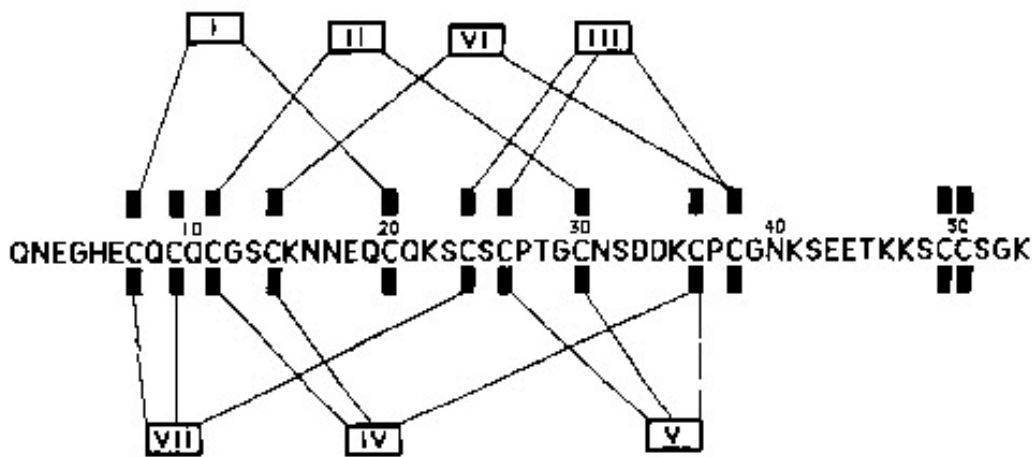


Abb. 4: Schematische Darstellung der aus den ^1H - ^{109}Ag -HMQC Daten abgeleiteten Metall-Cystein-Konnektivitäten. Die Silberionen wurden mit römischen Zahlen durchnummeriert.^[Narula et al. 1993]

Schwierigkeiten gab es dahingehend, dass bisher noch keine NMR-Daten zu stabilen Modellthiolkomplexen mit gemischter Koordinationszahl und bekannter Geometrie existierten, da ansonsten die Kenntnis der komplexchemischen Parameter eine Zuordnung von Metallionen und Liganden sehr erleichtert hätte.

Die hochfeld verschobenen Resonanzen der Silberionen I und II (Tab. 1) zeigen übereinstimmend mit den gefundenen Konnektivitäten eine zweifache Koordination an, die Silberionen III, IV, V und VII eine dreifache. Beim Silberion VI stand die auf dreifache Koordination hinweisende chemische Verschiebung in Widerspruch zu den zwei tatsächlich gefundenen Konnektivitäten. Die Autoren vermuteten, dass die Ag-S-Kopplung in diesem Fall zu schwach und damit nicht detektierbar gewesen sei. Es

sei gut möglich, dass entweder Cys 9 oder Cys 20, die nach bisherigem Kenntnisstand nur als terminale Liganden fungierten, an der Komplexbildung dieses Silberions beteiligt ist. Demnach würden zehn Cysteinyllthiolate zwei Ag(I) zweifach und fünf Ag(I) dreifach koordinieren. Dies passt zu den oben beschriebenen Ergebnissen, dass sich etwa 25% der Cu-Atome leichter durch Komplexbildner entfernen lassen^[Weser & Hartmann 1988]. Diesen labiler gebundenen Metallionen entsprechen in Narulas Bild die zweifach koordinierten Ag(I) I und II.

Metall	Ag-MT	Ag-T48
I	790	788
II	890	888
III	1000	994
IV	1037	1033
V	1183	1184
VI	1220	1220
VII	1250	1249

Tab. 1: Chemische Verschiebungen der ^{109}Ag in *parts per million* (ppm). Daten für das Wiltypprotein und die T48-Mutante bei 30 °C.^[Narula et al. 1993]

Aus diesen Ergebnissen folgte, dass ein neues Modell für den Kupferthiolatcluster erstellt werden musste, in dem sieben Cu(I) von zehn Cysteinylschwefeln koordiniert werden^[Narula et al. 1991]. Dass das MT-Silberderivat einen zum Cu-MT isomorphen Metallthiolatcluster besitzt, wurde wegen der gleichen Stöchiometrie der Metallbindung angenommen^[Winge 1985] und auch durch ähnliche Signalmuster in den NOESY-Spektren (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) bestätigt^[Narula et al. 1993]. Allerdings scheint der Kupferthiolatcluster etwas kompakter als der Cluster des Silberderivats zu sein, da im NOESY-Spektrum für Cu-MT unter gleichen Bedingungen einige zusätzliche Kreuzsignale auftauchen. Dazu passend besitzt Cu(I) mit 0,95 Å auch einen kleineren Ionenradius verglichen mit den 1,15 Å von Ag(I).

Die sequentiellen NOEs des Cu-MT und des Ag-substituierten Derivats lassen den Schluss zu, dass die Sekundärstruktur große Übereinstimmung zeigt und dass außer Typ I β -Schleifen keine üblichen Sekundärstrukturelemente wie α -Helices oder β -Faltblätter in den beiden Spezies vorhanden sind.

In den NOESY-Spektren beider Proteine werden für einige Aminosäurereste von K41 bis K53 Doppelsignale beobachtet, ein Zeichen, dafür, dass dieser Teil des Proteins

flexibler ist und in mehreren Konformationen auftritt. Dieses Phänomen bleibt bei der verkürzten Mutante Ag-T48, der die beiden Reste Cys 49 und 50 fehlen, aus. So wäre es möglich, dass dieser Effekt auf Wechselwirkung dieser beiden Cysteinylnreste mit anderen Aminosäureresten oder einem Metallion beruht. Außerdem könnte die strukturelle Flexibilität die Ursache dafür sein, dass es bisher noch nicht gelungen ist, das Protein zu kristallisieren.

Aus den oben dargestellten 2D NMR-Daten wurden die 3D Strukturen des Cu-MT (Abb. 5) und des Ag-substituierten Derivats berechnet^[Peterson et al. 1996]. Die beiden Strukturen zeigten wie erwartet große Ähnlichkeit. Der Metallthiolatcluster ist in eine Tasche aus zwei parallelen Schleifen eingebettet, welche nur nach einer Seite für das Lösungsmittel zugänglich ist. Die Bindungstasche fällt im Fall des Cu-MT wegen des kleineren Cu(I)-Radius im Vergleich zu der des Ag-MT etwas gedrungener aus.



Abb. 5: Familie der zehn besten überlagerten Strukturen von Cu-MT.^[Peterson et al. 1996]

Vor allem im aminoterminalen Bereich wurden kleinere Unterschiede bezüglich Wasserstoffbindungen und Sekundärstrukturelementen beobachtet. So ist der Aminoterminus im Ag-MT über Wasserstoffbindungen des His 5 zu den Resten 24 bis 26 fixiert, während er im Cu-MT eine ungeordnete Struktur aufweist. Hinsichtlich der Koordination des Metalles II scheinen Unterschiede zwischen beiden Spezies zu existieren. Wie oben beschrieben wird im Ag-MT Ag II von zwei Cysteinen koordiniert. In diesem Protein binden Cys 9 und 11 zwei verschiedene Metalle, wobei Cys 9 lediglich als terminaler Ligand agiert. Aufgrund der ermittelten Struktur des Cu-MT ist es denkbar, dass Cys 9 auch Cu II bindet. Die gemeinsame Bindung von Cys 9 und 11 an dasselbe Metallatom würden im Segment Q8-C11 eine Halbschleife notwendig machen. Diese wird auch tatsächlich in der berechneten Struktur des Cu-MT beobachtet, fehlt jedoch in der von Ag-MT. Für die oben beschriebene Koordination von Metall VI stünde dann nur noch Cys 20 zur Verfügung. Es wurden Pseudo-NOEs für die Bindungen Me II zu Cys 9 und Me VI zu Cys 20 eingeführt und die Strukturberechnungen sowohl für Cu-MT als auch für Ag-MT nochmals durchgeführt. Für Cu-MT wurde eine verzerrt kubische Metallthiolatstruktur erhalten, in der sechs der neun benachbarten Cu-Cu-Bindungen einen Abstand von $3,31 \pm 0,01 \text{ \AA}$ besaßen. Im Fall des Ag-MT dagegen war die Struktur des Clusters stärker verzerrt und hatte entsprechende Bindungslängen von 3,25 bis 3,68 Å. Auch konnte die notwendige Halbschleife im Segment Q8-C11 nicht beobachtet werden. Als Modell für den Kupferthiolatcluster im Cu-MT wurde ein verzerrter Würfel vorgeschlagen (Abb. 6). In sieben seiner Ecken befinden sich die 7 Cu(I), von denen sechs dreifach und eines zweifach von Thiolatschwefeln koordiniert sind. Sechs der neun Abstände zwischen benachbarten Cu(I) besitzen mit $3,31 \text{ \AA}$ die gleiche Länge.

Ein neuer Ansatz, sich der Struktur des Kupferthiolatclusters zu nähern, bestand darin, die 3D-Struktur des MT mit einer möglichst hohen Auflösung zu bestimmen. Die Kenntnis der genauen Lage, der Cysteinylschwefel und des umgebenden freien Raums sollte die Zahl der möglichen Anordnungen der Kupferionen in diesem Cluster zumindest einengen, wenn nicht aufklären. Dafür wurden 2D NOESY-Spektren mit einem 800 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen^[Bertini et al. 2000]. Die Autoren verwiesen darauf, dass sich die Spektren von sowohl ^{13}C - als auch ^{15}N -markiertem Cu-MT von denen des unmarkierten MT unterscheiden. Aus diesem Grund war die Arbeit mit 3D-Spektren nicht möglich.

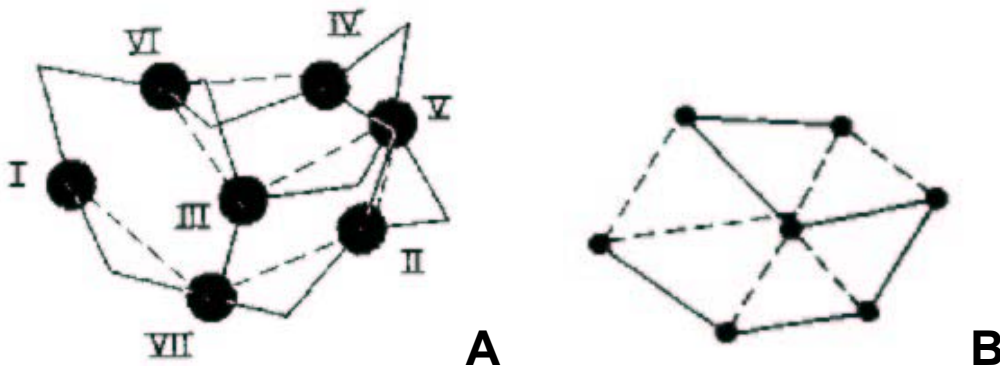


Abb. 6: Vorgeschlagene Struktur des Kupfer-Thiolat-Zentrums in Hefe Cu-MT. (A) Die Kupferionen wurden als Kugeln, die koordinativen Bindungen zu den Thiolat-Schwefeln als durchgezogene und die sechs gleich langen Cu-Cu-Abstände als gestrichelte Linien dargestellt. Cu I ist das einzige zweifach koordinierte Metallion im Cluster. (b) Diese Darstellung zeigt den verzerrten Würfel, der von den Kupferionen beschrieben wird. Für die gleich langen Cu-Cu Abstände sind durchgezogene Linien zwischen den Kupferionen eingezeichnet. ^[Aus Peterson et al. 1996]

In der Auswertung wurden bedeutungsvolle 1048 NOEs den korrespondierenden Protonen zugeordnet. Allein schon wegen der viel größeren Zahl an *constraints* für die Strukturberechnungen verglichen mit den ungefähr 200 NOEs, die Peterson et al. 1996 zugeordnet hatten, war eine Struktur mit größerer Auflösung zu erwarten. Im letzten Lauf der Strukturberechnung wurde aus den 300 generierten Strukturen die 30 mit der niedrigsten *target function* in eine Strukturfamilie zusammengefasst. Die *target function* lag im Mittel bei $0,36 \pm 0,01 \text{ \AA}^2$. Die RMSD-Werte bezogen auf die zwischen Rest 5 und 38 gemittelte Struktur waren $0,32 \pm 0,13$ und $0,61 \pm 0,15 \text{ \AA}$ für das Peptidrückgrat bzw. alle schweren Atome (Abb. 7).

Die Proteinfaltung der neuen Struktur war ähnlich der von Peterson et al. 1996. Die Überlagerung beider Strukturen führte zu einem RMSD-Wert von $1,36 \text{ \AA}$. Große Abweichungen gab es bei der Entfernung der beiden parallelen Schleifen in den Segmenten 8-11 und 31-33. Zudem zeigten einige Seitenkettenatome darunter auch die Cysteine 7, 11, 20 und 36 beträchtliche Abweichungen. Bertini et al. 2000 fanden im Segment 18-22 einen helikalen Bereich, der von der anderen Gruppe unentdeckt geblieben war.

Nachdem die Strukturbestimmung des Cu-MT mit hoher Auflösung gelungen war, sollte überprüft werden, ob sich nun eine plausible Anordnung der Cu(I)-Ionen in den Zwischenräumen finden ließe. Dazu wurden für das Strukturkalkulationsprogramm

DYANA neue Pseudoaminosäurereste definiert. Diese bestanden lediglich aus einem Metallion mit einem reduzierten van-der-Waals-Radius von 0,5 Å, wohingegen die restlichen Pseudoatome, die das Metallion in der Kette fixierten, einen van-der-Waals-Radius von null aufwiesen. Die sieben Cu(I)-Ionen wurden über eine lange Kette von speziellen Verbindungsseitenketten an das Ende der Polypeptidkette geknüpft. Die Verbindungsseitenketten waren schon in der Standardbibliothek des Programms vorhanden und bestanden aus Pseudoatomen mit einem van-der-Waals-Radius von null, so dass es dem Verbindungsstück ungehindert möglich war, die an ihm hängenden Cu(I)-Reste in das Zentrum der Polypeptidstruktur einzuführen, ohne dieselbe zu stören. Für die Lage der Cu(I)-Ionen wurden noch folgende Bedingungen eingeführt: *lower* und *upper distance limits* von 2,1 Å und 2,4 Å zwischen je einem der sieben Cu(I)-Ionen und je einem der S^γ-Atome der Cysteinylreste 7, 9, 14, 24, 30, 36 und 38. Mit diesen Bedingungen und der verlängerten Polypeptidkette wurden neue Strukturberechnungen unternommen. Die neue Familie der den Kupferthiolatcluster enthaltenden Strukturen wurde noch einer Energieminimierung unterworfen, um sterisch vernünftige Anordnungen zu finden. Es wurde nicht nur eine

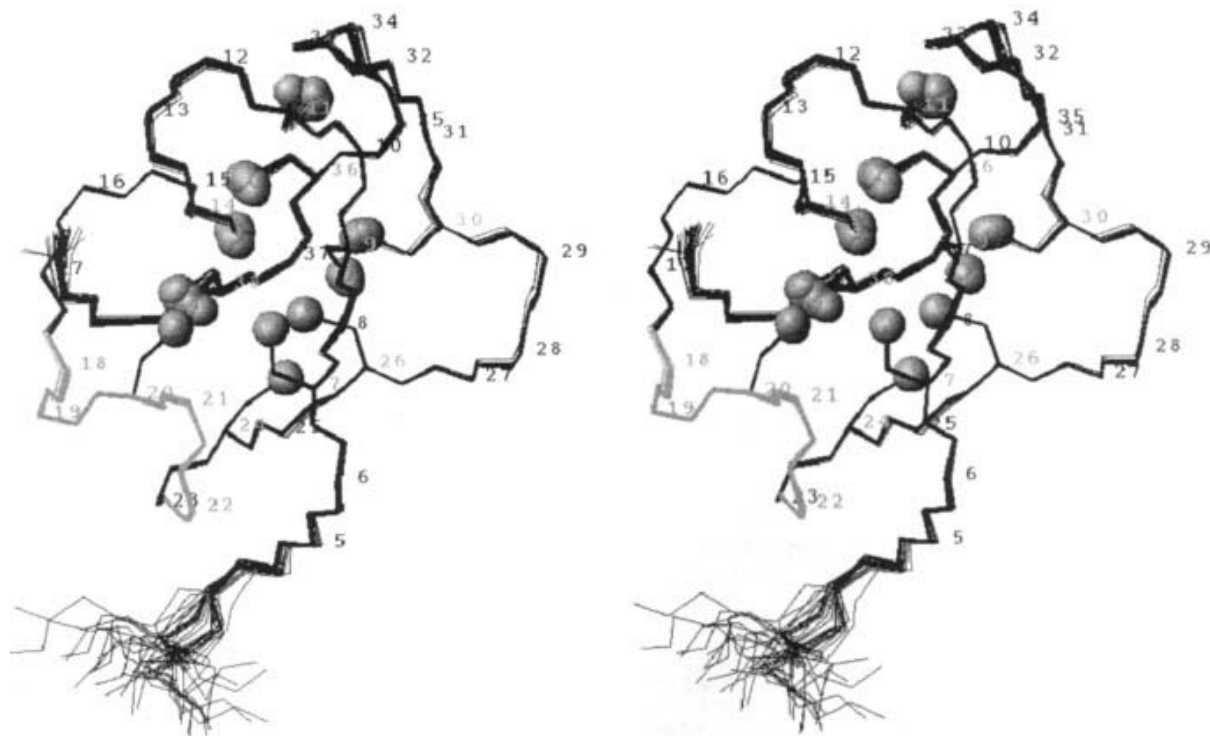


Abb. 7: Stereodarstellung der Polypeptidketten einer Familie aus 30 Strukturen. Die zehn Cysteinylseitenketten und die Schwefelatome sind dargestellt. In leichtem grau ist das kurze Helixsegment 18-22 zu sehen. ^[Bertini et al. 2000]

Anordnung, sondern ein ganzes Set chemisch plausibler Anordnungen gefunden. Darunter war auch die von Peterson et al. 1996 vorgeschlagene. Jedoch war diese nur einer unter vielen möglichen Strukturen des Kupferthiolatclusters.

Die Autoren boten als Interpretation die Möglichkeit an, dass der gesamte Cluster eine gewisse Flexibilität aufweise und die einzelnen Cu(I)-Ionen ihre Bindungspartner im Cluster wechseln könnten. Eine solche Mobilität der Metallionen innerhalb des Metallbindungszentrums von MT wurde 1996 schon von Green und Stillman beschrieben. Dies könnte wegen der damit verbundenen strukturellen Änderungen mit ein Grund dafür sein, dass es bisher noch nicht gelungen ist, brauchbare Einkristalle für die Röntgenbeugung herzustellen.

2.4 Engere Problematik

Es existiert weder die exakte Struktur des Kupferthiolatzentrums in Hefe-Cu-MT noch sind Strukturdaten jeglicher Art von Säugetier-Cu-MT bekannt. Vom Hefe-Cu-MT wurde zwar eine hochaufgelöste NMR-Struktur des Polypeptidrückgrats beschrieben, jedoch bleibt die Geometrie der Metallbindung an die Cysteinylthiolate unbekannt. Die beiden Enden des Proteins, Q1-H5 und K41-K53, zeigten sich in der NMR-Struktur sehr flexibel^[Narula et al. 1993; Bertini et al. 2000]. Daraus wurde der Ansatz entwickelt, dass verkürzte Polypeptide, denen entweder lediglich das C-terminale oder beide flexible Enden fehlen (Abb. 8), leichter kristallisieren könnten. Vorab soll eine Beeinträchtigung der Polypeptidfaltung durch die Verkürzung ausgeschlossen werden. Die vorläufigen Strukturen von nativem MT und Peptid_{AS -1-40}^[Dolderer 2002] sollen hierzu weiter verfeinert und miteinander verglichen werden. Besonderes Augenmerk wird auf die resultierenden Konformationen der Cysteinylreste zu legen sein. Für den Fall, dass die Verkürzung der Polypeptidkette keinen Einfluss auf die Struktur besitzt, soll versucht werden, Einkristalle von den verkürzten Mutanten zu erhalten. Mit diesen wäre die Kristallstruktur der Cu-MT-Fragmente samt gebundener Cu(I)-Ionen zugänglich.

Im Falle von Säugetier-MT ist die Polypeptidfaltung in der Kupfer gebundenen Form nicht bekannt. Abgeleitet von spektroskopischen Untersuchungen wurden hier verschiedene Bindungsstöchiometrien vorgeschlagen. Mittels CD, Lumineszenz und Elektronenabsorption wurde vorgeschlagen, dass beide Domänen von Ratten-MT-2 je sechs Cu(I) bänden^[Li & Weser 1992]. In einer anderen Arbeit wurden basierend auf Massenspektrometrie und CD verschiedene Zwischenstufen, wie Cu₃Zn₂- α -MT und Cu₄Zn₁- β -MT, vor der vollen Kupferbeladung von 6 Cu(I) pro Domäne postuliert^[Bofill et al. 2001]. Es interessierte, inwieweit die chemisch synthetisierten Zn(II)-haltigen Domänen von Maus-MT mit Cu(I) besetzt werden können. Lumineszenz- und CD-Messungen sollen sicherstellen, dass die Cu(I)-Bindung an die Domänen unter den gewählten Bedingungen zu vergleichbaren Ergebnissen führen, wie in den oben genannten Arbeiten beschrieben. Unter denselben Bedingungen sollen die Domänen für ¹H-NMR-Messungen titriert und von allen Proben ¹H-¹H-NOESY-Spektren aufgezeichnet werden, um für eine spätere Strukturbestimmung geeignete Spezies mit geordneter Proteinfaltung zu identifizieren.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien waren, soweit nicht anders angegeben, Reagenzien der Firma Merck, Darmstadt, in analysenreiner oder besserer Qualität. Als Hochreinwasser wurde das Millipore Wasser aus dem Wasserreinigungssystem Milli-Q mit einer Leitfähigkeit von 0,6-0,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ verwendet.

Pharmacia Biotech, Freiburg	Sephadex G-25 Sephadex G-50
Rapp-Polymere, Tübingen	Fmoc-Asn(Trt) PHB R Harz Fmoc-Ala PHB R Harz Fmoc-Lys PHB R Harz
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Acetonitril-d ₃ CD ₃ CN 99,8 Atom% D Deuteriumoxid D ₂ O 99,9 Atom% D Essig-d ₃ -säure CD ₃ COOH 99 Atom% D
RototecSpintec, Remshalden	5 mm NMR Pyrex Röhrchen 507-PP-9; 0,38 mm Wandung; 9 Zoll Länge; >300 MHz
Crystal microsystems, Oxford, UK	Micro-Bridges® aus Polystyrol
Molecular Dimensions Limited, Soham, UK	Kristallisationsplatten mit 4 x 6 Vertiefungen Deckgläser aus Glas, \varnothing 22 mm

3.2 Geräte

3.2.1 Spektrometer

3.2.1.1 Atomabsorption

Perkin-Elmer, Überlingen

Perkin-Elmer Atomabsorptionsspektral-
photometer 400 (Graphitrohrküvette),
Programmiereinheit HG 76 B, Recorder
56

3.2.1.2 Circular dichroismus

Jasco, Gross-Umstadt

Spektropolarimeter J-720

3.2.1.3 Elektronenabsorption

Beckman, Krefeld

Diodenarray-Spektralphotometer
DU 7400

3.2.1.4 Lumineszenz

Perkin-Elmer, Überlingen

Lumineszenz Spektralphotometer LS 50

3.2.1.5 Kernspinresonanz

Bruker, Karlsruhe

NMR Spektrometer AVANCE 700

Bruker, Karlsruhe

NMR Spektrometer AVANCE 800

3.2.1.6 Elektronensynchrotron

DESY, Hamburg

EMBL BW7A beamline

3.2.2 Geräte zur Präparation

Beckmann, Krefeld

Kühlzentrifuge J2-HS

Kühlzentrifuge J2-21

mit den Rotoren JA 10, JA 14 und JA 20

Bachofer, Reutlingen	Tischzentrifuge Z 229 Tischzentrifuge EBA 12
BIOXLAB, Stockholm	X-Presser 25 ml hydraulische Presse HP-25
Eppendorf, Hamburg	ECOSYN P Peptidsyntheseautomat
LKB, Stockholm	Uvicord II Fraktionssammler 7000 ULTRORAC Rekorder 42075, Kontrolleinheit 8300
Macherey Nagel, Düren	Nucleosil 100 C18 (7 µm) 250 x 10 mm HPLC-Säule
MBraun GmbH, Garching	Inertgassystem MB 30G H ₂ O/O ₂ -Analyser
Mettler	Analysenwaage
Millipore, Eschborn	Wasserreinigungssystem Milli-Q
Pharmacia Biotech, Freiburg	Fraktionssammler Frac-300 Recorder Rec-1 Einstrahl Monitor UV-1 optische Einheit Einstrahl Monitor UV-1 Kontrolleinheit
Secfroid, Lausanne	Lyophilisator
Schröder, Lübeck	Manton-Gaulin Laborhomogenisator (<i>French Press</i>)

3.3 Methoden

3.3.1 Isolierung von Hefe-Cu-Metallothionein

Für die Hefefermentation, den Hefeauflschluss und die Cu-Thioneinreinigung wurde wie früher beschrieben verfahren^[Weser & Hartmann 1991].

Der Zellaufschluss wurde mit einer *French Press* durchgeführt und mikroskopisch überprüft. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und das Zentrifugat mit Tris/HCl, pH 7,4, 0,2% β -MSH auf das doppelte Volumen verdünnt. Es folgten zwei Gelfiltrationen über Sephadex G-50 und eine Entsalzung über Sephadex G-25. Nach jedem chromatographischen Schritt wurden die Cu-MT enthaltenden Fraktionen gefriergetrocknet.

3.3.2 Peptidsynthese

Für die zwei in der engeren Problematik skizzierten Projekte wurden vier Peptide durch Peptid-Festphasen-Synthese am Syntheseautomaten ECOSYN P der Firma Eppendorf, Hamburg, hergestellt. Bei diesen handelte es sich um die verkürzten Fragmente von Hefe-MT und die beiden Domänen von Maus-MT-1 (Abb. 8 und 21). Die Peptide wurden nach der Fmoc-Strategie vom C-terminalen Ende her in Richtung N-Terminus synthetisiert^[Echner & Voelter 1988]. Als Ausgangspunkt der Synthese diente ein Fmoc-XXX-PHB-Harz, wobei XXX für die an das Harz gekoppelte C-terminale geschützte Aminosäure der zu synthetisierenden Sequenz steht. Im Fall der beiden Hefe-MT-Fragmente war dies Asparagin, dessen Säureamidgruppe zusätzlich mit einem Tritylrest als permanente Schutzgruppe versehen war, für die α - und β -Domäne waren Alanin- bzw. Lysinreste, letztere geschützt durch die *tert*-Butyloxycarbonylgruppe, an das Harz gekoppelt. Die bei der Synthese eingesetzten AS trugen die aus folgender Aufzählung hervorgehenden permanenten Schutzgruppen:

- *tert*-Butylester für Aspartatreste,
- *tert*-Butylether für Serin- und Threoninreste,
- Tritylgruppen für Asparagin-, Glutamin-, Cystein- und Histidinreste,
- *tert*-Butyloxycarbonylgruppen für Lysinreste.

Für die Kopplungsreaktionen wurde ein vierfacher Überschuss der geschützten Aminosäure, gemessen an der Zahl wachsender Ketten, und des Kopplungsreagenzes TBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium-tetrafluoroborat) gelöst in 1,2 mL DIEA (Diisopropylethylamin; 12,5% in DMF) eingesetzt. Um Racemisierungen zu verhindern, wurde Cystein als Pentafluorphenylesterderivat an den entsprechenden Stellen der Synthese zugesetzt. Vor den Kopplungsreaktionen mussten die Fmoc-Gruppen vom N-Terminus der wachsenden Kette bzw. vor der ersten Kopplung von dem an das Harz gekoppelten Aminosäurerest entfernt werden. Dies geschah mit 25% Piperidin in DMF. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppen vom N-terminalen Ende der fertigen Fragmente wurde das Peptid unter gleichzeitiger Entfernung der permanenten Schutzgruppen von der Festphase heruntergelöst. Dafür wurde das Harz 3 h bei Raumtemperatur in Trifluoressigsäure (TFA), 4,4% Ethandithiol, 2,2% Thioanisol, 2,2% Anisol, 2,2% Wasser, 0,9% Triisopropylsilan inkubiert. Die flüssige Phase wurde von der Festphase abfiltriert. Durch Waschen mit TFA wurden die noch gebundenen Peptide von der Festphase entfernt und aus den vereinigten Filtraten mit wasserfreiem Ether die Peptide präzipitiert. Das Rohprodukt wurde durch HPLC auf der Nuclosil 100 C18-Säule gereinigt und die Elution bei 214 nm verfolgt. Mittels analytischer HPLC und MALDI- oder ESI-MS wurden die Produkte auf Reinheit geprüft.

3.3.3 Rekonstitution von verkürzten Hefe-MT-Peptiden

3.3.3.1 Rekonstitution mit Cu(II) und β -Mercaptoethanol

Die apo-Peptide wurden in 400 mM KPP pH 7,4, 4% (v/v) β -Mercaptoethanol in einer Konzentration von etwa 15 mg/mL gelöst. Nach Zugabe von 7 mol Cu(II) pro mol Peptid einer 100 mM CuSO₄-Lösung wurden die Ansätze etwa 30 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurden diese über eine Sephadex G-25 gereinigt und gleichzeitig entsalzt. Die fluoreszierenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

3.3.3.2 Rekonstitution mit Tetraacetonitrilokupfer(I)perchlorat

Einige Kristalle [Cu(CH₃CN)₄]ClO₄ wurden in 66,7% (v/v) Acetonitril suspendiert. Nach dem Sedimentieren des ungelösten Anteils wurde der gesättigte Überstand

abgenommen, eventuell nochmals verdünnt und die Kupferkonzentration mittels Atomabsorptionsspektrometrie oder mit Hilfe von Bathocuproinsulfonat bestimmt.

Die apo-Peptide wurden in 60% (v/v) Acetonitril, 0,25% (v/v) β -Mercaptoethanol gelöst. Von der zuvor hergestellten Tetraacetonitrilokupfer(I)perchloratlösung wurden 7 mol Cu(I) pro mol Peptid zugefügt. Die Ansätze wurden anschließend wie unter 3.3.3.1 beschrieben behandelt.

3.3.4 Kristallisation der Hefe-MT-Fragmente

Für die spätere Kristallisation wurde das kürzere mit Kupfer rekonstituierte Hefe-MT-Fragment in deionisiertem Wasser, das 0,1% (v/v) β -Mercaptoethanol enthielt, in einer Konzentration von 1,2 mg/mL gelöst und bis zu seiner Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Kristallisation wurde nach der *sitting-drop*-Methode in Kristallisationsplatten mit 4 x 6 Vertiefungen durchgeführt. Proteintropfen von 5 – 10 μL wurden auf Microbridges pipettiert und Kaliumdihydrogenphosphat und Lithiumbromid in Endkonzentrationen von 25 mM bzw. 1 mM zugegeben. Im Reservoir befand sich 1 mL 3,9 M Ammoniumsulfat, gegen das der Tropfen per Dampfdiffusion ins Gleichgewicht kommen sollte. Nach ungefähr 14 h begannen in den Tropfen Kristalle zu wachsen.

Die Kristallisationsansätze wurden in Abständen immer wieder unter dem Mikroskop beobachtet, um den genauen Zeitpunkt der Kristallentstehung zu kennen. Die Kristalle wurden schließlich am Ort der Messung hergestellt, so dass das Beugungsexperiment durchgeführt werden konnte, sobald die Kristalle eine akzeptable Größe erreicht hatten (nach ca. 17 h). Dies war wichtig, um eine übermäßige Phosphatsättigung innerhalb des Tropfens zu verhindern, da dies wiederum zur Ausbildung von Salzmikrokristallen auf der Oberfläche des Proteinkristalls geführt hätte.

3.3.5 Präparation der NMR-Proben von Hefe-MT und seinen zwei Fragmenten

Natives Cu-MT bzw. die beiden kupferrekonstituierten Fragmente wurden in 18 mM KPP pH 6,5, 10% D_2O , 0,1% β -Mercaptoethanol in einer Endproteinkonzentration von 3,6 mM gelöst und jeweils 550 μL in NMR-Röhrchen überführt. Die Pufferlösung,

in der die Polypeptide gelöst werden sollten, wurden zuvor einige Minuten mit Argon sauerstofffrei gewaschen. Die befüllten NMR-Röhrchen wurden 10 min mit Argon begast und anschließend luftdicht verschlossen. Die Messungen fanden direkt nach der Probenvorbereitung statt.

3.3.6 Präparation der NMR-Proben der beiden Domänen von Maus-MT-1

3.3.6.1 Überlegungen zur Vorgehensweise

Im Gegensatz zu Hefe-MT sind Vertebraten-MT insbesondere deren kupferbeladene Formen äußerst oxidationsempfindlich. Daher mussten ab dem Lösen der metallfreien Domänen alle Schritte der Probenpräparation unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt werden. Da Oxidationsreaktionen bei neutralem und alkalischem pH begünstigt ablaufen, wurden die apo-Peptide zuerst in einem Acetatpuffer bei pH 5,0 gelöst, dann wurde Zn(II) zugegeben und schließlich mit KPP der pH auf 6,5 angehoben. Erst bei diesem pH konnten die Zn(II)-Ionen an die apo-Peptide binden. In ihrer zinkbeladenen Form sind diese zu einem gewissen Grade vor Oxidation geschützt. Cu(I) neigt in wässriger Lösung zur Disproportionierung. Um dies zu verhindern, wurde dem Puffer, in dem die α -Domänen gelöst wurden, 20% Acetonitril zugesetzt. Wegen der schwächeren Zn(II)-Bindung an die β -Domäne und einer möglichen Interaktion zwischen Zn(II) und Acetonitril wurden zu Ansätzen dieser Domäne nur 5% Acetonitril zugesetzt. Durch die Anwesenheit des weichen Liganden, der Nitrilgruppe, wurde Cu(I) in seiner monovalenten Form stabilisiert.

Für die Cu(I)-Titration der beiden Domänen mussten jeweils 7 Ansätze hergestellt werden, um in Schritten von 1 Äquivalent Cu(I) bezogen auf die Stoffmenge Peptid die Titrationsschritte 0 – 6 Äquivalente Cu(I) abzudecken. Als Cu(I)-Agens diente Tetraacetonitrilokupfer(I)perchlorat. Dafür wurden einige Kristalle des Kupfer(I)komplexes in 50% Acetonitril gelöst. Der Überstand konnte abgenommen und nach erfolgter Kupferbestimmung für die Titration eingesetzt werden. Die fertigen Ansätze wurden in NMR-Röhrchen überführt, mit Argon überschichtet und die Öffnungen der Röhrchen durch Abschmelzen versiegelt. In diesem Zustand waren die Proben über Monate hinweg stabil.

3.3.6.2 Herstellung des Cu(I)-Agens

Der Komplex Tetraacetonitrilokupfer(I)perchlorat wurde nach der Methode von Hemmerich und Sigwart (1963) synthetisiert. Dafür wurden 300 mg Cu_2O mit 2,3 mL HClO_4 und 9,5 mL CD_3CN ca. 30 min bei 100°C im Rücklauf gekocht, bis keine festen Partikel mehr zu sehen waren. Beim Abkühlen fiel der weiße Komplex aus. Dieser wurde dreimal mit CD_3CN gewaschen. Aus einigen Kristallen des Komplexes wurde in 50% $\text{CD}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ eine gesättigte Lösung hergestellt. Von dieser wurde der Überstand abgenommen und mit 50% $\text{CD}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ auf das 1,4-fache Volumen verdünnt, um sicher zu gehen, dass keine ungelösten Partikel mehr vorhanden waren. Mit Bathocuproinsulfonat wurde die Cu(I)-Konzentration bestimmt. Sie lag üblicherweise im Bereich von 60 mM.

3.3.6.3 Probenpräparation

Ca. 0,6 μmol der entsprechenden Domäne wurden eingewogen und in 450 μL 15 mM Acetat- d_3 -puffer (3-fach deuterierte Essigsäure) pH 5,0, 20% Acetonitril- d_3 (3-fach deuteriert), 13,35% D_2O gelöst. Im Fall der β -Domäne enthielt der Puffer wie in Abschnitt 3.3.6.1 dargelegt nur 5% Acetonitril- d_3 . Die eingesetzte Stoffmenge der Domäne wurde über die genaue Einwaage und die molare Masse der jeweiligen Domäne ermittelt. Dabei musste beachtet werden, dass die Peptide aufgrund der Bedingungen der Peptidsynthese als TFA-Salze vorlagen:

$M_r(\alpha\text{-MT}): 3592$

$M_r(\beta\text{-MT}): 3470$

Von einer 100 mM ZnCl_2 -Lösung wurden 4 Äquivalente Zn(II) zu den Ansätzen der α -Domäne und 3 Äquivalente Zn(II) zu denen der β -Domäne hinzugefügt. Es folgten die Zugabe von 60 μL 1 M KPP pH 6,5, der für den jeweiligen Titrationsschritt notwendigen Menge Cu(I) und von H_2O bis zu einer Proteinkonzentration von 1 mM. Alle Präparationsschritte wurden in der *glove-box* unter einer N_2 -Atmosphäre mit weniger als 1 ppm O_2 durchgeführt. Die fertigen Proben wurden in NMR-Röhrchen überführt, mit Argon überschichtet und anschließend durch Abschmelzen der Röhrchen versiegelt.

3.3.7 Analytik

3.3.7.1 Atomabsorption

Kupferkonzentrationen und über diese die Konzentrationen des nativen Hefe-MT bzw. der beiden Fragmente wurden atomabsorptionsspektrometrisch bestimmt. Die Messungen wurden am Perkin-Elmer Atomabsorptionsspektrometer 400 mit Graphitrohrküvette durchgeführt. Als Referenz diente eine 5 μM Kupfersulfatlösung, 10 μM EDTA.

3.3.7.2 Elektronenabsorption

Die Konzentrationen von Cu(I) konnten mit Hilfe von Bathocuproinsulfonat bestimmt werden. Dieses bildet mit gebundenem Cu(I) einen farbigen Komplex. Die Absorption wurde mit einem Beckmann Spektralphotometer DU 7400 bei 480 nm gegen Wasser gemessen. Über eine Eichgerade konnten auf diese Weise die Cu(I)-Konzentrationen in einem Bereich von 10 bis 100 μM ermittelt werden.

3.3.7.3 Lumineszenz

Mit dem Perkin-Elmer Lumineszenzspektralphotometer LS 50 wurden Fluoreszenzspektren im Bereich von 500 bis 700 nm bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm aufgenommen. Für die Unterdrückung der Emission 2. Ordnung der Strahlungsquelle wurde ein 390 nm-Kantenfilter verwendet. Die Excitations- und Emissionsspalte wurden auf 15 mm bzw. 20 mm eingestellt.

3.3.7.4 Circular dichroismus

CD-Spektren wurden mit dem Jasco J-720 Spektralpolarimeter zwischen 400 und 225 nm gemessen. Die Geschwindigkeit der Aufnahme betrug 100 nm/min bei einer Ansprechzeit des Geräts (*response*) von 1s. Um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wurden 5 Spektren akkumuliert.

3.3.7.5 Kernspinresonanz

Hefe-MT und seine zwei verkürzten Formen

Die ^1H -NMR Spektren wurden mit dem Spektrometer AVANCE 800 der Firma Bruker bei einer Protonen-Larmor-Frequenz von 800,13 MHz aufgenommen. Das Wassersignal wurde während des Relaxationsdelays und während der Mischzeit

gesättigt. Die TPPI NOESY Spektren wurden bei 300 K in H₂O/D₂O (90:10) mit einer spektralen Breite von 12,5 ppm aufgenommen. Die Wiederholungszeit betrug 1,1 s, die Mischzeit 120 ms. Bedingungen für die Aufnahme der TPPI TOCSY Spektren waren 298 K, Wiederholungszeit von 1 s und *spin lock* von 60 ms. Alle 2D Spektren bestanden aus 2048 Datenpunkten in der F2-Dimension. Für jedes F1-Inkrement wurden 32 Scans akkumuliert.

Domänen von Maus-MT-1

Die ¹H-NMR Spektren wurden mit dem Spektrometer AVANCE 700 der Firma Bruker aufgenommen. Das Wassersignal wurde während des Relaxationsdelays und während der Mischzeit gesättigt. Die TPPI NOESY Spektren wurden bei 283 K und 298 K in H₂O/D₂O (90:10) mit einer spektralen Breite von 14 ppm aufgenommen. Die Wiederholungszeit betrug 2 s, die Mischzeit 600 ms. Bedingungen für die Aufnahme der TPPI TOCSY Spektren waren 283 K und ein *spin lock* von 60 ms. Alle 2D Spektren bestanden aus 1024 Datenpunkten in der F2-Dimension und 2048 Datenpunkten in der F1-Dimension. Für jedes F1-Inkrement wurden 16 Scans akkumuliert.

3.3.7.6 Kristallographie

Zwei Experimente wurden am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg am EMBL BW7A-Strahlengang, der mit einem MAR CCD 165 mm Detektor ausgestattet war, bei einer Temperatur von 100 K durchgeführt. Eine SAD-Messung (Single Anomalous Dispersion) wurde bei der Wellenlänge der Kupferkante (1,377 Å) vorgenommen. Bei von der Kupferkante entfernt liegender Energie wurde mit einer Wellenlänge von 0,919 Å das zweite Experiment verwirklicht. Der erste Kristall beugte bis zu einer Auflösung von 1,7 Å, der zweite bis zu 1,4 Å. Beide Kristalle gehörten zur kubischen Raumgruppe P4₃32 (a = 62,17 Å) mit einem Molekül in der asymmetrischen Elementarzelle und einem Wasseranteil von ungefähr 50%. Die Daten wurden mit der Rotationsmethode in Stufen von 0,5° aufgezeichnet. Die zwei Datensätze wurden mit dem Programm MOSFLM^[Leslie 1991] prozessiert und mit dem Programm SCALA^[Evans 1993] skaliert. Dafür wurden die Optionen TAILS und SECONDARY (letztere mit dem TIE SURFACE Befehl eingeschränkt) verwendet, um eine empirische Absorptionskorrektur zu erhalten.

3.3.8 Analyse der NMR-Daten

Alle NMR-Daten wurden mit den Bruker Softwarepaketen XWINNMR verarbeitet und in die entsprechenden Analyseprogramme exportiert.

3.3.8.1 Hefe-MT und dessen verkürzte Formen

Mit dem Programm XEASY der ETH Zürich wurden die 2D-NOESY- und TOCSY-Spektren von intaktem Hefe-MT, Peptid_{AS -1-40} und Peptid_{AS 5-40} analysiert^[Eccles et al. 1991]. In einem ersten Schritt wurden alle Kreuzsignale markiert (*peak picking*). Dabei wurde für das jeweils untersuchte NOESY-Spektrum eine Peakliste geschrieben. Dies ist eine Datei, welche die einzelnen Kreuzsignale mit ihren jeweiligen chemischen Verschiebungen auflistet. Durch Vergleich der aus der Strukturbestimmung des nativen Cu-MT stammenden Daten^[Bertini et al. 2000] mit der neuen Peakliste wurde eine Protonenliste generiert. In dieser Datei sind die chemischen Verschiebungen der einzelnen Protonen aufgelistet. Über die Peak- und Protonenlisten war die Zuordnung der Kreuzsignale zu den miteinander wechselwirkenden Protonen vollständig und eindeutig. Für den Datenvergleich wurden die Peak- und Protonenliste aus den veröffentlichten Daten und die neu erstellte Peakliste in das Programm ASS^[Assfalg et al. 2002] eingelesen. Dieses suchte innerhalb eines vorgegebenen Toleranzbereichs nach übereinstimmenden Kreuzsignalen und Signalmustern, ordnete diese zu und erstellte eine Protonenliste. In XEASY wurden alle automatisch zugeordneten Kreuzsignale auf Korrektheit überprüft und fehlende Zuordnungen ergänzt. Die Überprüfung der automatischen Zuordnung geschah über die Strategie der sequentiellen Zuordnung (*sequential assignment*). Dieser liegt zugrunde, dass das Proton am α -C-Atom eines Aminosäurerestes dem Amidproton des nächsten Restes räumlich so nahe steht, dass dadurch ein NOE im Spektrum auftreten muss. Die chemischen Verschiebungen aller Protonen im Hefe-MT waren bereits bei früheren Untersuchungen bestimmt worden^[Narula et al. 1993; Bertini et al. 2000]. Zumindest im intakten Hefe-MT sollten die chemischen Verschiebungen – die Probenpräparations- und Aufnahmebedingungen waren dieselben wie bei der früheren Strukturbestimmung – in der Nähe der veröffentlichten Werte angetroffen werden, bei Strukturidentität auch die der verkürzten Formen.

Die Volumina unter den Kreuzsignalen wurden interaktiv integriert und von XEASY in die jeweilige Peakliste geschrieben. Die NOESY-Kreuzsignalintensitäten wurden mit

dem Programm CALIBA in interatomare Maximalabstände (*upper distance limits*) umgewandelt und in eine neue Ausgabedatei, das *upl-file*, geschrieben^[Güntert, Braun & Wüthrich 1991].

Das Strukturkalkulationsprogramm DYANA las die *upper distance limits* ein und berechnete, ausgehend von Zufallsstrukturen, durch simuliertes *annealing* in jedem Programmdurchlauf eine vorgegebene Anzahl von Strukturen^[Güntert, Mumenthaler & Wüthrich 1997]. Diese wurden über *target functions*, in die einfluss, wie gut die *upper distance limits* erfüllt waren, bewertet. Circa 10% der Strukturen mit den besten *target functions* wurden zu einer Strukturfamilie zusammengefasst. Die Abweichung der einzelnen Strukturen von der gemittelten Struktur wurde über den RMSD-Wert (*random mean square deviation*) angegeben und war ein Maß für die Qualität einer Familie. Idealerweise lag dieser Wert möglichst nahe an 0 Å (alle Strukturen sind identisch), der für den Mittelwert der *target functions* zwischen 0 und 1 Å².

Durch stereospezifische Zuordnung der Protonen prochiraler Zentren wurden weitere Bedingungen in die Strukturberechnungen eingeführt. Dafür verglich das Programm GLOMSA eine Strukturfamilie aus einem vorangegangenen DYANA-Programmdurchlauf mit der entsprechenden *upl-Datei*^[Güntert, Braun & Wüthrich 1991]. Als Ausgabe erschien für jede Wechselwirkung von Protonen eines prochiralen Zentrums mit anderen Protonen, ob die Zuordnung in den *upl-Daten* mit den schon berechneten Strukturen konsistent war (*as input*) oder ob die entsprechenden Protonen in umgekehrter Reihenfolge zugeordnet werden mussten (*reversed*). Diese Ergebnisse wurden in der Protonenliste umgesetzt und die entsprechenden Protonen für DYANA als stereospezifisch zugeordnet kenntlich gemacht. Mit dieser zusätzlichen Information wurden die prochiralen Zentren bei der Berechnung als eindeutig zugeordnet behandelt und nicht mehr die Mittelwerte über die Daten der einzelnen Protonen gebildet.

Basierend auf der Annahme, dass alle Cu(I) im Hefe-MT in einem Cluster gebunden sind, war zu erwarten, dass alle Metall bindenden Cysteinyreste in gewisser räumlicher Nähe zueinander stehen müssten. Deshalb wurden für alle Cu(I) koordinierenden Schwefelatome untereinander *upper distance limits* von 10,00 Å und *lower distance limits* von 3,40 Å eingeführt^[Bertini et al. 2000].

Die ausgegebenen Strukturdateien im *pdb-Format* wurden mit *BXAM* weiter analysiert. Auf diese Weise wurden gemittelte Strukturen und die RMSD-Werte der Strukturfamilien zu den gemittelten Strukturen berechnet. Dafür wurden jedoch

lediglich die Reste 5 bis 38 berücksichtigt, da die N- und C-terminalen Enden sehr flexibel waren.

Für die grafische Darstellung der Proteinstrukturen stand das Programm MOLMOL zur Verfügung^[Koradi, Billeter & Wüthrich 1996]. Dieses verarbeitete Dateien im pdb-Format, wie sie bei den zuvor beschriebenen Arbeitsschritten erzeugt wurden.

3.3.8.2 Domänen von Maus-MT-1

Im Gegensatz zur Arbeit mit den NMR-Daten zu Hefe-MT wurden die prozessierten 2D-NMR-Spektren der beiden Domänen von Maus-MT-1 mit dem Programm SPARKY analysiert^[Goddard & Kneller]. Die Signalzuordnung wurde jeweils nach der Strategie des *sequential assignments* durchgeführt. Nach der Integration der Peaks wurden die Daten DYANA-kompatibel in Peak- und Protonenlisten konvertiert. Der weitere Strukturberechnungsprozess verlief weitestgehend wie oben beschrieben. Folgende zusätzliche Strukturbedingungen wurden bei verschiedenen Strukturberechnungen eingeführt:

- Für den Fall von Zn_xCu_3 - α MT wurden unter der Annahme, dass sich innerhalb des Proteins ein einziger Metallthiolatcluster befindet und die einzelnen Cysteinylschwefelatome deshalb nicht allzu weit voneinander entfernt sein können, analog der Strukturbestimmungen der Hefe-Peptide lower und upper distance limits für alle Cysteinylschwefelatome untereinander von 3,40 Å bzw. 12,00 Å hinzugefügt.
- Da Strukturidentität zwischen Zn_4 - und Cd_4 - α MT vermutet wurde, wurden Bedingungen für die Metallpositionen innerhalb der Polypeptidkette in die Strukturberechnungen mit aufgenommen. Dazu wurden 4 Metallatome wie in Bertini et al. 2000 beschrieben in die Sequenzdatei geschrieben. Diese waren mit der eigentlichen AS-Sequenz der α -Domäne und untereinander über je 25 *linker*-Reste verknüpft. Zwischen den Metallatomen und den sie in der Cd_4 - α MT-Struktur koordinierenden Cysteinylschwefelatomen (Abb. 28, Abschnitt 4.2.3.1) wurden *lower* und *upper distance limits* von 2,20 Å und 3,10 Å vorgegeben.
- Nachdem die Struktur von Zn_yCu_4 - β MT fertig gestellt war, sollte überprüft werden, ob sich Metallbindungsstellen innerhalb der Cysteinylothiolatanordnung finden ließen. Dafür wurde wie im vorangegangenen Absatz beschrieben einzelne Metallatome in die Strukturberechnung hinzugefügt. Verschiedene

Kombinationen von Thiolatschwefeln wurden als potentielle Liganden für die Metallatome durchprobiert. Abstandsinformationen zu den Abständen zwischen Metallatomen und koordinierenden Schwefelatomen bzw den Schwefelatomen einer Bindungsstelle untereinander wurden zugewiesen (Tab. 2).

Koordination	Art der Atome	Upper distance limit	lower distance limit
Tetraedrisch	Me—SG	2,50	2,30
	SG—SG	4,25	3,55
Trigonal	Me—SG	2,40	2,20
	SG—SG	4,30	3,50

Tab. 2: Abstandsbedingungen für in die Strukturberechnungen eingeführte Metallatome. Je nach Art der betrachteten Koordinationsstelle (tetraedrisch oder trigonal) wurden die Abstände zwischen Metallen (Me) und den Cysteinylschwefelatomen (SG) oder den Cysteinylschwefelatomen untereinander festgelegt.

3.3.9 Analyse der Beugungsdaten

Die Analyse der anomalen Patterson Karte wurde mit dem Programm SOLVE durchgeführt. Dafür wurde der 31-fach redundante Datensatz, der an der Kupferkante (1,377 Å) aufgezeichnet worden war, verwendet. Die Positionen von 7 Kupferatomen wurden auf diese Weise erhalten. Die vorläufigen Phasen wurden mit der Technik der Dichteveränderung (*density modification technique*) verbessert, indem im Programm RESOLVE^[Terwilliger & Berendzen 1999] ein Wassergehalt von 50% eingestellt wurde. Die Kettenaufspürfunktion von RESOLVE konnte keinen Aminosäurerest in der Elektronendichtekarte aufspüren, wohingegen unter Verwendung von ARP/wARP^[Perrakis, Morris & Lamzin 1999] 20 der 36 Reste ohne Seitenketten ausfindig gemacht wurden. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die Elektronendichtekarte deutlich die Position eines zusätzlichen achten Kupferions. Dieses wurde weiter bestätigt durch das Vorhandensein von 8 großen Signalen in der anomalen Differenz-Fourier-Karte.

Durch die Benutzung des Datensatzes mit der höheren Auflösung konnten die Phasen ausgeweitet und 34 der 36 Aminosäurereste aufgefunden werden. Mit dem Programm XtalView^[McRee 1999] wurden die zwei fehlenden Reste und die Seitenketten korrekt von Hand hinzugefügt.

Eine Verfeinerung dieses Datensatzes wurde mit REFMAC5^[Collaborative computational project number 4 1994; Murshudov, Vagin & Dodson 1997]; erreicht. Zwischen den Verfeinerungszyklen wurden die Modelle unter Benutzung von XtalView^[McRee 1999] von Hand nachbearbeitet. Wassermoleküle wurden durch die entsprechende Standardprozedur im Programm ARP/wARP^[Perrakis, Morris & Lamzin 1999] hinzugefügt. Mit dem Programm Procheck^[Laskowski et al. 1993] wurde die stereochemische Qualität des verfeinerten Modells bewertet. Im Ramachandran Diagramm befand sich keiner der Aminosäurereste in verbotenen Regionen.

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass vorhergehende Versuche, die Struktur aufzuklären, ohne Erfolg geblieben waren. In Grenoble wurde dafür am Strahlengang ESRF ID-29 ein 3-Wellenlängen-MAD-Datensatz (Multiple Anomalous Dispersion) aufgezeichnet. In Triest wurde an ELETTRA ein SAD-Experiment durchgeführt. Jedes Mal waren Signale von Salzmikrokristallen, die auf der Oberfläche des Proteinkristalls gewachsen waren, im Beugungsmuster vorhanden. Die Beugungsintensitäten des Proteinkristalls wurden davon überlagert. Dazu hatten diese Datensätze in keinem Fall eine Redundanz, die höher als das 15-fache war. Dagegen hatte der Datensatz, der zur erfolgreichen Strukturaufklärung führte, eine 31-fache Redundanz und eine feinere Aufstückelung des Drehwinkels pro Datenaufnahme ($0,5^\circ$ statt 1°). Störende Signale von Salzmikrokristallen waren in diesem Fall auch nicht vorhanden.

Interessanterweise konnte die Struktur mit einem Datensatz niedrigerer Redundanz nicht gelöst werden. Das heißt, dass in diesem Fall trotz einem äußerst großen anomalen Signal die Redundanz, also die Genauigkeit, der Daten der entscheidende Faktor für die erfolgreiche Strukturbestimmung war.

Die Koordinaten der gelösten Struktur wurden in der Protein Data Bank unter dem Zugangscode 1RJU abgelegt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Hefe-Metallothionein

4.1.1 NMR-Struktur der Cu-Thionein-Fragmente

Jahrelang waren Versuche, Hefe-Cu-MT für Röntgendiffraktionsexperimente zu kristallisieren, in verschiedenen Laboratorien erfolglos geblieben^[Luchinat et al. 2003]. Aus diesem Mangel heraus wurde an NMR-Strukturen mit zunehmender Genauigkeit gearbeitet^[Peterson, Narula & Armitage 1996; Bertini et al. 2000]. Jedoch blieb die Struktur des Kupferthiolat-Clusters innerhalb der Polypeptidmatrix unklar. Die vier N-terminalen und die dreizehn C-terminalen Aminosäurereste waren in der NMR-Struktur ungeordnet. Dies führte zu der Idee, dass verkürzte Peptide, denen das C-terminale Ende (Peptid_{AS -1-40}) oder beide Enden (Peptid_{AS 5-40}) fehlen, möglicherweise besser kristallisieren könnten (Abb. 8).

	-1	10	20	30	40	50
Intaktes MT	Q	NEGHECQCQ	CGSCKNNEQC	QKSCSCPTGC	NSDDKCPCGN	KSEETKSCC SGK
Peptid _{AS -1-40}	Y	QNEGHECQCQ	CGSCKNNEQC	QKSCSCPTGC	NSDDKCPCGN	
Peptid _{AS 5-40}		HECQCQ	CGSCKNNEQC	QKSCSCPTGC	NSDDKCPCGN	

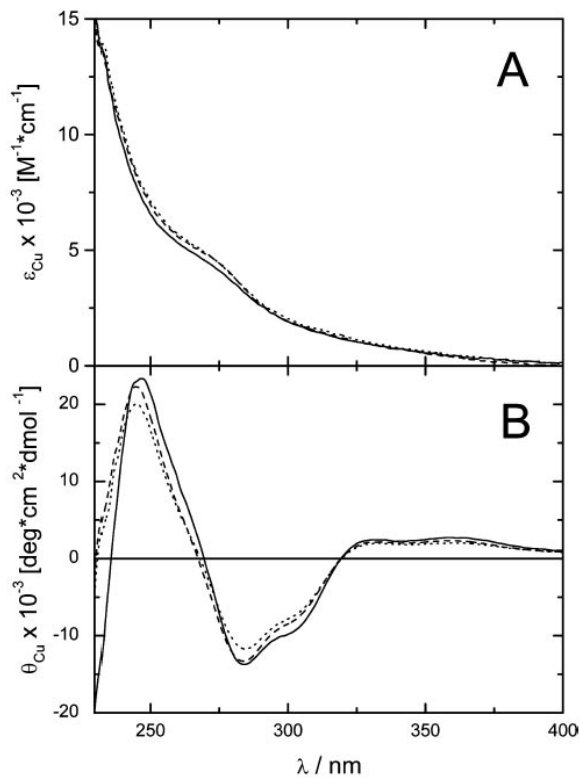
Abb. 8: Aminosäuresequenzen der zwei verkürzten Formen, Peptid_{AS -1-40} und Peptid_{AS 5-40}, und des intakten Hefe-Cu-MT

Die beiden verkürzten Peptide wurden mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Das Rohprodukt wurde mit HPLC auf einer Nucleosil 300 C18 (5 µm) 250 x 10 mm Säule gereinigt. Ein Gradient von 10 bis 90% Lösung B wurde in 36 min durchlaufen (Lösung A: 0,07% TFA/H₂O; Lösung B: 0,059% TFA in 80% CH₃CN). Die Elution wurde bei 214 nm verfolgt (Abb. 9 und 10). Anhand der Elutionsprofile ist zu erkennen, dass neben den Produktpeaks keine weiteren Peaks vorhanden sind. Um zu kontrollieren, ob es sich bei den Peptiden um die gewünschten Produkte handelt, wurden Massenspektren der beiden Peptide aufgezeichnet (Abb. 9 und 10). Für das längere Fragment wurde eine durchschnittliche Masse von 4434,80 Da und eine monoisotopische Masse von 4431,57 Da theoretisch berechnet. Die tatsächliche

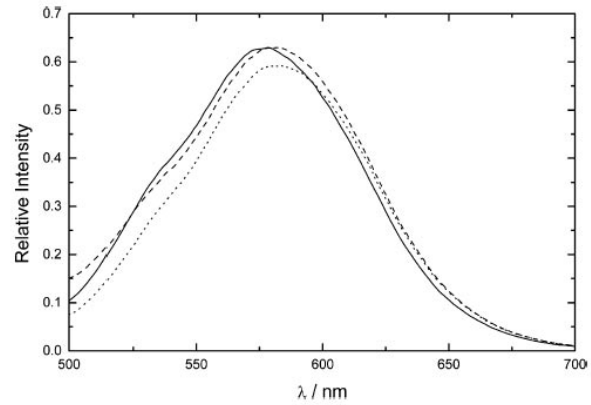
Messung ergab 4439,2 Da und weicht somit um weniger als 1⁰/₁₀₀ von der theoretisch berechneten durchschnittlichen Masse ab. Die Abweichung ist höchstwahrscheinlich auf nicht optimale Kalibrierung des MALDI-MS-Gerätes zurückzuführen. Die Masse des kürzeren Peptides wurde mit ESI-MS gemessen. Im Spektrum sind die drei- und vierfach positiv geladenen Spezies zu sehen anhand derer die Masse des Peptides auf 3841,8 Da bestimmt wurde. Sie lag somit genau zwischen der durchschnittlichen theoretischen Masse von 3843,22 Da und der theoretischen monoisotopischen Masse von 3840,34 Da.

In einer früheren Arbeit wurden physikochemischen Eigenschaften der zwei verkürzten Fragmente mit denen des nativen MT verglichen^[Dolderer 2002]. Elektronenabsorption, CD und Lumineszenz von Peptiden und nativem MT waren nahezu gleich hinsichtlich Form und Intensität der Spektren (Abb. 11 und 12). In den Elektronenabsorptionsspektren konnten keine Unterschiede entdeckt werden. Die CD-Spektren von nativem MT und Peptid_{AS -1-40} waren im Wesentlichen identisch, wobei die Schulter bei 303 nm im Spektrum des Peptids weniger ausgeprägt war. Wildtyp-MT hatte in seinem Spektrum einen x-Achsen-Durchgang bei 235 nm, der im Vergleich zu den Spektren der verkürzten Peptide um ungefähr 5 nm rotverschoben war. Erklärbar ist dieses Phänomen durch die unterschiedliche Größe der Polypeptide, da in diesem spektralen Bereich Übergänge des Polypeptidrückgrats bereits zu den chiroptischen Eigenschaften beitragen. Auch transiente Interaktionen von Cysteinylseitenketten mit Cys49 und Cys50 und Disulfidbrückenbildung mit β -Mercaptoethanol konnten nicht vollständig ausgeschlossen werden. Etwas verringerte Intensitäten über das ganze Spektrum hinweg zeigten sich in manchen Fällen für Peptid_{AS 5-40}.

Um die Lumineszenzspektren besser vergleichen zu können, wurden alle Proben auf exakt die gleiche Kupferkonzentration eingestellt. Überraschenderweise besaßen Wildtyp-MT und Peptid_{AS -1-40} gleiche Lumineszenzintensitäten, wohingegen die des Peptids_{AS 5-40} um ca. 5% reduziert war. Die Schulter bei 530 nm war in den Spektren aller drei Spezies zu sehen. Die reduzierte Lumineszenzintensität von Peptid_{AS 5-40} könnte darauf zurückzuführen sein, dass die verkürzte Polypeptidmatrix geringeren Schutz vor Lumineszenzlöschung durch das Lösungsmittel bietet. Die bisher präsentierten spektroskopischen Eigenschaften von nativem Hefe-MT und seiner zwei verkürzten Mutanten deuten an, dass der oligonukleare Kupferthiolatcluster die signifikante Verkürzung der Polypeptidketten unbeschadet überstanden hatte.



↑ **Abb. 11:** Elektronenabsorption (A) und Circular dichroismus (B) von nativem MT (—), Peptid_{AS -1-40} (- - -) und Peptid_{AS 5-40} (.....) in 0,1% β -Mercaptoethanol, pH 7. ϵ - und θ -Werte sind als ϵ_{Cu} bzw. θ_{Cu} angegeben. [Luchinat et al. 2003]



↑ **Abb. 12:** Lumineszenz von nativem MT (—), Peptid_{AS -1-40} (- - -) und Peptid_{AS 5-40} (.....) in 0,05% β -Mercaptoethanol, pH 7, nach 10 min Begasen mit Argon. Alle Spektren wurden bei 25°C aufgenommen. Spaltweiten von 15 mm bzw. 20 mm wurden an den Excitations- bzw. den Emissionsmonochromator verwendet. Die Anregungswellenlänge lag bei $\lambda = 300$ nm. [Luchinat et al. 2003]

Der Vergleich der 1H - 1H -NOESY-Spektren der drei Spezies sollte die These der strukturellen Ähnlichkeit weiter untermauern [Luchinat et al 2003]. Tatsächlich blieben die Spin-Muster aller drei Spektren erhalten (Abb. 13). Die chemischen Verschiebungen der verkürzten Peptide waren um mehrere Hundertstel gegenüber denen des Wildtypproteins verschoben. Im Fall von Peptid_{AS 5-40} kamen auch größere Abweichungen von 0,2 - 0,3 ppm vor. Aus der Tatsache, dass das Fehlen der dreizehn C-terminalen Aminosäurereste einen geringeren Einfluss auf die chemischen Verschiebungen hatte als die zusätzliche Entfernung der vier N-terminalen Aminosäurereste, kann geschlossen werden, dass das C-terminale Ende weniger mit dem Rest des Polypeptids interagiert als das N-terminale. Eine genauere Untersuchung der Differenzen der chemischen Verschiebung zeigt die größten Abweichungen in den Abschnitten 36-39 und 22-28. Beide sind in der Tat in Reichweite des N-terminalen Endes 1-4 und wären daher in der Lage mit diesem transiente Interaktionen einzugehen, auch wenn diese nicht stark genug sind, um die

Polypeptidfaltung nachweisbar zu beeinflussen. Diese Vermutung wird durch das Vorhandensein einiger NOEs zwischen den Resten 4 und 5 und dem Abschnitt 22-28 bestätigt. Schon früher wurden NOEs zwischen Aminosäurerest 5 und den Resten 23-26 beobachtet^[Peterson et al. 1996].

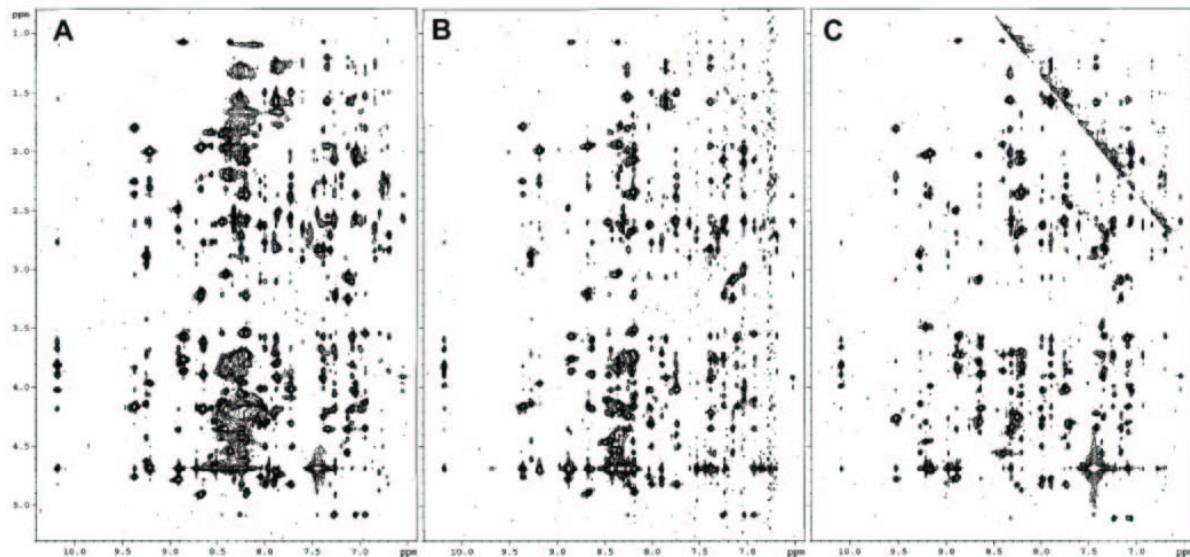


Abb. 13: Ausschnitte aus den 2D NOESY Spektren von intaktem Hefe-Cu-Thionein (A), Peptid_{AS} ⁻¹⁻⁴⁰ (B) und Peptid_{AS} ⁵⁻⁴⁰ (C) aufgenommen mit einem 800 MHz Spektrometer. Details zu Probenvorbereitung und Aufnahmeparameter sind im Kapitel Material und Methoden nachzulesen.^[Luchinat et al. 2003]

Strukturberechnungen wurden für das Wildtyp-Protein und die längere der beiden Mutanten durchgeführt. Während des letzten Laufs von DYANA wurden je 100 Konformere für das native MT und Peptid_{AS} ⁻¹⁻⁴⁰ erzeugt. Die jeweils 10 besten Strukturen wurden in Strukturfamilien zusammengefasst. Die durchschnittlichen Zielfunktionen waren 0,49 Å² bzw. 0,65 Å². Die RMSD-Werte lagen bei 0,27 Å bzw. 0,17 Å für das Polypeptidrückgrat und bei 0,56 Å bzw. 0,47 Å für die schweren Atome. Die überlagerten Strukturfamilien zeigten die gleiche Proteinfaltung und sehr ähnliche Positionen für die Metall bindenden Cysteinylschwefelatome (Abb. 14).

Beim Vergleich zwischen der erneut bestimmten Struktur des Wildtyp-Hefe-MT mit der bereits veröffentlichten^[Bertini et al. 2000] wurden keine größeren Unterschiede bezüglich der Proteinfaltung und der Positionen der Cysteinylschwefel festgestellt.

Ein noch strengeres Bewertungskriterium für die Ähnlichkeit der zwei Polypeptidstrukturen sind die chemischen Verschiebungen und die NOE-Muster der

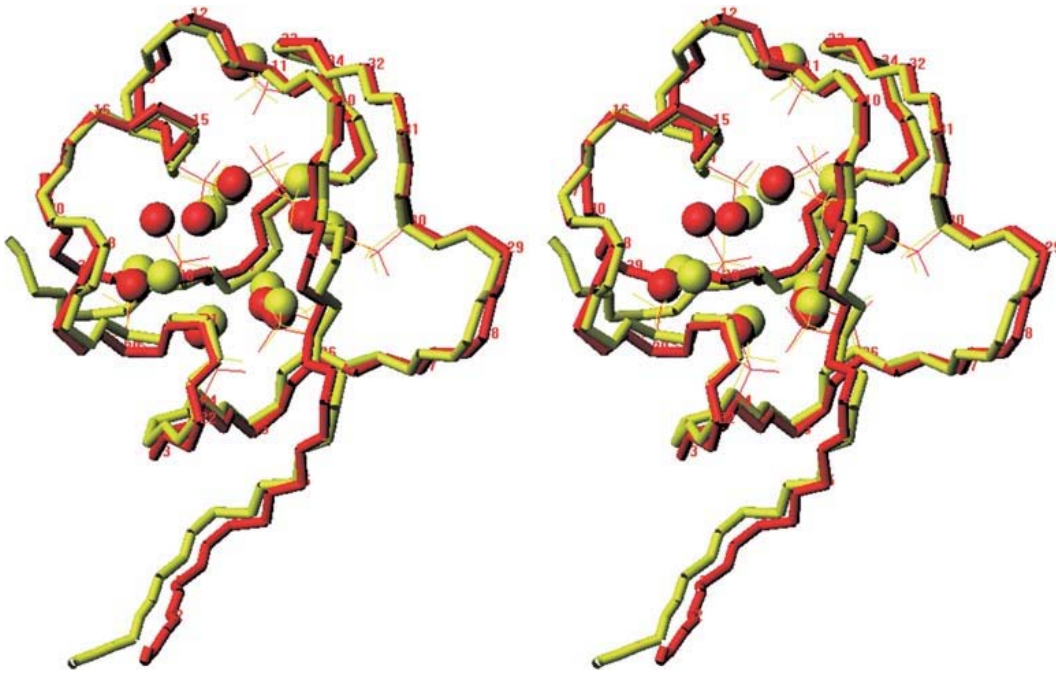


Abb. 14: Stereodarstellung der überlagerten gemittelten Strukturen von Hefe Cu-Thionein (gelb) und Peptid_{AS -1-40} (rot). Die jeweils 10 Cysteinseitenketten und deren Schwefelatome (Kugeln) sind in den jeweiligen Farben dargestellt.^[Luchinat et al. 2003]

β -CH₂-Protonen der zehn metallkoordinierenden Cysteinylseitenketten. Tabelle 3 listet die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen der drei Spezies auf. Es ist offensichtlich, dass die Werte keine großen Abweichungen zeigen. Die größten Differenzen treten im Peptid_{AS 5-40} an den Stellen auf, an denen wie oben beschrieben die Wechselwirkung mit dem fehlenden N-terminalen Ende wegfällt. Die Ähnlichkeit der chemischen Verschiebungen ist ein Hinweis darauf, dass keine größeren Unterschiede in den Torsionswinkeln Ψ und Φ der drei Polypeptide auftreten. Zudem blieben die NOE-Muster in allen Spezies erhalten (Abb. 13).

Ein Vergleich der Resonanzen der β -CH₂-Protonen aller Metall koordinierenden Cysteinylreste zeigt die große Ähnlichkeit der Werte (Tab. 4). Dies kann als weiteres Indiz dafür gewertet werden, dass insbesondere die Umgebung der Cysteinylseitenketten in allen untersuchten Polypeptiden die gleiche ist.

Weil Peptid_{AS 5-40} hinsichtlich der geschilderten physikochemischen Eigenschaften, seiner chemischen Verschiebungen und seines gesamten Spinmusters im NOESY Spektrum den beiden anderen Spezies sehr ähnelte, wurde eine identische Proteinfaltung angenommen und auf eine separate Strukturbestimmung verzichtet. Es wurde somit demonstriert, dass in beiden verkürzten Mutanten, Peptid_{AS -1-40} und

Peptid_{AS 5-40}, die Polypeptidfaltung des intakten Hefe-MT erhalten geblieben war. Des Weiteren lässt insbesondere die Ähnlichkeit von Spinmuster und chemischen Verschiebungen der Cysteinylseitenketten zwischen Wildtyp und den beiden chemisch synthetisierten Mutanten den Schluss zu, dass die Metallthiolatcluster-Architektur in allen drei Spezies dieselbe ist. Einer Verwendung der beiden Mutanten für Kristallisationsversuche stand daher nichts im Wege.

AS-Reste	intaktes MT	Peptid _{AS -1-40}	Peptid _{AS 5-40}	AS-Reste	intaktes MT	Peptid _{AS -1-40}	Peptid _{AS 5-40}		
1	Gln			21	Gln	7,19	7,19	7,29	
2	Asn	8,66	8,48	22	Lys	8,40	8,41	8,56	
3	Glu	8,70	8,57	23	Ser	7,08	7,08	7,32	
4	Gly	8,36	8,40	24	Cys	8,59	8,61	8,88	
5	His	8,34	8,34	8,34	25	Ser	8,37	8,35	8,55
6	Glu	8,81	8,83	8,87	26	Cys	9,39	9,42	9,51
7	Cys	8,54	8,51	8,55	27	Pro			
8	Gln	9,51	9,51	9,76	28	Thr	8,50	8,50	8,63
9	Cys	8,18	8,19	8,22	29	Gly	9,00	9,00	9,11
10	Gln	7,86	7,88	7,96	30	Cys	7,53	7,54	7,58
11	Cys	8,14	8,16	8,23	31	Asn	8,38	8,40	8,49
12	Gly	8,78	8,78	8,87	32	Ser	8,04	8,05	8,13
13	Ser	10,31	10,33	10,32	33	Asp	9,04	9,03	9,12
14	Cys	7,22	7,26	7,34	34	Asp	8,46	8,45	8,55
15	Lys	8,02	8,01	8,12	35	Lys	7,48	7,54	7,65
16	Asn	7,54	7,50	7,60	36	Cys	7,27	7,30	7,40
17	Asn	7,42	7,50	7,60	37	Pro			
18	Glu	9,35	9,33	9,40	38	Cys	8,33	8,35	8,44
19	Gln	8,34	8,34	8,44	39	Gly	8,40	8,46	8,55
20	Cys	7,40	7,40	7,47	40	Asn	8,00	7,90	7,99

Tab. 3: Vergleich der H^N-Resonanzen von Wildtyp-MT, Peptid_{AS -1-40} und Peptid_{AS 5-40}. Für die Aufnahmebedingungen der Spektren gilt das gleiche wie in der Legende zu Tab. 4 beschrieben.^[Luchinat et al. 2003]

AS-Reste	intaktes MT	Peptid _{AS -1-40}	Peptid _{AS 5-40}	AS-Reste	intaktes MT	Peptid _{AS -1-40}	Peptid _{AS 5-40}		
7	Cys	3,97	3,98	4,02	24	Cys	4,03	4,05	4,02
		3,19	3,20	3,31			2,75	2,77	2,70
9	Cys	2,77	2,78	2,87	26	Cys	3,03	3,04	3,11
		4,44	4,47	4,57			3,09	3,11	3,22
11	Cys	2,92	2,93	3,02	30	Cys	2,97	2,98	3,05
		3,81	3,82	3,91			4,07	4,09	4,15
14	Cys	3,71	3,74	3,82	36	Cys	3,39	3,40	3,48
		3,25	3,23	3,30			3,21	3,25	3,33
20	Cys	2,70	2,92	2,82	38	Cys	2,51	2,51	2,54
		3,35	3,38	3,39			2,72	2,83	2,91

Tab. 4: Vergleich der β -CH₂-Resonanzen von Wildtyp-MT, Peptid_{AS -1-40} und Peptid_{AS 5-40}. Die 2D-NOESY-Spektren wurden auf einem 800 MHz NMR Spektrometer in 18 mM Phosphatpuffer bei pH 6,5 und T = 300 K aufgenommen. [Luchinat et al. 2003]

4.1.2 Kristallstruktur eines Cu-Thionein-Fragments

Die ersten Kristalle von Peptid_{AS 5-40} wurden von Herrn Dr. Hans-Jürgen Hartmann, Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen, erhalten. Sie besaßen kubische Gestalt und fluoreszierten typisch für Hefe-MT unter UV-Licht ($\lambda = 360$ nm) orange (Abb. 15). Versuche, das intakte MT oder Peptid_{AS -1-40} unter gleichen oder ähnlichen Bedingungen zu kristallisieren, blieben erfolglos.



Abb. 15: Kristalle von Peptid_{AS 5-40}. Aufnahme bei Beleuchtung mit sichtbarem Licht (links) und ultraviolettem Licht $\lambda = 360$ nm (rechts). Die Kristalle waren kubisch mit einer Kantenlänge von ca. 0,1 mm. Unter UV-Licht ist die für Hefe-MT typische Fluoreszenz (bei der Aufnahme farblich verfremdet) zu erkennen.

Auch nach erfolgreicher Kristallisation traten bei der Strukturbestimmung trotz der äußerst kleinen Größe des Polypeptids besondere Schwierigkeiten auf. Techniken des molekularen Austausches basierend auf der NMR-Struktur schlugen fehl. Dies lag wahrscheinlich an dem ungünstigen Metall-zu-Protein-Verhältnis und der unklaren Kupferstöchiometrie. Wie sich später herausstellte, betrug der Anteil der von den Metallionen verursachten Streuung 35%. Direkte Methoden konnten nicht für die Phasenbestimmung angewendet werden, da die Auflösung zwar gut, aber dennoch nicht auf atomarem Niveau war. Andererseits konnte das große anomale Signal des Kupferclusters (ungefähr 20% der Intensitäten) nicht ohne Weiteres verwertet werden, um die Struktur aufzuklären. Metallcluster in Proteinen wurden schon oft benutzt, um unter Ausnutzung entweder des isomorphen oder des anomalen Effekts oder beider zusammen das Phasenproblem zu lösen. Interessanterweise kam der anomale Effekt in diesem Fall von der globalen Streuung durch den Cluster als ganzem. In diesem Sinn kann der Cluster als ein Gruppenstreuungszentrum aufgefasst werden. Auf diese Weise wurden Phasen bis zu

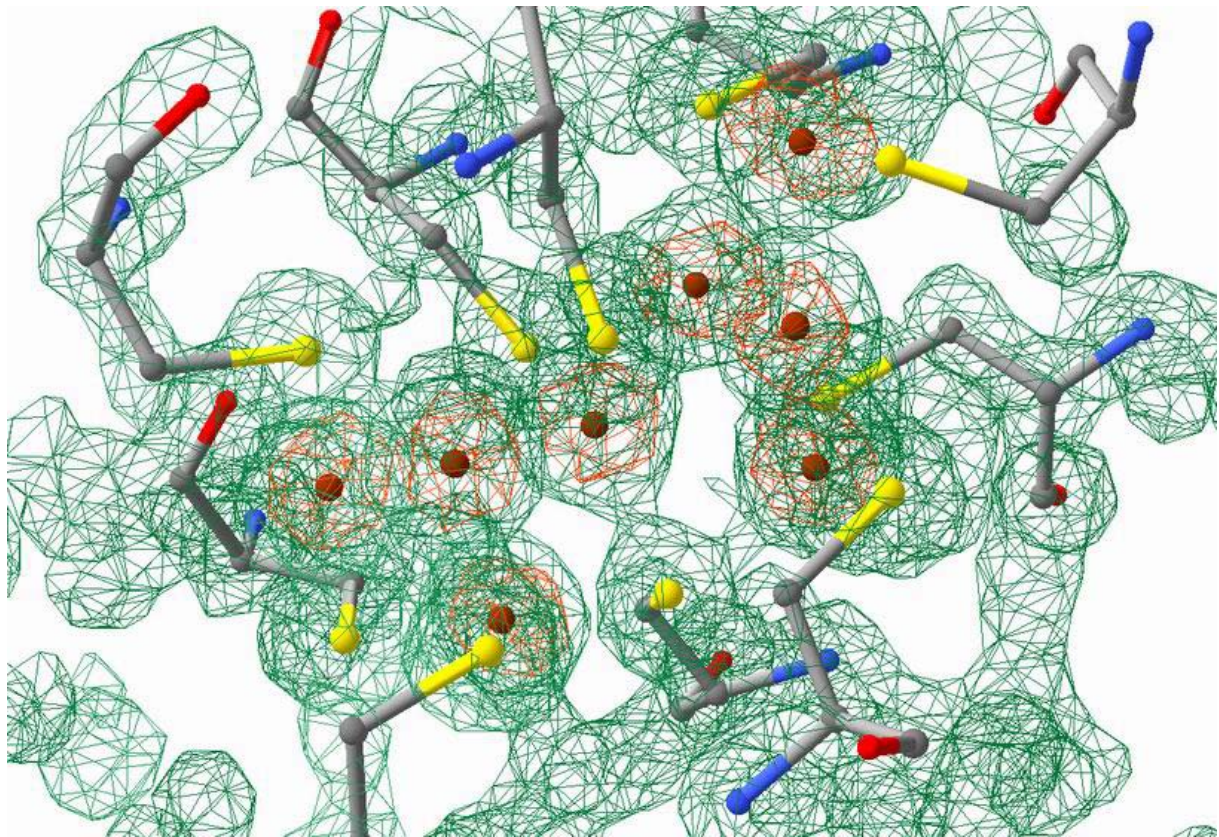


Abb. 16: Nahaufnahme der Elektronendichte in der Metall bindenden Region. Zu sehen sind die 10 Cysteinylreste und die daran gebundenen 8 Cu(I). Die 1σ umrissenen $2F_o - F_c$ Karten für Cysteinylreste und Kupfer sind dunkelgrün, die 17σ umrissene anomale Differenz-Fourier Karte für die Kupferatome ist braun abgebildet.

einer Auflösung erhalten, die etwa 60-70% des durchschnittlichen Clusterdurchmessers d.h. ungefähr 5-8 Å entsprechen. Der Grund dafür ist, dass alle Atome in dem Cluster bei niedriger Auflösung in Phase streuten und sich auf diese Weise wie ein superschweres Atom verhielten. Die Schwierigkeit, die Phasen bis auf eine höhere und brauchbarere Auflösung auszuweiten, bestand in der fehlenden Information über die Atomzahl der einzelnen Komponenten im Cluster. In anderen Worten, es stellte ein intrinsisches Problem dar, die korrekte Orientierung des Clusters zu finden. Die korrekte Orientierung des Clusters und somit die korrekte Positionen der Metalle in dem Cluster konnte nur mit sehr genau gemessenen Daten erhalten werden.

λ (Å)	0,919	1,377
Raumgruppe	P4(3)32	P4(3)32
Abmessungen der Elementarzelle	a = 62,16 Å	a = 62,21 Å
Auflösung (Å)	27,8 - 1,44	31,1 – 1,65
Gesamtzahl der Reflexe	173047 (25070) ^a	170252 (22414)
Individuelle Reflexe	7922 (1117)	5475 (764)
Gesamtvollständigkeit (%)	100 (100)	100 (100)
Anomale Vollständigkeit (%)	---	98,6 (99,7)
R_{sym} (%)	7,0 (35,8)	8,1 (33,7)
R_{anom} (%)	---	9,5 (13,6)
Multiplizität	21,8 (22,4)	31,1 (29,3)
$I/\sigma(I)$	9,3 (2,1)	8,4 (2,1)
B-Faktor vom Wilson plot (Å ²)	9,15	7,21
Phasen FOM vor Lösungsmittelabflachung	---	0,25
Phasen FOM nach Lösungsmittelabflachung	---	0,78

Tab. 5: Statistik der Datenaufzeichnung. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf den Bereich hoher Auflösung (1,52-1,44 für den bei 0,919 Å aufgezeichneten Datensatz und 1,73-1,65 für den bei 1,377 Å aufgezeichneten Datensatz)

Auflösung (Å)	27 – 1,44
Gesamtzahl der benutzten Reflexe	7873
Reflexe im Arbeitsdatensatz	7239
Reflexe im Testdatensatz (8%)	634
$R_{\text{cryst}} / R_{\text{free}}$ (%)	14,5 /17,1
Proteinatome	256
Ligandenatome	8
Wassermoleküle	64
RMSD Bindungen (Å)	0,024
RMSD Winkel (°)	2,1
Durchschnittlicher B-Faktor (einschließlich Metalle) (Å ²)	12,9

Tab. 6: Statistik der Strukturverfeinerung.

Aufgrund von röntgenphotoelektronenspektroskopischen Messungen war bekannt, dass Cu(I) in Hefe-Cu-MT ausschließlich an Cysteinylschwefelatome gebunden vorkommt^[Weser et al. 1977; Weser 1985]. Dagegen war die exakte Stöchiometrie der an dieses Polypeptid gebundenen Cu(I) lange Zeit in der Diskussion. Jedenfalls wurde beruhend auf den NMR-Strukturarbeiten angenommen, dass es eine stabile Spezies mit einem Verhältnis von 7 : 1 Cu(I) : Polypeptid gebe^[Narula et al 1991, 1993; Peterson, Narula & Armitage 1996]. Überraschenderweise wurden in den Röntgenstruktur acht statt sieben Cu(I) gefunden. Alle zehn Cysteinylreste waren an der koordinativen Bindung der Cu(I) beteiligt (Abb. 17).

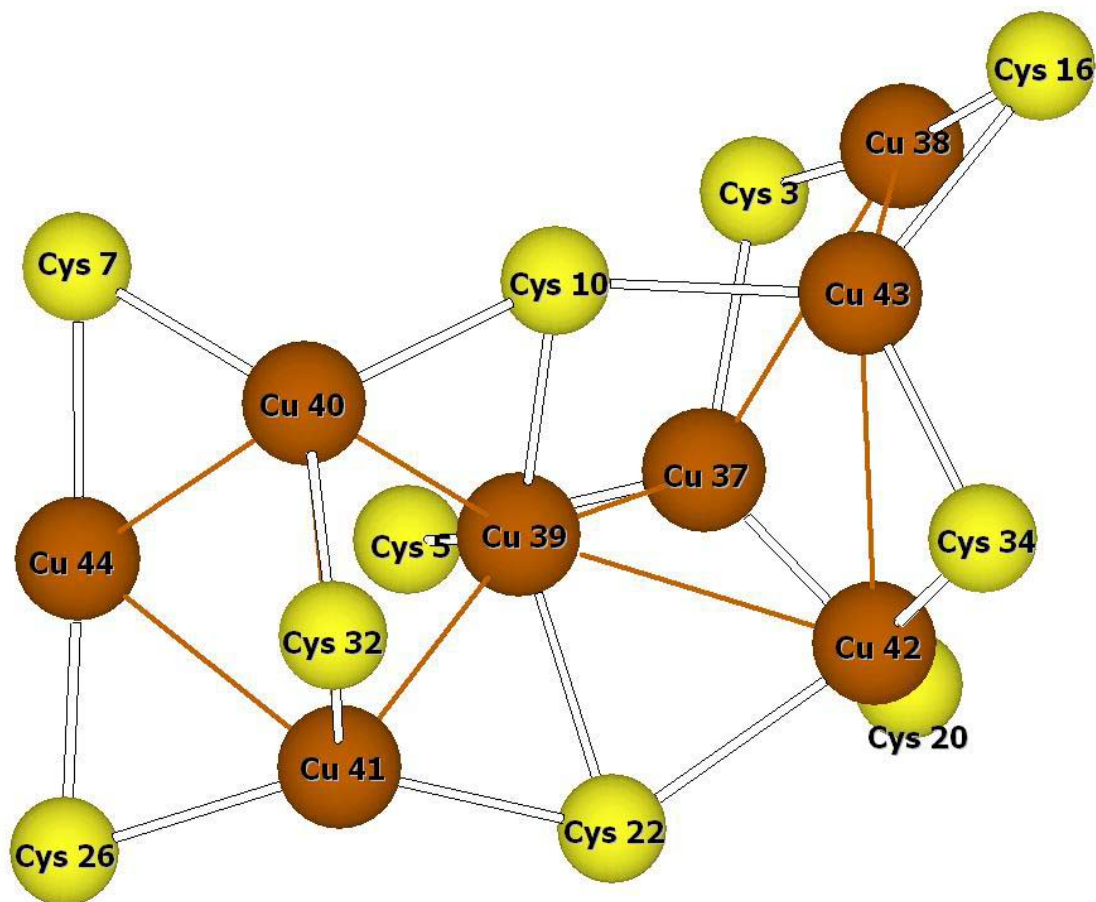


Abb. 17: Bindungsschema der 8 Cu(I)-Ionen (kupferfarbene Kugeln) an die 10 Cysteinylschwefelatome (gelb). Die Nummern der Aminosäurereste sind angegeben. Die braunen Linien verbinden Cu(I)-Ionen mit interatomaren Abständen, die kleiner als 3,0 Å sind.

Dies ist die erste bekannte Struktur eines oktanuklearen Kupferzentrums im Inneren eines Proteins. Bemerkenswert ist, wie in einem solch kleinen Proteinfragment derart viele Metallionen zu einem einzigen Cluster zusammengefasst sind. Zwei der acht

Kupfer (Cu38 und Cu44) sind linear, die anderen sechs trigonal durch Cysteinylthiolate koordiniert. Letzteres wurde basierend auf EXAFS-Messungen bereits vorhergesagt^[George et al. 1988]. Das gemeinsame Auftreten von sowohl linearer als auch trigonaler Koordination innerhalb eines Kupferthiolatclusters wurde jedoch nicht erwartet. Die acht Cu(I) sind in zwei Gruppen von je vier angeordnet, wobei sie jeweils die Ecken eines abgeflachten Tetraeders besetzen. In einem der Tetraeder (Cu39, Cu40, Cu41, Cu44) besitzen die Cu(I) mit 2,59 Å bis 2,91 Å sehr kurze Abstände, im anderen (Cu37, Cu38, Cu42, Cu43) reichen sie von 2,78 Å bis 3,12 Å. Bei Cu-Cu-Abständen unter 2,8 Å (doppelter Van-der-Waals-Radius von Kupfer) kann von einem gewissen Metallbindungscharakter ausgegangen werden. Cu39 verbindet die beiden Tetraeder. Dabei kommt es an Cu42 und Cu37 aus dem zweiten Tetraeder bis auf 2,73 Å bzw. 2,78 Å heran.

Wie Cu(I)-Thiolate im allgemeinen weist Hefe-Cu-MT eine charakteristische orangefarbene Lumineszenz auf. Die Quantenausbeute von Hefe-Cu-MT wurde auf 0,0058 bestimmt^[Byrd et al. 1988]. Dieser verglichen mit den Quantenausbeuten niedermolekularer Cu(I)-Komplexe außerordentlich hohe Wert wurde auf die effektive Abschirmung des Metallthiolatclusters durch das Polypeptidrückgrat zurückgeführt. Dadurch wurde eine Reduktion der Interaktion von Lösungsmittelmolekülen mit dem Luminophor und somit eine verminderte Lumineszenzlöschung erklärt. Sowohl die bereits veröffentlichten NMR-Strukturen^[Peterson, Narula & Armitage 1996; Bertini et al. 2000] als auch die hier vorgestellte Kristallstruktur zeigen, dass die für die Cu(I)-Koordination verantwortlichen Cysteinylschwefel und damit auch die daran gebundenen Cu(I) im Innern des Polypeptids anzutreffen sind. Folglich wird der Kontakt zur Lösungsumgebung minimiert, was zu der verringerten Lumineszenzlöschung führt.

Der Vergleich zwischen der Röntgenstruktur von Peptid_{AS 5-40} und den NMR-Strukturen von Ag₇-MT und Cu₇-MT^[Narula et al. 1991, 1993; Peterson, Narula & Armitage 1996; Bertini et al. 2000] zeigt, dass die Faltung des Polypeptidrückgrates und die Metall-Cystein-Topologie ähnlich, aber nicht identisch sind (Abb. 18 und 19). Bei der Überlagerung des Polypeptidrückgrates der Kristallstruktur mit der von Ag₇-MT und Cu₇-MT wurden RMSD-Werte von 1,56 Å bzw. 1,12 Å erhalten. Bei näherer Betrachtung der Struktur von Ag₇-MT fällt auf, dass ein Teil des Polypeptidrückgrates und verschiedene Seitenketten von der Kristallstruktur abweichende Konformationen besitzen. Dies

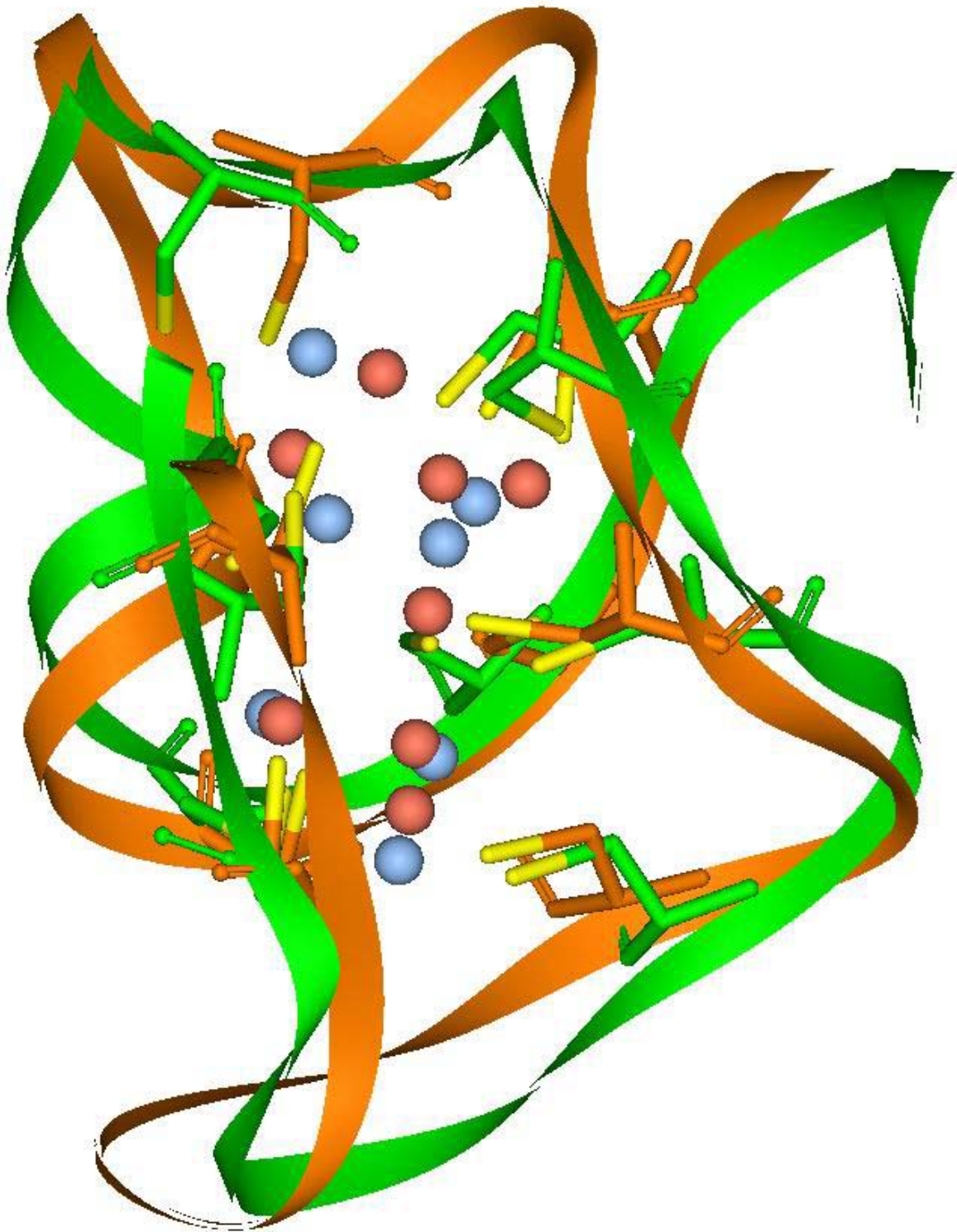


Abb. 18: Überlagerung der Cu₈-MT-Kristallstruktur (rotes Band) mit der Ag₇-MT-NMR-Struktur (grünes Band) nach der Methode der kleinsten Quadrate. Die Cysteinylseitenketten und Kupferatome sind als Kugeln in der jeweiligen Farbe des Polypeptidrückgrates dargestellt. Bindungen zu den Thiolatschwefeln sind gelb abgebildet.

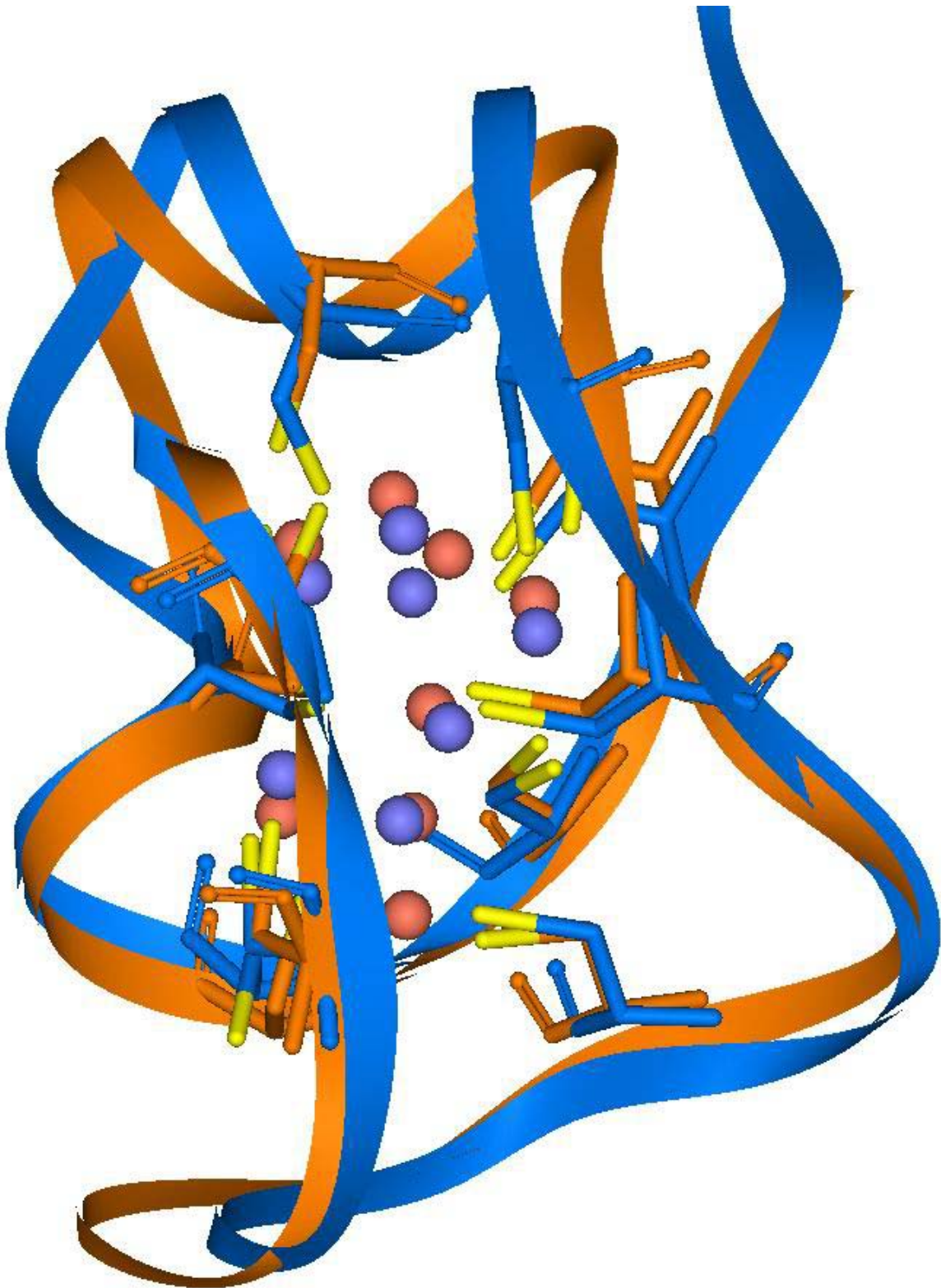


Abb. 19: Überlagerung der Cu_8 -MT-Kristallstruktur (rotes Band) mit der Cu_7 -MT-NMR-Struktur (blaues Band) nach der Methode der kleinsten Quadrate. Die Cysteinylseitenketten und Kupferatome sind als Kugeln in der jeweiligen Farbe des Polypeptidrückgrates dargestellt. Bindungen zu den Thiolatschwefeln sind gelb abgebildet.

fürhte zu einer unterschiedlichen Anordnung von einigen Cysteinylseitenketten. Der vom Ag₇-MT abgeleitete Cu₇-Cluster zeigte folglich wenig Übereinstimmung mit dem Cu₈-Cluster aus der Kristallstruktur. Beim Vergleich der hochaufgelösten Cu₇-MT-Struktur^[Bertini et al. 2000] mit der Kristallstruktur besaßen hingegen alle Cysteinylseitenketten bis auf eine eine ähnliche Anordnung.

Aufgrund der Tatsache, dass in der vorliegenden Kristallstruktur acht Cu(I) gefunden wurden, stellt sich die Frage, ob Cu₈-MT die korrekte Formel für Hefe-MT darstellt oder ob es noch andere stabile Spezies mit sechs und sieben gebundenen Cu(I) gibt. In der Vergangenheit wurden bereits mehrere verschiedene Stöchiometrien für Hefe-MT vorgeschlagen. Eine interessante Arbeit schlägt sechs stabil und zwei etwas labiler gebundene Cu(I) in diesem Kupferthiolatcluster vor^[Weser & Hartmann 1988]. Es könnte gut sein, dass sich aus einer Lösung von Cu₇-MT Kristalle aus Cu₈-MT bildeten, vielleicht indem Cu₆-MT in Lösung zurück geblieben war. In diesem Fall gäbe es drei verschiedene Lösungen auf die Frage nach der korrekten Stöchiometrie von Hefe-Cu-MT und alle drei könnten physiologisch von Bedeutung sein.

Angesichts der vorliegenden Cu₈-MT-Struktur und des Vergleiches mit dem Proteinanteil der besten NMR-Struktur von Cu₇-MT kann ein Modell für den Cu₇-Cluster in letzterer Spezies vorgeschlagen werden. Abbildung 20 zeigt die Nahaufnahme der Überlagerung von Röntgen- und NMR-Struktur in der Region von Cys7 (Cys11 in der NMR-Struktur). Interessanterweise besitzen die zwei Cysteinylseitenketten unterschiedliche Konformationen, so dass die Schwefelatome dadurch in exakt entgegengesetzte Richtung weisen. In der vorliegenden Kristallstruktur ist Cu44 an Cys7 in einem Abstand von 2,15 Å gebunden. Dagegen ist das entsprechende Cys11 der NMR-Struktur in dieser Konformation nicht mit einer Kupferkoordination vereinbar. Dies und die Tatsache, dass sich Cu44 an einem dem Lösungsmittel zugewandten Ende des Clusters befindet und eines der beiden zweifach koordinierten (durch Cys7 und Cys26) Cu(I) ist, machen es wahrscheinlich, dass Cu44 dasjenige ist, das in der Cu₇-MT-Spezies fehlte. Aus der Betrachtung der beiden Einzelstrukturen heraus ist ein Cu(I)-Aufnahme- und -Abgabemechanismus durch die Seitenkettenbewegung von Cys11 denkbar. Zudem befindet sich das andere bigonal koordinierte Cu(I) (Cu38) genau auf der entgegengesetzt liegenden Seite des Clusters. Das Cu38 koordinierende Cysteinylseitenkettenpaar Cys3-Cys16 könnte in analoger Weise zu Cys7-Cys26 funktionieren und auch auf der

entgegengesetzt liegenden Seite des Proteins die Cu(I)-Aufnahme und -Abgabe steuern.

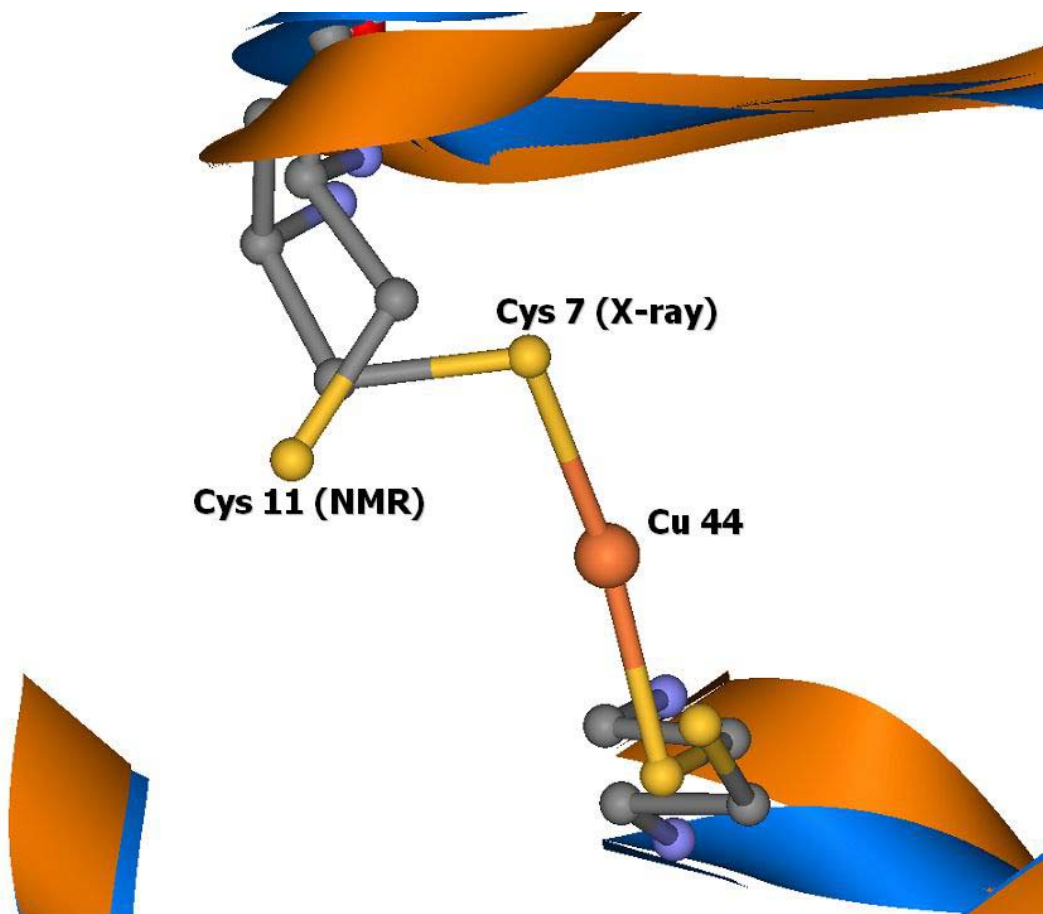


Abb. 20: Nahaufnahme der Cys7-Cu44-Region der Cu₈-MT-Kristallstruktur überlagert mit derselben Region der Cu₇-MT-NMR-Struktur. Die unterschiedliche Orientierung der Seitenketten von Cys7 (Kupfer gebunden) und dem entsprechenden Cys11 (ohne Metall) ist gezeigt.

Der sichere und fein abgestimmte Transport reaktiven Cu(I) in wässrigen biologischen Systemen war unter den möglichen physiologischen Funktionen von Hefe-Cu-MT eine der bestechendsten. Auf Basis seiner Kristallstruktur wird diese Rolle dadurch unterstützt, dass Cu(I)-Ionen im Zentrum des Polypeptids hydrophob gelagert sind, wo sie vor dem harten Sauerstoff der Wassermoleküle geschützt sind. Sie werden dort fest von Cysteinyllthiolaten gebunden und auf diese Weise in ihrer monovalenten Form stabilisiert. Auf diese Art werden unkontrollierte Redoxreaktionen, die an vielen zellulären Komponenten Schaden anrichten können, verhindert. Diese Kupfer abfangende Rolle zusammen mit der Beobachtung, dass

Hefe-Zellen, die Kupfer ausgesetzt sind, fähig sind, ganze Cu-MT-Moleküle aus der Zelle zu transportieren, sprechen für eine Entgiftungsfunktion von Hefe Cu-MT.

Eine weitere diskutierte Rolle für Cu-MT war die eines Speicherortes für Kupfer, das für den Transfer in die apo-Formen von Kupferproteinen bestimmt ist. Eine derartige Funktion wird durch das Vorhandensein von zwei digonalen Kupferkoordinationsstellen innerhalb des Clusters unterstützt. Diese könnten den beiden labiler gebundenen Kupferionen in einem kompetitiven Verdrängungsexperiment entsprechen und wären somit für die schnelle Kupferabgabe geeignet. In dieser Rolle als Kupferspeicher und -bereitstellungsagens könnte Cu-MT mit Kupferchaperonen interagieren, möglicherweise über dieselben Mechanismen, die für den Transfer zwischen Kupferchaperonen und ihren Zielproteinen vorgeschlagen wurden (Abb. 1). Interessanterweise besitzt das intakte Cu-MT noch zwei weitere Cysteinyreste am C-terminalen Ende, das in den beiden verkürzten Mutanten und somit auch in der Kristallstruktur fehlt. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass diese nicht an der Cu(I)-Bindung im Kupferthiolatcluster beteiligt sind^[Byrd et al. 1988]. Sie könnten eine Rolle bei der Kupferaufnahme und -freisetzung oder bei einer denkbaren Interaktion mit Kupferchaperonen spielen.

Zusammenfassend kann über die mögliche physiologische Funktion von Hefe-Cu-MT und Cu-MT im Allgemeinen gesagt werden, dass es ein Überlaufbecken für Kupfer in den jeweiligen Zellen darstellen könnte. Dessen Aufgabe wäre es, zeitlich auftretende Spitzen hinsichtlich der Kupferkonzentration abzupuffern und dieses im Bedarfsfall z.B. unter Kupfermangelsituationen wieder für den Einbau in Kupferproteine freizugeben.

4.2 Domänen von Maus-Metallothionein-1

4.2.1 Lumineszenz und Circular dichroismus der Cu(I)-substituierten Domänen

Mittels Festphasenpeptidsynthese wurden die beiden Domänen von Maus-Metallothionein-1 erfolgreich erhalten (Abb. 21). Da eine Titration für NMR-Messungen sehr große Mengen an Peptid erfordert – pro NMR-Ansatz werden circa 2 mg benötigt –, sollten beide Domänen vorab für CD- und Lumineszenzmessungen titriert und die Ergebnisse mit Daten aus früheren Untersuchungen verglichen

werden. Für die CD-Messungen wurden beide Polypeptide in einer Endkonzentration von 35 μM in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,6, 4,4% Acetonitril gelöst. Acetonitril als weicher Ligand sollte die Disproportionierung von freiem Cu(I) verhindern. Die Proben wurden in der *glove box* unter einer Atmosphäre, die weniger als 1 ppm Sauerstoff enthielt, vorbereitet. Für jeden Titrationsschritt wurde ein separater Ansatz hergestellt, um in allen Proben dasselbe Endvolumen zu erreichen und um die Zeit, in der die Proben potentiell Sauerstoff ausgesetzt sein könnten (z.B. während jeder Messung und jeder Probenmanipulation), möglichst gering zu halten. Allen Proben der α -Domäne wurden 4 Äquivalente Zn(II), denen der β -Domäne 3 Äquivalente Zn(II) und die jeweiligen Äquivalente Cu(I) zugesetzt. Als Metalllösungen wurden 100 mM $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ und 1,1 mM $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$ eingesetzt. Für die Lumineszenzmessungen wurden 800 μL der CD-Proben mit 1200 μL Wasser verdünnt.

	10	20	30
α -Domäne	KSCCSCCPVG	CSKCAQGCVC	KGAADKCTCC A
β -Domäne	MDPNCSCSTG	GSCTCTSSCA	CKNCKCTSCK

Abb. 21: Aminosäuresequenzen der beiden chemisch synthetisierten Domänen von murinem Metallothionein-1

Abbildung 22 zeigt die erhaltenen CD-Spektren der beiden Domänen. Das Spektrum von Zn_4 - α -MT ist durch zwei Maxima gekennzeichnet. Ein positiver Cotton-Effekt ist bei 245 nm zu finden, ein äußerst schwach ausgeprägter negativer bei ca. 260 nm. Bei darüber liegenden Wellenlängen geht das Spektrum in die Nulllinie über. Zwischen 225 nm und 241 nm weist das Spektrum einen negativen Cotton-Effekt auf. Im Verlauf der Cu(I)-Titration steigt die chirale Intensität des Maximums bei 245 nm kontinuierlich bis ungefähr auf das zehnfache an. Im Bereich kürzerer Wellenlängen verlaufen die Spektren der Cu(I)-haltigen Spezies parallel zu dem von Zn_4 - α -MT, jedoch mit steigender Cu(I)-Konzentration kontinuierlich blauverschoben. Dies wird insbesondere deutlich am Nulldurchgang, der von 241 nm für Zn_4 - α -MT bis 235 nm für die Spezies, die sich nach Zugabe von 6 Äquivalenten Cu(I) entwickelt, wandert. Im Bereich von 275 nm entwickelt sich durch die Zugabe von Cu(I) ein negativer Cotton-Effekt, der sein Maximum nach 4 Äquivalenten Cu(I) erreicht. Das fünfte Cu(I)

führt bei gleicher chiraler Intensität zu einer Rotverschiebung des Minimums, die sich beim sechsten Cu(I) bei jedoch verringerter Intensität fortsetzt. Das Spektrum der Titrationsstufe mit nur einem Äquivalent Cu(I) bleibt im Bereich oberhalb von 280 nm im negativen Bereich. Die Elliptizitäten weisen noch ein Maximum bei ca. 295 nm und ein Minimum bei ca. 310 nm auf und gehen danach in die Nulllinie über. Maxima, die dem zuletzt beschriebenen der ersten Titrationsstufe entsprechen, werden mit positivem Cotton-Effekt auch bei allen anderen Spezies mit mehr als einem Cu(I) gefunden. Die chiralen Intensitäten steigen bis zur Zugabe von 3 Äquivalenten Cu(I) an. Die weitere Titration resultiert in einer Rotverschiebung des Maximums bei gleicher Intensität. Während sich die Spektrallinien der Titrationsstufen 2 bis 4 von dort an die Nulllinie annähern, sind in den Spektren der Spezies mit 5 und 6 Cu(I) ein neu entstehendes schwaches Minimum bei ca. 330 nm und ein schwaches Maximum bei ca. 365 nm zu erkennen.

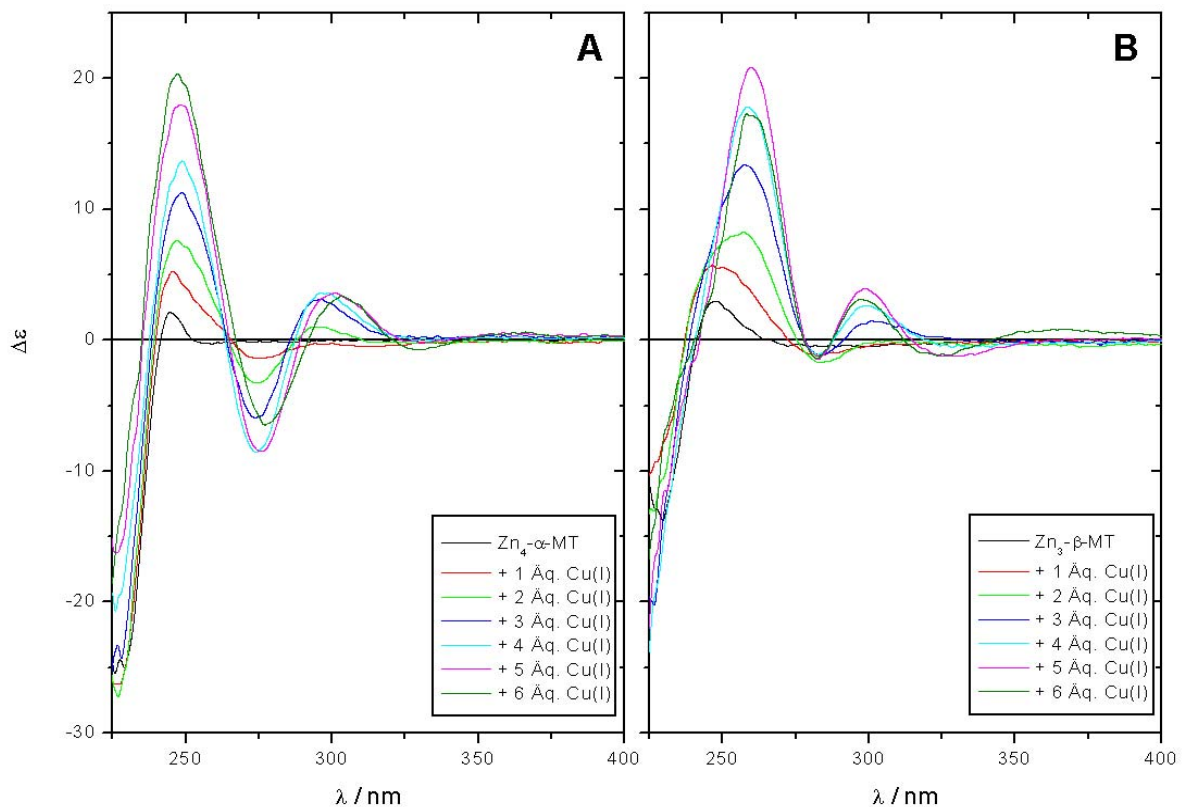


Abb. 22: CD-Spektren der Cu(I)-Titration von Zn_4 - α -MT (A) und Zn_3 - β -MT (B). Beide Domänen waren in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,6, 4,4% Acetonitril in einer Konzentration von 35 μ M gelöst.

Zwischen 225 nm und 241 nm besitzt das Spektrum von Zn_3 - β -MT einen negativen Cotton-Effekt. Es durchläuft ein Maximum bei 247 nm und verläuft zwischen 265 nm und 350 nm im negativen Bereich. Bei längeren Wellenlängen kann kein chiraler Effekt mehr festgestellt werden. Parallel zu Zn_3 - β -MT haben alle Titrationsstufen unterhalb von 240 nm einen negativen Cotton-Effekt. Nach der Zugabe von einem Äquivalent Cu(I) ist wie im Spektrum von Zn_3 - β -MT bei 247 nm ein Maximum allerdings mit größerer Elliptizität zu sehen. Bei allen weiteren Spezies befindet sich das Maximum bei 260 nm. Vom alten Maximum bei 247 nm bleibt in den Spektren der Spezies, die sich nach Zugabe von 3 und 4 Äquivalenten Cu(I) ausbilden, lediglich jeweils eine Schulter übrig. Die Intensitäten der Cotton-Effekte steigen bis zur Zugabe von 5 Äquivalenten Cu(I). Die Cu_6 -Spezies besitzt in diesem Bereich einen der Cu_4 -Spezies vergleichbaren Cotton-Effekt. Alle Cu(I)-haltigen Spezies durchlaufen ein Minimum bei 282 nm mit nahezu identischer chiraler Intensität. Bei größeren Wellenlängen konvergiert das Spektrum für die Cu_1 -Spezies gegen die Nulllinie. Für 2 bis 4 Äquivalente werden im Bereich von 300 nm zunehmend blauverschobene Maxima erhalten. Die Cu_5 -Spezies besitzt ihr Maximum bei der gleichen Wellenlänge wie die Cu_4 -Form, jedoch mit größeren Werten für die Elliptizität. Nach Zugabe von 6 Äquivalenten Cu(I) ist das Maximum wieder blauverschoben und besitzt eine Intensität, die zwischen der der Cu_4 - und Cu_5 -Formen liegt. Für die Titrationsstufen 2 bis 4 gehen die Elliptizitätswerte bei darüber liegenden Wellenlängen gegen null. Dagegen durchläuft das Spektrum der Cu_5 -Spezies noch ein Minimum bei 330 nm bevor es gegen die Nulllinie konvergiert. Die Cu_6 -Form besitzt ihr entsprechendes Minimum bei 325 nm und zusätzlich noch ein Maximum bei ca. 365 nm.

Bereits frühere Arbeiten beschäftigten sich mit den Änderungen der chiroptischen Eigenschaften der beiden Domänen von Säugetier-MT^[Li & Weser 1992; Bofill et al. 1999; Bofill et al. 2001]. Li & Weser verwendeten für ihre Untersuchungen die mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisierten Domänen von Rattenleber-MT-2. Diese wurden in ihrer apo-Form bei pH 2,5 mit Cu(I) titriert. Wie aus Tabelle 7 hervorgeht besteht zwischen Ratten- und Maus α - bzw. β -Domäne eine 81%ige bzw. 77%ige Sequenzidentität. Zudem hatten die bereits aufgeklärten Strukturen von Säugetier-Metallothioneinen eine weitgehend identische Proteinfaltung. Daher sollten auch die CD-Spektren zu einem gewissen Grade vergleichbar sein.

	α -Domäne	β -Domäne
Maus Ratte <i>consensus>50</i>	<pre> 1 10 20 30 .KSCCSCCPVGCS.KCRGGVCKEARDKCTCCA KKSCCSCCPVGCAKCSGGCICKEASDKCSCCA .KSCCSCCPVGC.KC.QGCICK.A.DKC.CCA </pre>	<pre> 1 10 20 30 MDPNCSCSTEGGSCTCTSSCACKNCKCTSCK MDPNCSCATEGGSCCASSCKCKCKCTSCK MDPNCSC.T.GSC.C..SC.CK#CKCTSCK. </pre>
Sequenzidentität	81%	77%

Tab. 7: Sequenz-Abgleich der chemisch synthetisierten α - und β -Domänen aus Ratten- und Maus-MT. Dafür wurden die Programme Multalin version 5.4.1^[Corpet 1988] und LALIGN^[Huang & Miller 1991] verwendet.

Durch die Zugabe von Cu(I) zur Ratten- α -MT-2-Domäne entwickelte sich wie bei der Titration der Maus- α -Domäne bei 250 nm ein positiver Cotton-Effekt, der sich bis zur Zugabe von 6 Äquivalenten Cu(I) in zwei Stufen verstärkte. Allerdings blieben die Elliptizitäten auch im Vergleich zum Minimum bei 285 nm sehr gering. Das entsprechende Minimum befand sich in der Maus- α -Domäne bei 275 nm. Beide Titrationsen haben gemeinsam, dass die größten Werte der negativen Elliptizitäten nach Zugabe von 5 Äquivalenten Cu(I) beobachtet wurden. Der sich in der Maus- α -Domäne während der Titration ausbildende positive Cotton-Effekt bei 295-300 nm fehlte in der Titration der Ratten- α -Domäne. Stattdessen war eine Schulter im Kurvenverlauf in diesem Bereich zu erkennen.

Bei der Titration der Ratten- β -Domäne bilden sich ein Maximum bei 262 nm und ein Minimum bei 285 nm aus. Diese finden ihre Entsprechungen bei der Titration der Maus- β -Domäne bei 260 nm bzw. 282 nm. Während das Maximum bei 260 nm im Mäusepeptid bis zur Zugabe von 5 Äquivalenten Cu(I) stetig größere Elliptizitäten annahm und nach der sechsten Zugabe sogar wieder kleinere Werte aufwies, wurde der maximale Ausschlag bei der Titration der Ratten- β -Domäne nach der dritten Zugabe Cu(I) erreicht. Weitere Zugaben veränderten das Spektrum in diesem Bereich nicht mehr. Auch im Bereich des Minimums bei ca. 285 nm verhielten sich Maus- und Ratten- β -MT unterschiedlich. Beim Maus-Peptid blieben die Werte in diesem Bereich über die Titration hinweg konstant. In der Ratten- β -Domäne nahmen die Werte bis zur Zugabe von 3 Äquivalenten Cu(I) ab und blieben danach unverändert. Der positive Cotton-Effekt, der bei der Titration des Maus-Peptids bei ca. 300 nm beobachtet wurde, ist im Fall der entsprechenden Ratten-Domäne nicht vorhanden. Stattdessen war auch hier in diesem Bereich eine Schulter zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD-Spektren der Titrations der Ratten-MT-Domänen ähnlich aussahen wie die der entsprechenden Maus-MT-Domänen. Insbesondere die Lage der Extrema war in beiden Fällen nahezu dieselbe. Dennoch traten Unterschiede auf, vor allem hinsichtlich der Stöchiometrien, für die die maximalen Intensitäten der Cotton-Banden beobachtet wurden. Die Gründe dafür liegen zum einen in den Sequenzunterschieden der verwendeten Polypeptide. Zum anderen waren die Titrationsbedingungen nicht dieselben. Die Ratten-MT-Domänen wurden ausgehend von der apo-Form bei pH 2,5, die Maus-MT-Domänen ausgehend von den zinkhaltigen Formen bei pH 7,5 titriert.

Bofill et al. 2001 titrierten die beiden durch rekombinante Genexpression hergestellten zinkhaltigen Maus-MT-1-Domänen bei pH 7. Die Bedingungen entsprachen daher eher denen, die für die vorliegende Arbeit gewählt worden waren. Hinsichtlich der Lage der auftretenden Cotton-Banden unterschied sich das Ergebnis der Titration der durch rekombinante Genexpression gewonnenen α -Domäne nicht von der für diese Arbeit durchgeführten Titration. Allerdings steigerte sich die Intensität der Cotton-Bande im letzteren Fall bis zur Zugabe von 6 Äquivalenten Cu(I), wohingegen das Maximum im ersteren Fall schon nach der vierten Zugabe erreicht war, nach der fünften noch gleiche Intensität besaß und nach der sechsten wieder abnahm. Die negative Cotton-Bande war bei Bofill et al. nach 3 Äquivalenten Cu(I) am ausgeprägtesten, blieb bei 4 Äquivalenten Cu(I) gleich und nahm danach in ihrer Größe ab. Im Fall der chemisch synthetisierten α -Domäne wurden die beschriebenen Effekte im Bereich dieser Bande erst jeweils ein Äquivalent später beobachtet. Im Bereich des Maximums bei 295 bis 300 nm war die maximale Elliptizität in beiden Fällen nach 3 Äquivalenten Cu(I) erreicht. Danach fand wieder in beiden Fällen eine Rotverschiebung der Bande statt.

Im Fall der β -Domäne entwickeln sich die Banden der unterschiedlichen Titrations parallel bis zur Zugabe des fünften Äquivalents Cu(I). Die sechste Zugabe resultiert bei Bofill et al. in der weiteren Zunahme der positiven Cotton-Banden bei 258 nm und 297 nm. Dagegen ist eine Abnahme der Intensitäten der entsprechenden Banden im Fall der chemisch synthetisierten Domänen zu beobachten.

Die beschriebene Ähnlichkeit der CD-Spektren dieser Arbeit mit denen von Bofill et al. 2001 lässt den Schluss zu, dass die Proteinfaltung unter den gewählten Bedingungen in beiden Fällen in gleicher Weise abläuft. Für die erwähnten

Unterschiede gibt es keine eindeutige Erklärung. Eine Fehlermöglichkeit liegt in der korrekten Bestimmung der Metall-zu-Polypeptid-Stöchiometrie.

Etwas eindeutiger stellt sich die Situation bei Betrachtung der Lumineszenzspektren dar (Abb. 23). Die maximale Emission bei ca. 575 nm und ca. 580 nm der α - bzw. β -Domäne nimmt im Verlauf der Titration kontinuierlich zu. Es fällt auf, dass der Anstieg der Intensitäten in beiden Fällen bis zur Zugabe des 3. Äquivalents Cu(I) im Fall von α -MT bzw. des 3.-4. Äquivalents im Fall von β -MT flach verläuft und bei den nachfolgenden Zugaben stärker ansteigt (Abb. 24).

In einer früheren Arbeit wurden die beiden apo-Domänen von humanem MT bei pH 2,5 mit Cu(I) titriert^[Li & Weser 1992]. In diesem Fall verlief der Anstieg der Emissionsintensität allerdings linear bis zur Zugabe von 6 Äquivalenten Cu(I). Die Emissionsspektren blieben bei weiterer Cu(I)-Zugabe unverändert. Einen zweiphasigen Verlauf der Cu(I)-Titration beobachteten die Autoren bei der Titration von apo-MT bei pH 2,5 und bei den Titrations von Cd₇-MT und Cd₅Zn₂-MT bei pH 6,5. Im Fall von apo-MT stieg die Emissionsintensität linear bis zu 6 Äquivalenten Cu(I) an. Zwischen dem 6. und 12. Äquivalent war der Verlauf ebenfalls linear, aber mit weitaus größerer Steigung. Bei weiteren Zugaben blieb die Emissionsintensität konstant. Cd₅Zn₂-MT verhielt sich bei der Zugabe der ersten 3 Äquivalente wie das apo-MT. Bei den nächsten 3 Äquivalenten nahm die Emissionsintensität sogar auf die Hälfte ab. Zugaben des 7. bis 12. Äquivalents Cu(I) ließen die Emissionsintensität auf ähnliche Werte steigen, wie sie im Fall des apo-MT beobachtet worden waren. Weitere Cu(I)-Zugaben änderten die Emissionsspektren nur unwesentlich. Bei der Titration von Cd₇-MT war nach den ersten 4 Äquivalenten keine Lumineszenz beobachtbar. Danach stieg die Emission bis zur Zugabe des 12. Äquivalents Cu(I) an.

Das vorliegende Ergebnis der Titration beider Domänen unterscheidet sich von dem, das in Li & Weser 1992 präsentiert wurde, insofern, als bei der neueren Untersuchung kein linearer Zusammenhang zwischen Emission und zugesetzter Cu(I)-Menge zu sehen ist. Vielmehr scheint bei Auftragung von Emissionsintensität gegen die Anzahl der zugesetzten Äquivalente nach 3 bzw. 3-4 Äquivalenten jeweils ein leichter Knick im Verlauf der Graphen aufzutreten. Mögliche Gründe für den unterschiedlichen Verlauf der Titrations sind unterschiedliche Lösungsmittel-

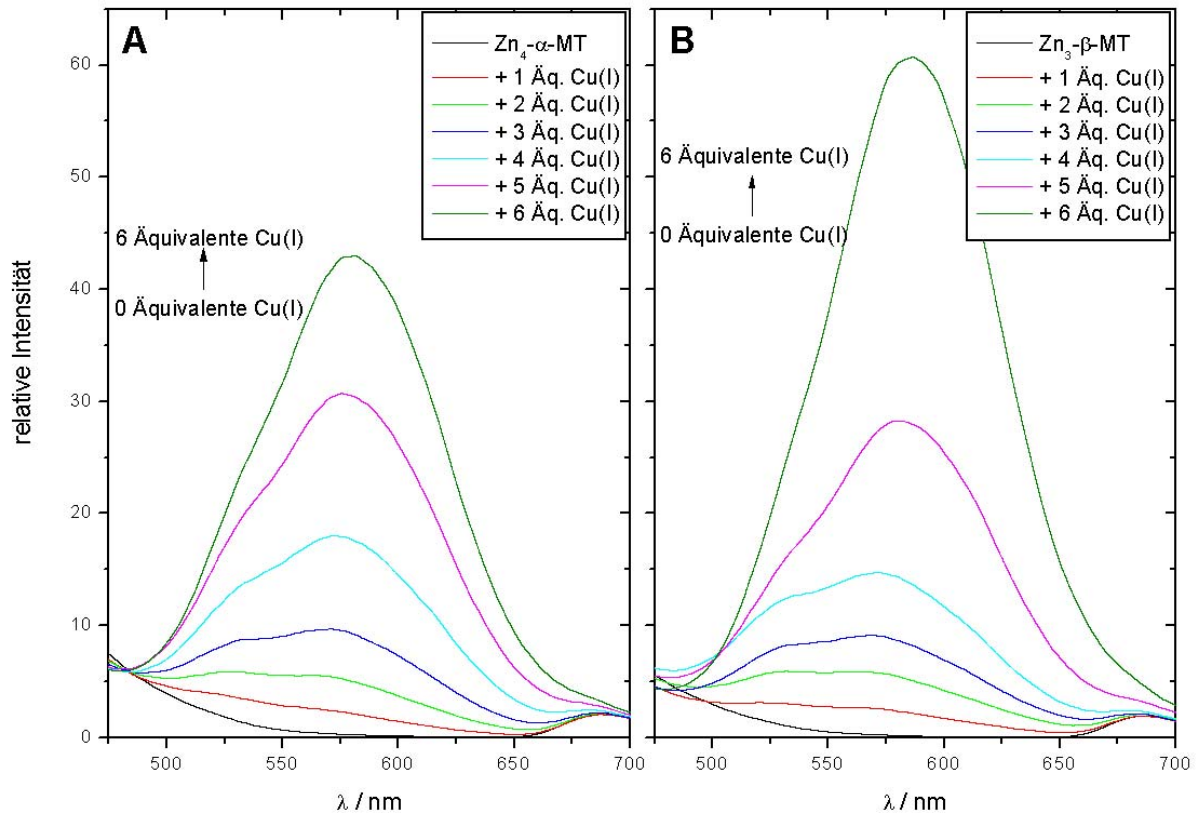


Abb. 23: Emissionsspektren der Cu(I)-Titration von Zn₄-α-MT (A) und Zn₃-β-MT (B). Beide Domänen waren in 8 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,6, 1,8% Acetonitril in einer Konzentration von 14 μM gelöst. Alle Spektren wurden bei 25°C aufgenommen. Spaltweiten von 15 mm bzw. 20 mm wurden am Excitations- bzw. Emissionsmonochromator eingestellt. Die Anregungswellenlänge lag bei λ = 300 nm.

bedingungen wie pH oder Acetonitrilkonzentration und die unterschiedliche Ausgangssituation, apo-Domänen bei Li & Weser, jetzt Zn₄-α-MT und Zn₃-β-MT. Interessanterweise beobachteten Li & Weser bei der Titration verschiedener Spezies von intaktem MT, dass die Emissionsintensität bis zur Zugabe von 6 Äquivalenten Cu(I) nur wenig im Vergleich zu den Zugaben der Äquivalente 6-12 zunahm. 6 Äquivalente entsprechen der Summe der Äquivalente, für die jeweils ein Knick im Verlauf der Emissionsintensitäten auftrat. Daher weisen die Titrations der separaten Domänen eine gewisse Parallelität zu denen der verschiedenen MT-Spezies auf. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die Proteinfaltung unter den gewählten Bedingungen funktioniert hatte. Aufgrund dessen erschien eine weitere Untersuchung unter Einsatz von NMR sinnvoll.

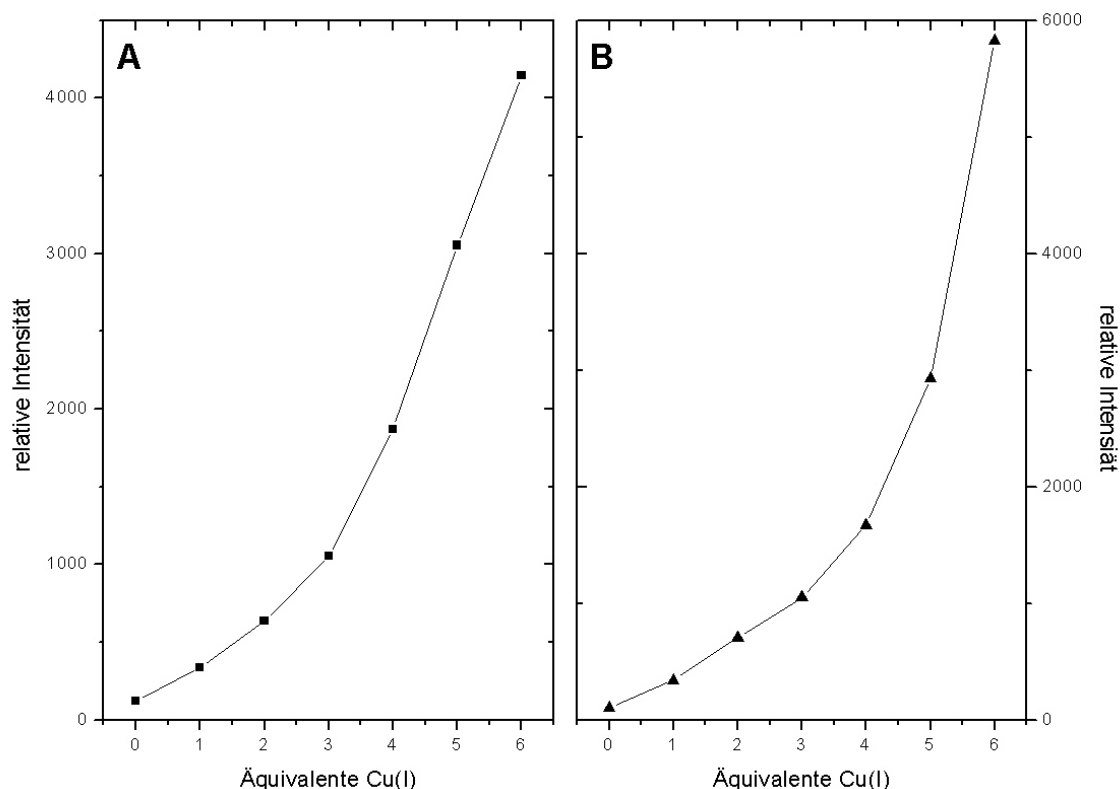


Abb. 24: Emissionsintensitäten der Cu(I)-Titration von Zn₄-α-MT (A) und Zn₃-β-MT (B). Die Kurven aus Abb. 23 wurden über den Bereich von 500 bis 650 nm integriert. Für Proben- und Messparameter Siehe Abb. 23.

4.2.2 ¹H-¹H-NOESY-Spektren nach den jeweiligen Cu-Titrationsschritten

Für die NMR-Messungen wurden ca. 0,6 μmol der entsprechenden Domäne eingewogen und in 450 μL 15 mM Acetat-d₃-puffer (3-fach deuterierte Essigsäure) pH 5,0, 20% Acetonitril-d₃ (3-fach deuteriert), 13,35% D₂O gelöst. Von einer 100 mM ZnCl₂-Lösung wurden 4 Äquivalente Zn(II) zu den Ansätzen der α-Domäne und 3 Äquivalente Zn(II) zu denen der β-Domäne hinzugefügt. Es folgten die Zugabe von 60 μL 1 M KPP pH 6,5, der für den jeweiligen Titrationsschritt notwendigen Menge Cu(I) und von H₂O bis zu einer Proteinkonzentration von 1 mM. Als Cu(I)-Reagenz diente eine jeweils frisch hergestellte Lösung von [Cu(CD₃CN)₄]ClO₄-Kristallen in 50% CD₃CN/H₂O. Die Cu(I)-Konzentration wurde mit BCS bestimmt und lag bei etwa 60 mM. Alle Präparationsschritte wurden in der *glove-box* unter einer N₂-Atmosphäre mit weniger als 1 ppm O₂ durchgeführt. Die fertigen Proben wurden in NMR-Röhrchen überführt, mit Argon überschichtet und anschließend versiegelt. Von

allen Proben wurden am 700 MHz Spektrometer AVANCE der Firma Bruker 2D- ^1H - ^1H -NOESY-Spektren aufgezeichnet, um die strukturellen Änderungen im Verlauf der Titration nachvollziehen zu können.

Abbildung 25 zeigt exemplarisch Ausschnitte aus den einzelnen NOESY-Spektren der Titration der α -Domäne von 0 bis 5 zugegebenen Äquivalenten Cu(I). Der Ausgangspunkt A zeigt das Spektrum von $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{-MT}$. Die einzelnen Spinsysteme der Amidprotonen sind in einem Bereich zwischen 6,8 ppm und 9,2 ppm aufgefächert. NOEs sind vorhanden. Dies spricht dafür, dass das Protein in einem ordentlich gefalteten Zustand vorliegt. Nach der ersten Cu(I)-Zugabe ist das Signalmuster von A noch vollständig vorhanden; es tauchen aber auch neue Spinsysteme mit neuen Peaks im Spektrum auf. Das heißt, neben der Konformation von $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{-MT}$ entsteht unter dem Einfluss von Cu(I) eine neue, die mit der ersten im Gleichgewicht steht. Die Ausschnitte von C, D und E zeigen dieselben Spinnmuster. Vom Ausgangsspektrum finden sich keine Restsignale mehr. Die Intensität der Signale ist nach der dritten Cu(I)-Zugabe (D) am größten. Zudem sind bei dieser Stöchiometrie die meisten NOEs zu erkennen. Die Konformation, die sich im Spektrum B neben der von $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{-MT}$ abgezeichnet hat, ist ab dem zweiten Äquivalent dominierend, während die Struktur der vierfach zinkbeladenen Form schon zu diesem Zeitpunkt nicht mehr im NOESY detektierbar ist. Da die meisten Peaks und die größte Peakintensität nach Zugabe von 3 Cu(I) erreicht werden, d.h. die Konzentration der Spezies, welche die in den Spektren C-E detektierbare Konformation einnehmen, ist hier am größten, besitzt die entstehende Spezies wahrscheinlich die Summenformel $\text{Zn}_x\text{Cu}_3\text{-}\alpha\text{-MT}$. Die Anzahl der an die Domäne gebundenen Zn(II) lässt sich auf diese Weise leider nicht bestimmen. Die im Spektrum nach 5 Cu(I)-Zugaben verbliebenen Signale sind eindeutig auf die zuvor identifizierte Spezies zurückzuführen. Jedoch fehlen bereits viele Signale. Neue Spinsysteme, die auf die Bildung einer weiteren Konformation hindeuten würden, bleiben aus. Die Spektren der Proben mit 6 und 7 Äquivalenten Cu(I) sind nicht dargestellt. In beiden Fällen waren keine Signale mehr erkennbar.

Die Titration der β -Domäne verlief im Wesentlichen wie die der α -Domäne, mit dem Unterschied, dass die stärksten und meisten Signale der sich während der Titration bildenden Spezies nach Zugabe von 4 Äquivalenten Cu(I) zu beobachten waren. Folglich lautet deren Summenformel $\text{Zn}_y\text{Cu}_4\text{-}\beta\text{-MT}$. Wie im Fall der α -Domäne

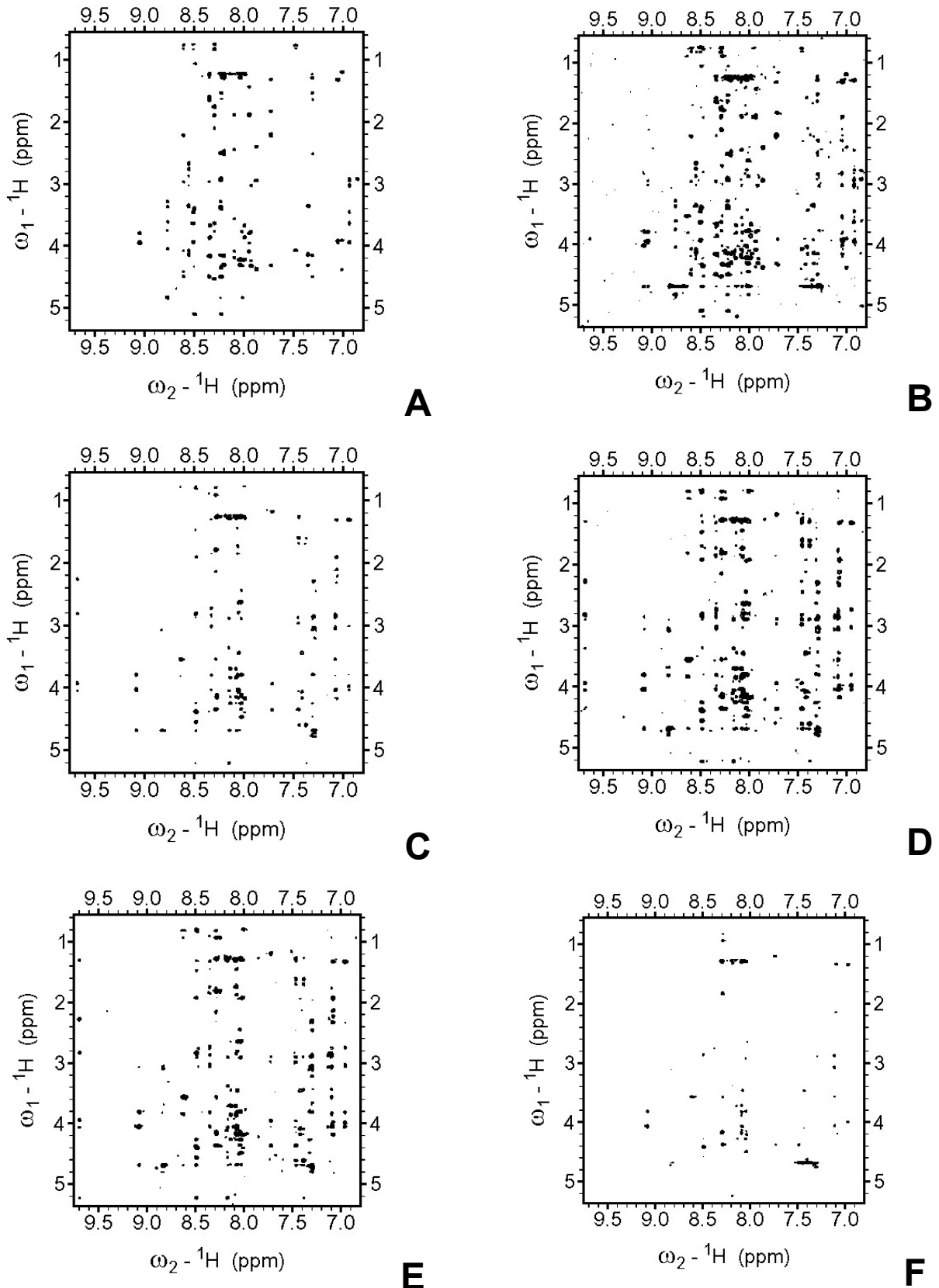


Abb. 25: Ausschnitte aus den ^1H - ^1H -NOESY-Spektren von $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{-MT}$ (A), $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{-MT} + 1 \text{ Cu(I)}$ (B), $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{-MT} + 2 \text{ Cu(I)}$ (C), $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{-MT} + 3 \text{ Cu(I)}$ (D), $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{-MT} + 4 \text{ Cu(I)}$ (E) und $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{-MT} + 5 \text{ Cu(I)}$ (F). Spektrale Parameter und Probenpräparationsbedingungen sind dieselben wie in der Legende zu Abb. 26 beschrieben.

verloren die Spektren nach Zugabe von mehr als 4 Äquivalenten Cu(I) rapide an Qualität. Neue Spinsysteme entwickelten sich auch hier nicht. Die Ausschnitte der NOESY-Spektren der beiden Spezies mit definierter Konformation sind in Abbildung 26 dargestellt.

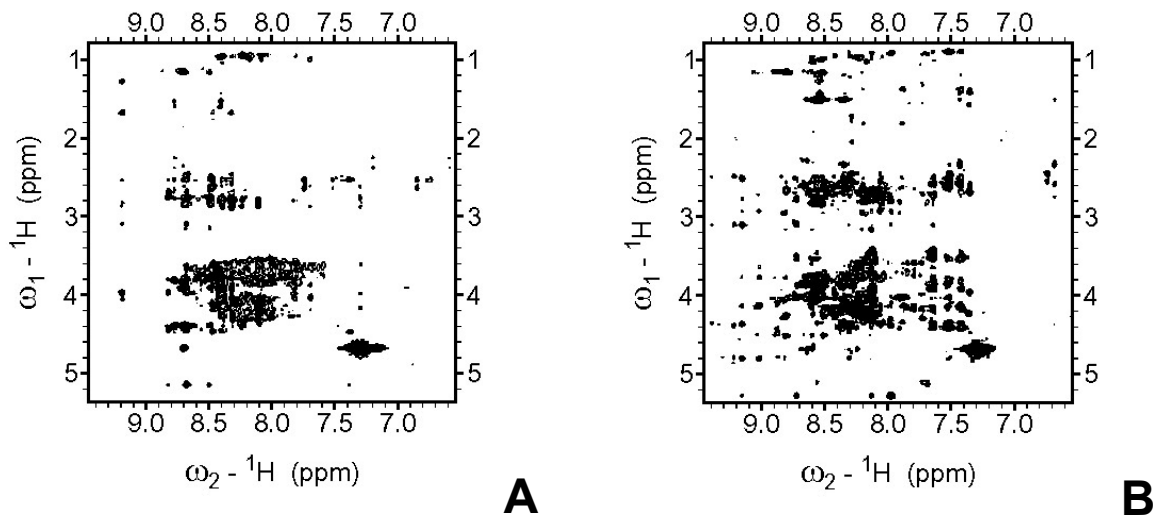


Abb. 26: Ausschnitte aus den ^1H - ^1H -NOESY-Spektren von Zn_3 - β -MT (A), Zn_yCu_4 - β -MT (B). Die Domänen lagen in einer Konzentration von 1 mM vor und waren gelöst in 15 mM Acetat- d_3 , 50 mM KPP, 15% Acetonitril- d_3 , pH 6,5. Die NOESY-Spektren wurden an einem 700 MHz NMR-Spektrometer der Firma Bruker mit einer Mischzeit von 600 ms aufgenommen.

Zur Verdeutlichung, dass es sich bei Zn_4 - α -MT und Zn_xCu_3 - α -MT bzw. Zn_3 - β -MT und Zn_yCu_4 - β -MT um strukturell verschiedene Spezies handelt, wurden die Spektren der kupferhaltigen Formen in grün denen der zinkhaltigen Formen in rot überlagert. Die Qualität der Spektren der β -Domäne scheint generell etwas schlechter zu sein als die der α -Domäne. Dies zeigt sich daran, dass die einzelnen Peaks nicht so klar voneinander abgegrenzt sind wie im Fall der α -Domäne und dass sich stattdessen zusammengelagerte Bereiche überlappender Peaks bilden. Ursache ist wahrscheinlich eine höhere Flexibilität innerhalb der β -Domäne.

Überraschend am Verlauf der Titration war, dass die Zugabe von 6 Äquivalenten Cu(I) in keiner der Domänen zur Ausbildung einer für die NMR detektierbaren Struktur führte. Frühere Arbeiten hatten die Cu(I)-zu-Protein-Stöchiometrie von 6 als typisch für die voll mit Cu(I) beladenen Domänen bezeichnet^{[Li & Weser 1992; Bofill et al. 1999,}

²⁰⁰²]. Verschiedene Zwischenstufen zu dieser voll beladenen Form wurden von Bofill et al. vorgeschlagen. Unter diesen wurde den Spezies Zn_2Cu_3 - α -MT und Zn_1Cu_4 - β -MT eine zentrale Bedeutung zugeschrieben. Möglicherweise handelt es sich bei den neu entdeckten Faltungsformen der beiden Domänen um diese.

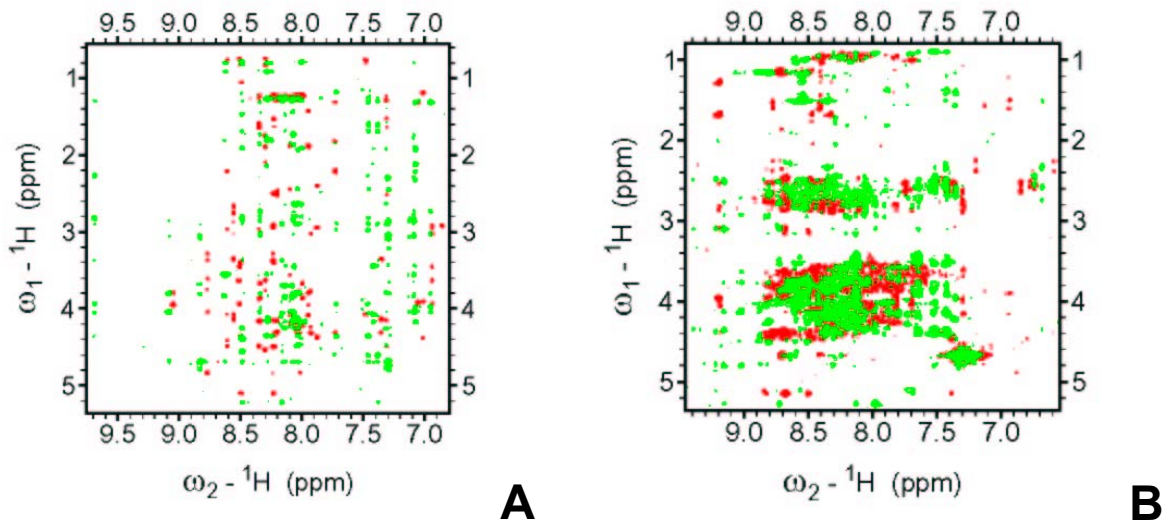


Abb. 27: (A) Überlagerung der 1H - 1H -NOESY-Spektren von Zn_4 - α -MT (rot) und Zn_xCu_3 - α -MT (grün). (B) Überlagerung der 1H - 1H -NOESY-Spektren von Zn_3 - β -MT (rot) und Zn_yCu_4 - β -MT (grün). Die spektralen Parameter und die Probenpräparationsbedingungen sind der Legende zu Abb. 26 zu entnehmen.

4.2.3 Auswertung der NOESY-Spektren und Strukturberechnungen

4.2.3.1 Zn_4 - α -Domäne

Die Strukturen der beiden cadmiumhaltigen Domänen sind in der Literatur beschrieben^[Zangger et al. 1999]. Da in früheren Strukturuntersuchungen^[Messerle et al. 1992] die Strukturidentität für cadmium- und zinkbeladene Formen von MT bereits demonstriert worden war, wurde gleichermaßen im vorliegenden Fall angenommen, dass die Ausgangsspezies, Zn_4 - α -MT, dieselbe Proteinfaltung wie Cd_4 - α -MT haben müsse. Erste Hinweise ergaben sich bei der sequentiellen Zuordnung der Signale zu den einzelnen Protonen (Tab. 8). Eine komplette Auflistung der gefundenen chemischen Verschiebungen ist in Tabelle 18 im Datenanhang zu finden.

Im Vergleich zu den veröffentlichten Daten zu Cd_4 - α -MT sind die Abweichungen der chemischen Verschiebungen der meisten Protonen mit wenigen Ausnahmen kleiner

AS-Reste			Zn ₄ - α MT	Cd ₄ - α MT	AS-Reste			Zn ₄ - α MT	Cd ₄ - α MT
1	Lys			8,37	17	Gly	7,52	7,40	
2	Ser			8,82	18	Cys	8,91	8,85	
3	Cys	8,12		8,18	19	Val	7,67	7,40	
4	Cys	8,24		8,36	20	Cys	8,85	9,14	
5	Ser	9,04		8,99	21	Lys	8,67	8,50	
6	Cys	8,47		8,51	22	Gly	8,66	8,62	
7	Cys	7,07		7,21	23	Ala	8,29	8,16	
8	Pro				24	Ala	8,29	7,77	
9	Val	8,60		8,59	25	Asp	8,44	8,40	
10	Gly	8,88		8,91	26	Lys	7,57	7,76	
11	Cys	7,14		7,04	27	Cys	8,46	8,57	
12	Ser	9,40		9,43	28	Thr	8,88	8,96	
13	Lys	8,21		8,33	29	Cys	8,44	8,39	
14	Cys	8,24		7,66	30	Cys	8,09	7,84	
15	Ala	7,28		7,11	31	Ala	7,19	7,18	
16	Gln	8,01		8,15					

Tab. 8: Vergleich der ^1H -Resonanzen von Zn₄- α MT und Cd₄- α MT. Für die Aufnahmebedingungen der Spektren gilt das gleiche wie in der Legende zu Abb. 26 beschrieben.

als 0,1 ppm. Ein Grund für die wenigen größeren Abweichungen könnte sein, dass sich die entsprechenden Protonen im nativen Protein in räumlicher Nähe zur anderen Domäne befinden und sich deren chemische Umgebung bei der Untersuchung der isolierten Domäne verglichen mit der Situation im intakten Protein besonders gravierend ändert. Die zugeordneten Signale im Spektrum von Zn₄- α MT wurden mit der entsprechenden Funktion des Programms Sparky integriert und die Volumina anschließend mit Caliba in Abstandsinformationen konvertiert. Diese experimentell erhaltenen Abstandsbedingungen wurden verwendet, um mit DYANA, das einen simulierten *annealing*-Algorithmus benutzt, Proteinkonformere generieren zu lassen. Von den insgesamt 410 NOE Signalen waren 313 bedeutungsvoll. Mit GLOMSA wurden 16 stereospezifische Zuordnungen für diastereotope Protonen und Methylgruppen hinzugefügt. Da Strukturidentität mit der bereits aufgeklärten cadmiumhaltigen α -Domäne angenommen wurde, wurden Bedingungen für die Metallpositionen innerhalb der Polypeptidkette in die Strukturberechnungen aufgenommen. Dazu wurden 4 Metallatome wie in Bertini et al. 2000 beschrieben in die AS-Sequenzdatei geschrieben. Diese waren mit der eigentlichen AS-Sequenz

der α -Domäne und untereinander über je 25 *linker*-Reste verknüpft. Zwischen den Metallatomen und den sie in der Cd_4 - α MT-Struktur koordinierenden Cysteinylschwefelatomen (Abb. 28) wurden *lower* und *upper distance limits* von 2,20 Å und 3,10 Å vorgegeben.

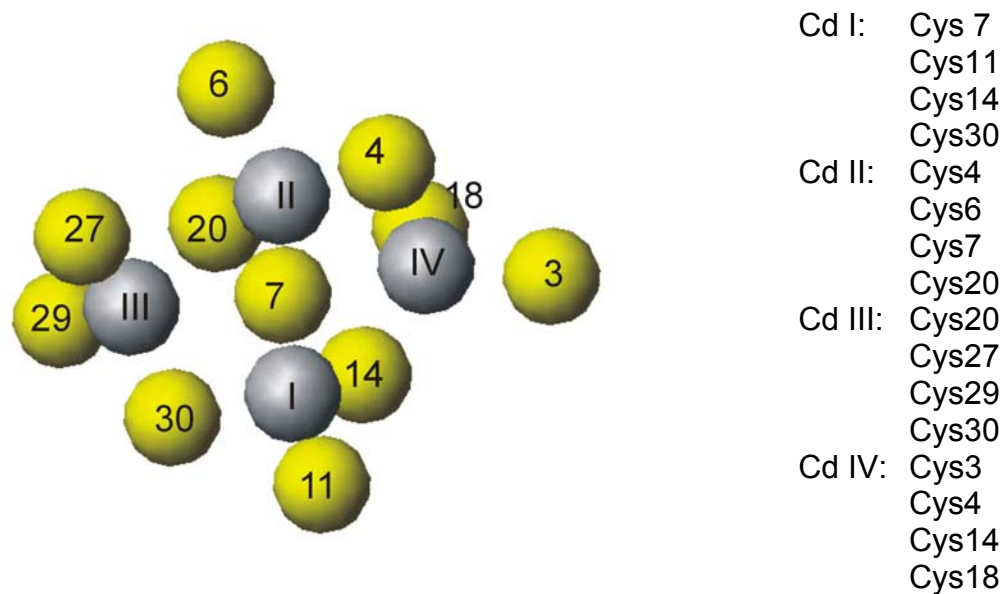


Abb. 28: Metallthiolatzentrum der α -Domäne aus Maus- Cd_7 -MT-1. Die vier Metallionen sind als graue mit römischen Zahlen durchnummerierte Kugeln dargestellt. Die Cysteinylschwefelatome als gelbe Kugeln tragen die Positionsnummern der Cysteinylreste innerhalb der AS-Sequenz der α -Domäne. Die Koordinaten für die Struktur wurden aus der Brookhaven protein data bank (1DFS) übernommen. Rechts sind zu den einzelnen Cadmiumionen die sie koordinierenden Cysteinylreste aufgelistet.

Im letzten Programmdurchlauf von DYANA wurden 200 Strukturen erzeugt. Davon bildeten 20 eine Strukturfamilie mit einer Zielfunktion von $0,52 \pm 0,13 \text{ \AA}^2$. Die RMSD-Werte bezogen auf die gemittelte Struktur waren $1,04 \pm 0,12 \text{ \AA}$ und $1,51 \pm 0,18 \text{ \AA}$ für das Polypeptidrückgrat bzw. alle schweren Atome. Abbildung 29 zeigt die Stereodarstellung der Polypeptidketten der Strukturfamilie von Zn_4 - α MT (blau) überlagert mit der veröffentlichten Cd_4 - α MT-Struktur (rot), deren Koordinaten aus der Brookhaven protein data bank (1DFS) übernommen wurden. Das rot dargestellte Polypeptidrückgrat von Cd_4 - α MT verläuft durchweg innerhalb der Grenzen, die durch die Strukturfamilie von Zn_4 - α MT vorgegeben wurde. Dies zeigt,

dass bei Zn(II)- und Cd(II)-Beladung der α -Domäne von gleichartiger Proteinfaltung ausgegangen werden kann.

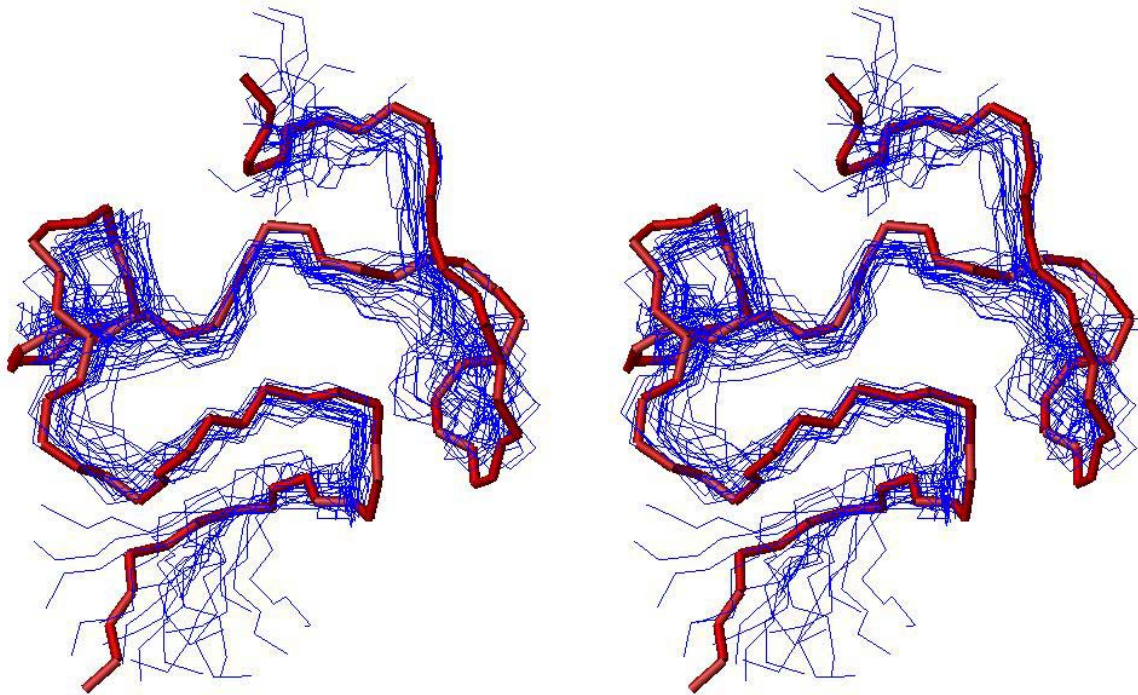


Abb. 29: Stereodarstellung einer Familie von 20 Strukturen von Zn_4 - α MT (blau) überlagert von der gemittelten energieminierten Struktur von Cd_4 - α MT (Koordinaten aus der Brookhaven protein data bank (1DFS)). Für die letzte Strukturberechnungen mit DYANA wurden 9000 *annealing* Schritte verwendet. Aus 200 Strukturen wurden die 20 mit der niedrigsten Zielfunktion zu einer Strukturfamilie zusammengefasst.

Für die vorliegende Strukturberechnung wurden jedoch ausgehend von der Annahme der Strukturidentität von Cd_4 - und Zn_4 - α MT Konnektivitäten für die Bindung der Metallatome an die α -Domäne verwendet, die aus der Strukturbestimmung von Cd_4 - α MT übernommen wurden, im vorliegenden Fall aber experimentell nicht beobachtet worden waren. Um zu überprüfen, ob das Ergebnis dadurch wesentlich beeinflusst worden war, wurde ein weiterer Programmdurchlauf von DYANA ohne diese Strukturbedingungen durchgeführt. Die resultierende Strukturfamilie hatte eine Zielfunktion von $0,15 \pm 0,11 \text{ \AA}^2$ und RMSD-Werte von $1,51 \pm 0,27 \text{ \AA}$ und $2,22 \pm 0,30 \text{ \AA}$ für das Polypeptidrückgrat bzw. alle schweren Atome. Beim Vergleich der gemittelten Strukturen der beiden Strukturberechnungen mit und ohne Metall-zu-Cystein-Konnektivitäten wurden RMSD-Werte von $0,79 \text{ \AA}$ und $1,19 \text{ \AA}$ erhalten. Da diese gegenüber den Ergebnissen der einzelnen DYANA-Programmdurchläufe klein

waren, bedeutet das für die zusätzlich eingeführten Bedingungen, dass diese für die Proteinfaltung nicht entscheidend waren. Auch ohne die Metall-zu-Cystein-Konnektivitäten wurde dieselbe Konformation ermittelt. Die Auflösung wurde durch sie jedoch bedeutend verbessert.

Einen weiteren wichtigen Hinweis zur Übereinstimmung der Strukturen von Cd₄- und Zn₄-αMT lieferte der Vergleich der experimentell beobachteten NOEs. Für die Struktur der cadmiumhaltigen Domäne wurden 22 NOEs langer Reichweite beschrieben (Tab. 9)^[Zangger et al. 1999]. Von diesen wurden 17 auch im NOESY-Spektrum von Zn₄-αMT wieder gefunden. Die fehlenden NOEs zwischen den Amidprotonen K1 bzw. S2 und den γ-Methylprotonen von V9 betreffen, zumindest teilweise, eine in der ermittelten Struktur von Zn₄-αMT recht flexible Region. Der N-Terminus der Domäne befände sich im intakten Protein in der *linker*-Region zwischen den beiden Domänen. Durch das Fehlen der β-Domäne verliert diese vermutlich an Halt. Die erhöhte Flexibilität zeigte sich auch dadurch, dass die NH-Resonanzen von K1 und S2 im Spektrum nicht vorhanden waren. Was die NOEs S5(β)—D25(HN) und C6(β)—C27(α) angeht, so konnten zwischen den jeweiligen Protonen in der Struktur von Cd₄-αMT Entfernungen von 4,8 – 6 Å gemessen werden. Da jedoch nur Entfernungen bis ca. 5 Å zu NOE-Signalen führen, kann eine minimale Veränderung der Lage der entsprechenden Protonen durch den Metallaustausch bereits zu einem Verschwinden der Signale geführt haben. C6(α) und D25(α) hatten im NOESY-Spektrum von Zn₄-αMT nahezu dieselbe chemische Verschiebung, so dass

Lys 1 (NH)	-----	Val 9 (γ)	-	Cys 6 (β)	-----	Lys 26 (HN)	+
Lys 1 (α)	-----	Val 9 (γ)	+	Cys 6 (β)	-----	Lys 26 (α)	+
Ser 2 (β)	-----	Val 9 (β)	+	Cys 6 (α)	-----	Cys 27 (HN)	+
Ser 2 (HN)	-----	Val 9 (γ)	-	Cys 6 (β)	-----	Cys 27 (HN)	+
Cys 3 (HN)	-----	Val 9 (γ)	+	Cys 6 (β)	-----	Cys 27 (α)	-
Cys 3 (α)	-----	Cys 18 (β)	+	Cys 6 (β)	-----	Cys 27 (β)	+
Cys 3 (β)	-----	Cys 18 (HN)	+	Lys 13 (β)	-----	Val 19 (γ)	+
Ser 5 (β)	-----	Asp 25 (HN)	-	Lys 13 (γ)	-----	Val 19 (γ)	+
Cys 6 (α)	-----	Asp 25 (HN)	+	Lys 13 (γ)	-----	Cys 30 (α)	+
Cys 6 (α)	-----	Asp 25 (α)	-	Cys 14 (NH)	-----	Val 19 (γ)	+
Cys 6 (α)	-----	Lys 26 (HN)	+	Val 19 (γ)	-----	Cys 19 (β)	+

Tab. 9: NOEs mit langer Reichweite zwischen Protonen, die mindestens fünf AS-Reste voneinander entfernt sind ($d_{ij}; j > i + 4$)^[Zangger et al. 1999]. Durch + und – wird angezeigt, ob die jeweiligen NOEs im Spektrum von Zn₄-αMT gefunden wurden.

Schnittpunkte ihrer Resonanzen auf die Diagonale fielen und daher keine NOEs beobachtet werden konnten. Das Vorhandensein anderer NOEs zwischen denselben Resten zeigte jedoch, dass die Proteinfaltung in den Segmenten um C6 und D25 in Cd₄- und Zn₄- α -MT identisch ist.

4.2.3.2 Zn₃- β -Domäne

Wie im Fall der α -Domäne sollte überprüft werden, ob Zn₃- β -MT strukturidentisch mit der bereits bekannten cadmiumhaltigen Form ist. Das ¹H-¹H-NOESY-Spektrum war von schlechterer Qualität als das der zinkhaltigen α -Domäne. Allgemein traten nur sehr wenige Signale in Erscheinung. Zudem gab es in gewissen Regionen Anhäufungen von Peaks, was zu schwer auswertbaren Überlappungen führte. Schon anhand der geringen Anzahl an NOEs war eine wenig kompakte Struktur zu erwarten. In der Arbeit, die sich mit Maus-Cd₇-MT-1 beschäftigte, wurde zwar kein ¹H-¹H-NOESY-Spektrum veröffentlicht, doch aus der graphischen Darstellung der sequentiellen NOEs kurzer und mittlerer Reichweite der β -Domäne konnte geschlossen werden, dass auch in diesem Fall die spektrale Qualität zu wünschen übrig gelassen hatte^[Zangger et al. 1999]. Demnach verhalten sich die Zn(II)- und die Cd(II)-rekonstituierten β -Domänen hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften im NMR gleich. Als Gründe dafür kommen wie oben schon erwähnt eine wenig kompakte Struktur der diese beiden Metalle bindenden β -Domäne und möglicherweise eine hohe Flexibilität der Polypeptidkette in Frage. Die chemischen Verschiebungen für Zn₃- β -MT wurden bei der sequentiellen Zuordnung der Signale zu den jeweiligen Protonen identifiziert. Eine vollständige Liste der chemischen Verschiebungen findet sich in Tabelle 19 im Datenanhang neben den Werten der β -Domäne von Cd₇-MT. Auszugsweise wurden die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen in Tabelle 10 einander gegenübergestellt.

Auch in diesem Fall waren die Werte sehr ähnlich, Abweichungen blieben zumeist innerhalb eines Bereiches von 0,2 ppm. Dies zeigt, dass die chemische Umgebung der einzelnen Protonen unabhängig von den gebundenen Metallkationen, Cd(II) oder Zn(II), zumindest sehr ähnlich war. Wegen der geringen Anzahl an NOEs war eine Strukturberechnung jedoch nicht sehr sinnvoll. Die zu erwartende Auflösung ohne zusätzliche Metall-zu-Cystein-Konnektivitäten wäre sehr gering gewesen und hätte keine klare Aussage zugelassen. Für die cadmiumhaltige β -Domäne des intakten Proteins ist die Struktur bekannt. Doch trotz zusätzlicher Cadmium-Cysteinyll-

Konnektivitäten wurde für die ermittelte Strukturfamilie lediglich ein RMSD von 1,92 Å für die Polypeptidrückgratotope erreicht^[Zangger et al. 1999].

AS-Reste	Zn ₃ -βMT	Cd ₃ -βMT	AS-Reste	Zn ₃ -βMT	Cd ₃ -βMT	
1	Met	7,94	16	Thr	8,36	8,21
2	Asp	7,70	17	Ser	8,44	8,46
3	Pro		18	Ser	7,96	7,96
4	Asn	8,74	19	Ser		8,43
5	Cys	7,66	20	Ala	8,98	9,09
6	Ser	8,95	21	Cys	8,76	8,78
7	Cys	9,09	22	Lys	8,68	8,77
8	Ser	8,68	23	Asn	9,05	8,90
9	Thr	8,47	24	Cys	8,95	8,50
10	Gly	8,10	25	Lys	9,46	9,21
11	Gly	8,36	26	Cys	8,59	8,66
12	Ser	8,28	27	Thr	8,66	8,83
13	Cys	8,38	28	Ser	8,08	8,21
14	Thr	8,51	29	Cys	7,56	7,33
15	Cys	8,61	30	Lys	7,19	7,78

Tab. 10: Vergleich der H^N-Resonanzen von Zn₃-βMT und Cd₄-βMT^[Zangger et al. 1999]. Für die Aufnahmebedingungen der Spektren gilt das gleiche wie in der Legende zu Abb. 26 beschrieben.

Als weiteres Indiz für die Identität der Strukturen können zusätzlich zu den sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen die veröffentlichten NOEs langer Reichweite herangezogen werden, von denen für die gesamte β-Domäne von Cd₇-MT lediglich 6 beschrieben worden waren (Tab. 11). Im ¹H-¹H-NOESY-Spektrum von Zn₃-βMT konnten die ersten fünf *long range* NOEs gefunden werden. Daraus kann abgelesen werden, dass in beiden Spezies die Region N4-C5 der Region C21-N23 nahe kommt. Das Signal zwischen Asn 23 und Cys 29 blieb aus. C29 befindet sich in der Nähe des C-terminalen Endes der β-Domäne und damit in der Nähe der *linker*-Region des intakten Proteins. Da die Cd₃-βMT-Struktur aus dem intakten Protein heraus bestimmt wurde, könnten in diesem Fall die *linker*-Region und die daran anknüpfende α-Domäne geholfen haben, den C-terminalen Bereich der β-Domäne besser zu fixieren.

Asn 4 (α)	-----	Lys 22 (β)	+
Asn 4 (α)	-----	Asn 23 (NH)	+
Asn 4 (β)	-----	Asn 23 (NH)	+
Cys 5 (α)	-----	Cys 21 (β)	+
Cys 5 (β)	-----	Cys 21 (β)	+
Asn 23 (β)	-----	Cys 29 (α)	-

Tab. 11: NOEs mit langer Reichweite zwischen Protonen, die mindestens fünf AS-Reste voneinander entfernt sind (d_{ij} ; $j > i + 4$).^[Zangger et al. 1999] Durch + und – wird angezeigt, ob die jeweiligen NOEs im Spektrum von Zn_4 - α MT gefunden wurden.

4.2.3.3 Zn_xCu_3 - α -Domäne

Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, zeigten die 1H - 1H -NOESY-Spektren von Zn_4 - α MT und Zn_xCu_3 - α MT signifikante Unterschiede in Bezug auf die Signalmuster (Abb. 27 A). Dies wurde durch die sequentielle Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Protonen bestätigt. Die vollständige Liste der chemischen Verschiebungen ist in Tabelle 18 im Datenanhang zu finden.

AS-Reste	Zn_4 - α MT	Zn_xCu_3 - α MT	AS-Reste	Zn_4 - α MT	Zn_xCu_3 - α MT
1 Lys			17 Gly	7,52	7,70
2 Ser			18 Cys	8,91	8,35
3 Cys	8,12	8,32	19 Val	7,67	8,29
4 Cys	8,24	7,60	20 Cys	8,85	8,77
5 Ser	9,04	9,11	21 Lys	8,67	8,77
6 Cys	8,47	7,58	22 Gly	8,66	8,42
7 Cys	7,07	7,58	23 Ala	8,29	8,36
8 Pro			24 Ala	8,29	8,56
9 Val	8,60	8,57	25 Asp	8,44	8,32
10 Gly	8,88	8,91	26 Lys	7,57	7,74
11 Cys	7,14	7,37	27 Cys	8,46	7,66
12 Ser	9,40	9,36	28 Thr	8,88	8,45
13 Lys	8,21	8,35	29 Cys	8,44	9,98
14 Cys	8,24	8,63	30 Cys	8,09	7,74
15 Ala	7,28	7,24	31 Ala	7,19	8,00
16 Gln	8,01	7,36			

Tab. 12: Vergleich der H^N -Resonanzen von Zn_4 - α MT und Zn_xCu_3 - α MT. Für die Aufnahmebedingungen der Spektren gilt das gleiche wie in der Legende zu Abb. 26 beschrieben.

In Tabelle 12 sind beispielhaft die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen aufgelistet. Abgesehen von dem kurzen Abschnitt V9-K13 differieren die Resonanzen der beiden Spezies signifikant, was bedeutet, dass für diese kurze Sequenz eine lokal begrenzte ähnliche Polypeptidfaltung und chemische Umgebung zu erwarten ist. Für den Rest der Polypeptidkette werden größere Unterschiede zwischen Cu(I)-haltiger und Cu(I)-freier Form vorhergesagt.

Die Signale im Spektrum von $Zn_xCu_3\text{-}\alpha\text{MT}$ wurden integriert und in insgesamt 502 interatomare Abstände umgewandelt. Unter der Annahme, dass die 11 Cysteinylthiolate die Metallionen in einem gemeinsamen Metallthiolatcluster binden und somit nicht allzu weit voneinander entfernt sind, wurden für alle Cysteinylschwefel untereinander 55 *upper distance limits* von 12 Å und 55 *lower distance limits* von 3,40 Å hinzugefügt. 22 stereospezifische Zuordnungen konnten für diastereotope Protonen hinzugefügt werden. Für den letzten Programmdurchlauf von DYANA wurden somit 470 bedeutungsvolle Strukturbedingungen berücksichtigt. Es wurden 200 Konformere erzeugt, von denen die 20 mit den niedrigsten Zielfunktionen eine Strukturfamilie bildeten. Die Zielfunktion lag bei durchschnittlich $0,43 \pm 0,10 \text{ \AA}^2$. Es wurden RMSD-Werte von $0,70 \pm 0,12 \text{ \AA}$ und $1,03 \pm 0,14 \text{ \AA}$ für die Atome des Polypeptidrückgrats bzw. alle schweren Atome erhalten.

In Abbildung 30 ist die Struktur für $Zn_xCu_3\text{-}\alpha\text{MT}$ dargestellt. Wie erwartet weisen die Cysteinylreste mit ihren Schwefelatomen ins Innere der vom Polypeptid umschlossenen Struktur. Untypisch für MT wurde im Bereich S12-Q16 ein kurzer helikaler Abschnitt gefunden. Ansonsten waren keine weiteren typischen Sekundärstrukturelemente vorhanden. Der helikale Bereich ist in Abbildung 30 vorne links zu sehen und schwarz eingefärbt. Mit dem davon N-terminal gelegenen Teil der Polypeptidkette wird der Innenraum nach unten hin begrenzt, indem die Kette im Winkel von 90° nach hinten verläuft, dort mit den Resten S5 und C6 eine Schleife beschreibt und sich dann wieder auf den Betrachter zu windet. Am C-terminalen Ende der kurzen Helix verläuft die Kette nach hinten bis zum Rest K21. Zwischen K21 und K26 bildet die Polypeptidkette eine schlecht aufgelöste Schlaufe aus, die den Innenraum vom Betrachter her gesehen nach hinten links abschließt. Durch die Schlaufe kommt der Rest C20 den Resten C27 und T28 sehr nahe. Dies wird durch die Kontrolle im NOESY-Spektrum bestätigt, das einige NOEs zwischen diesen Resten aufweist. Die Reste T28 bis A31 begrenzen den Innenraum mit dem zu ihnen parallelen N-terminalen Ende nach rechts und mit dem Abschnitt G17 bis G22 nach

oben. Somit wird durch die Polypeptidfaltung eine Art Tasche beschrieben, die zum Betrachter hin geöffnet ist. Es fällt auf, dass die Cysteinylothiolate in zwei Gruppen gegliedert sind, innerhalb derer sie nahezu auf jeweils einer Ebene zu liegen kommen. Diese beiden Ebenen stehen parallel zueinander und begrenzen zwischen sich einen Spalt, auf den der Betrachter in Abbildung 30 blickt. Es ist interessant, dass eine ähnliche Anordnung der Cysteinylothiolate bereits im Fall der hochaufgelösten NMR-Struktur von Hefe-MT^[Bertini et al. 2000] beschrieben wurde.

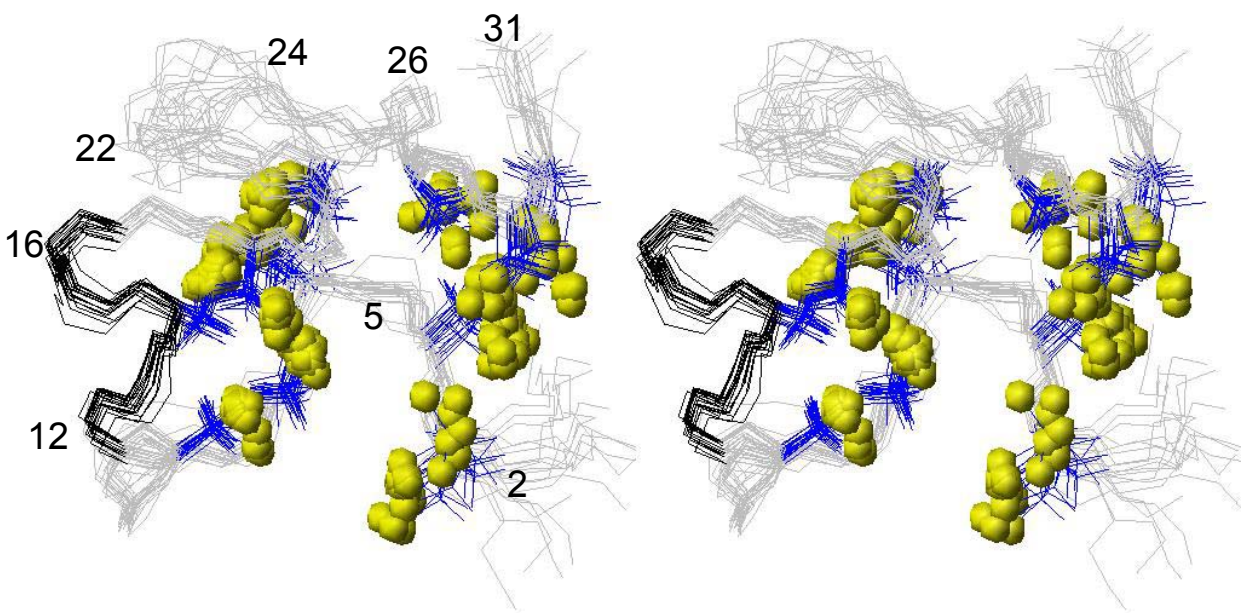


Abb. 30: Stereodarstellung einer Familie von 20 Strukturen von $Zn_xCu_3\text{-}\alpha\text{MT}$. Dargestellt sind die Bindungen des Polypeptidrückgrates in grau, der kurze helikale Bereich von S20 bis Q16 in schwarz, die Cysteinylseitenketten als blaue Linien und deren Schwefelatome als gelbe Kugeln. Auf der linken Seite sind die Positionsnummern einiger AS-Reste an die Kette geschrieben. Für die letzte Strukturberechnungen mit DYANA wurden 9000 *annealing* Schritte verwendet. Aus 200 Strukturen wurden die 20 mit der niedrigsten Zielfunktion zu einer Strukturfamilie zusammengefasst.

Mit NMR lässt sich zwar nicht ermitteln, wie die Metallionen Cu(I) und Zn(II) an die Polypeptidmatrix gebunden sind, der Spalt zwischen den Cysteinylschwefelatomen, der quer durch das Molekül verläuft, bietet jedoch genügend Platz für die Ausbildung des Metallthiolatclusters. Die genaue Zahl der Metallionen in dem Cluster ist zudem unklar. Vermutlich sind 3 Cu(I) in dem Cluster gebunden, da die Zugabe von

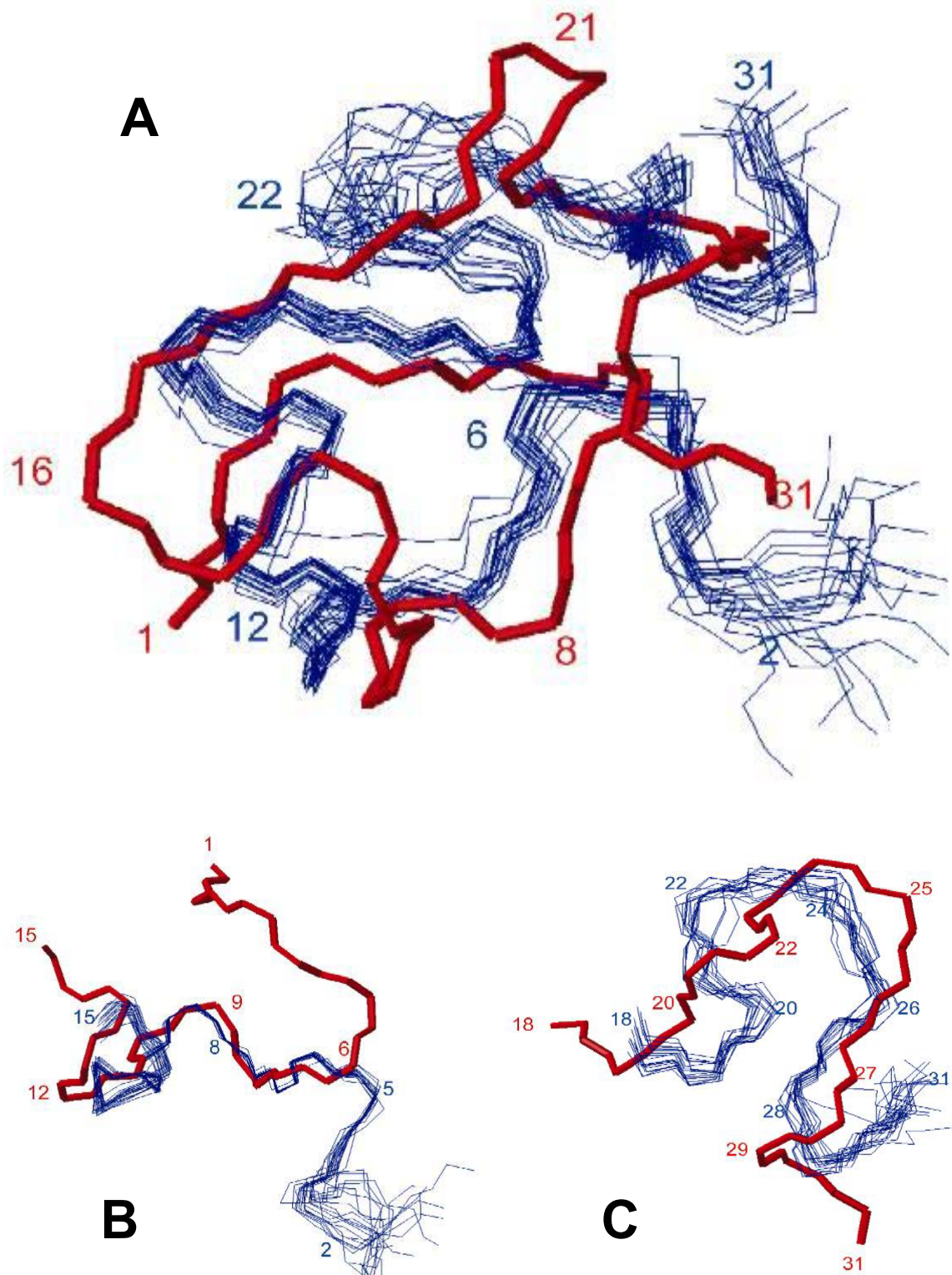


Abb. 31: Überlagerung der Strukturfamilie von $Zn_xCu_3\text{-}\beta\text{MT}$ (blau) mit der gemittelten Struktur von $Cd_4\text{-}\alpha\text{MT}$ (rot). Deren Koordinaten wurden aus der Brookhaven protein data bank (1DFS) erhalten. (A) Reste 3-30 wurden der Struktur von $Cd_4\text{-}\alpha\text{MT}$ überlagert. (B) Für die Überlagerung wurden die Reste 6-12 berücksichtigt. (C) Überlagerung der Sequenzen 19-28.

3 Äquivalenten Cu(I) zur Ausbildung des NOESY-Spektrums mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis führte. Die Anzahl der noch gebundenen Zn(II) ließ sich jedoch mit den eingesetzten Methoden nicht bestimmen. In Analogie zu Bofill et al. 2001 wäre die Summenformel $\text{Cu}_3\text{Zn}_2\text{-}\alpha\text{MT-1}$ mit zwei in der α -Domäne verbliebenen Zn(II) denkbar. Was die Koordinationsgeometrie der einzelnen Metallionen angeht, so kann an dieser Stelle mit Verweis auf bereits bekannte Strukturdaten nur spekuliert werden. In Hefe-MT (Siehe oben) wurden die 8 gefundenen Cu(I) sowohl linear als auch trigonal koordiniert. Grundsätzlich kämen im Fall der Maus- α -Domäne auch beide Möglichkeiten der Cu(I)-Koordination in Betracht. In Analogie schon bekannter Zn-MT-Strukturdaten^[Robbins et al. 1991; Messerle et al. 1992] wurde für Zn(II)-Ionen tetraedrische Koordination erwartet. Da eine Identifizierung von Metallbindungsstellen in $\text{Zn}_y\text{Cu}_4\text{-}\beta\text{MT}$ durch Einführen von Bedingungen für die Metallbindung in die Strukturberechnung trotz höheraufgelöster Ausgangsstruktur zu keinem eindeutigen Ergebnis geführt hatte (Siehe unten), wurde hierauf im Fall der vorliegenden Cu(I)-haltigen α -Domäne verzichtet.

Durch Überlagerung der Struktur von $\text{Zn}_x\text{Cu}_3\text{-}\alpha\text{MT}$ mit der Struktur von $\text{Cd}_4\text{-}\alpha\text{MT}$ über den Sequenzbereich von C3-C30 hinweg wird deutlich, dass die Bindung von Cu(I) an die α -Domäne zu einer signifikanten Konformationsänderung führt (Abb. 31 A). Dies hatte sich bereits nach der Zuordnung der chemischen Verschiebungen zu den einzelnen Protonen abgezeichnet. In Abbildung 31 B und C sind überlagerte Teilbereiche der Strukturen vergrößert dargestellt. B zeigt das Segment K1-A15, für dessen Überlagerungen lediglich C6-S12 berücksichtigt wurden. Im Bereich C6-S12 stimmen die Strukturen von $\text{Cd}_4\text{-}$ und $\text{Zn}_x\text{Cu}_3\text{-}\alpha\text{MT}$ überraschend gut überein. Für den Bereich V9-S12 wurde dieses anhand der Ähnlichkeit der Amidprotonenresonanzen bereits vorhergesagt. Interessanterweise verlaufen von C6 ab die N-terminalen Enden in komplett entgegengesetzte Richtung. In Teil C sind die C-terminalen Enden der Polypeptide abgebildet. Die oben bereits erwähnten NOEs zwischen C20 und C27 bzw. T28 führen dazu, dass sich die entsprechenden AS-Reste in der Struktur sehr nahe kommen und sich die dazwischen liegende Kette wieder zu einer Schlaufe aufwindet. In dieser Hinsicht unterscheidet sich die Cu(I)-haltige Form von $\text{Cd}_4\text{-}\alpha\text{MT}$. In dem Spektrum der letztgenannten Spezies wurden keine NOEs zwischen den oben genannten Resten beobachtet, so dass in der resultierenden Struktur das Segment V19-G22 parallel

zum Segment K26-C29 verläuft. Die dazwischen liegenden Reste beschreiben eine 180°-Wendung.

4.2.3.4 Zn_yCu₄-β-Domäne

Auch bei der β-Domäne unterschieden sich die Spinmuster von Zn₃-βMT und der kupferhaltigen Form offensichtlich. Tabelle 19 listet alle chemischen Verschiebungen auf, die im Zuge der sequentiellen Signalzuordnung bestimmt wurden. Viele der Resonanzen der beiden Spezies differieren signifikant.

AS-Reste	Zn ₃ -βMT	Zn _x Cu ₄ -βMT	AS-Reste	Zn ₃ -βMT	Zn _x Cu ₄ -βMT	
1	Met		16	Thr	8,36	8,88
2	Asp	8,91	17	Ser	8,44	8,51
3	Pro		18	Ser	7,96	8,06
4	Asn	8,74	19	Ser		8,48
5	Cys	7,66	20	Ala	8,98	9,08
6	Ser	8,95	21	Cys	8,76	8,79
7	Cys	9,09	22	Lys	8,68	8,81
8	Ser	8,68	23	Asn	9,05	8,62
9	Thr	8,47	24	Cys	8,95	7,79
10	Gly	8,10	25	Lys	9,46	8,16
11	Gly	8,36	26	Cys	8,59	8,47
12	Ser	8,28	27	Thr	8,66	8,87
13	Cys	8,38	28	Ser	8,08	8,45
14	Thr	8,51	29	Cys	7,56	8,37
15	Cys	8,40	30	Lys	7,19	7,63

Tab. 13: Vergleich der H^N-Resonanzen von Zn₃-βMT und Zn_yCu₄-βMT. Für die Aufnahmebedingungen der Spektren gilt das gleiche wie in der Legende zu Abb. 26 beschrieben.

Um zu verstehen wie diese Unterschiede auf struktureller Ebene zustande kommen, wurden die im Spektrum von Zn_yCu₄-βMT zugeordneten NOEs wie in Abschnitt 4.2.3.1 beschrieben in 500 Abstandsinformationen transformiert. Zu diesen wurden 23 stereospezifische Zuordnungen diastereotoper Protonen hinzugefügt. Insgesamt wurden für die Strukturberechnungen 380 bedeutungsvolle modifizierte Bedingungen in das Programm DYANA eingelesen. Als Resultat wurden im letzten Programmdurchlauf durch simuliertes *annealing* 200 Strukturen erzeugt. Von diesen

wurden die 20 mit der besten Zielfunktion zu einer Strukturfamilie zusammengefasst. Die Zielfunktion lag bei durchschnittlich $0,19 \pm 0,02 \text{ \AA}^2$. Bezogen auf die gemittelte Struktur hatte die Strukturfamilie im Bereich von Rest 3-30 RMSD-Werte von $0,49 \pm 0,21 \text{ \AA}$ und $0,72 \pm 0,21 \text{ \AA}$ für die Atome des Polypeptidrückgrats bzw. alle schweren Atome. Abbildung 32 zeigt die resultierende Strukturfamilie in Stereoansicht. Neben den Bindungen des Polypeptidrückgrats in grau sind die Cysteinylseitenketten als blaue Linien und die Cysteinylschwefelatome als gelbe Kugeln dargestellt.

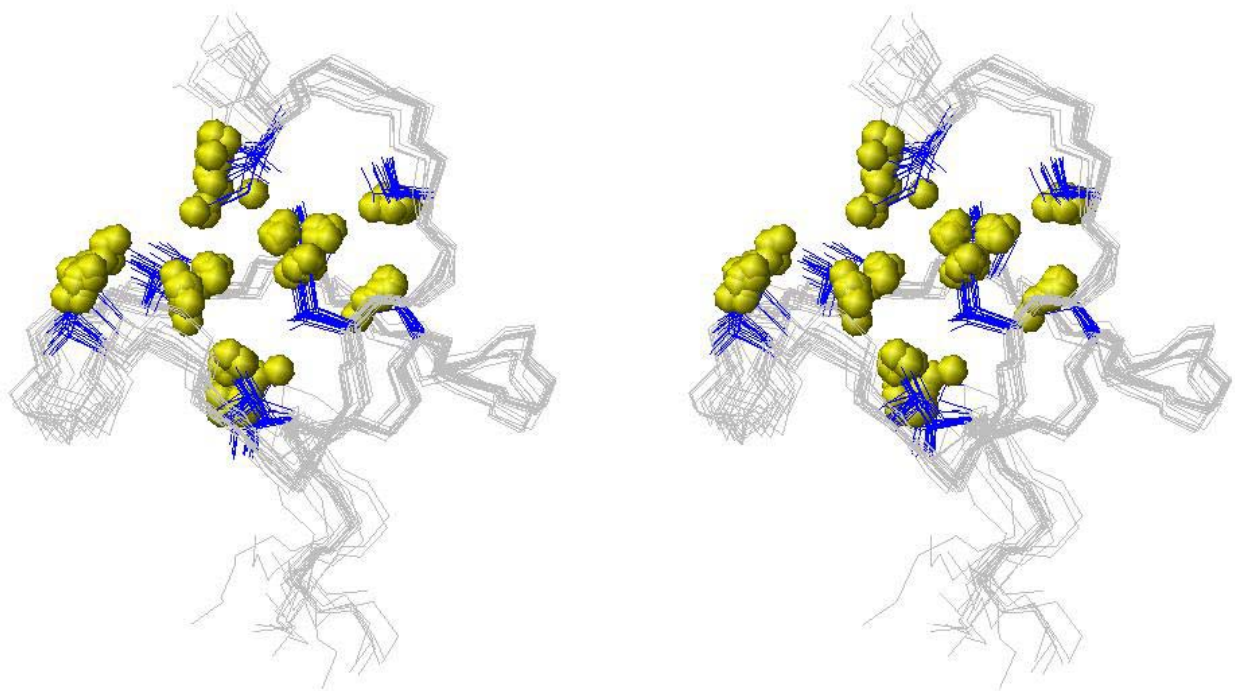


Abb. 32: Stereodarstellung einer Familie von 20 Strukturen von Zn_7Cu_4 - β MT. Dargestellt sind die Bindungen des Polypeptidrückgrates in grau, die Cysteinylseitenketten als blaue Linien und deren Schwefelatome als gelbe Kugeln. Für die letzte Strukturberechnungen mit DYANA wurden 9000 *annealing* Schritte verwendet. Aus 200 Strukturen wurden die 20 mit der niedrigsten Zielfunktion zu einer Strukturfamilie zusammengefasst.

Es fällt auf, dass alle Schwefelatome in den durch die Polypeptidkette umschlossenen Innenraum hineinweisen. Ähnliches wurde bei anderen schon aufgeklärten Strukturen von Metallothioneinen wie der von Hefe-MT (Siehe oben) oder denen von verschiedenen zink- und cadmiumhaltigen Vertebraten-MT^{[Romero-Isart}

& Vasak 2002] beobachtet. In allen bekannten Strukturen von MT wird die Proteinfaltung durch den Metallthiolatcluster vorgegeben. Dieser befindet sich stets im Innern und wird von der jeweiligen Polypeptidkette umschlossen. Auf diese Weise werden die Metalle von den Lösungsmittelmolekülen des Wassers abgeschirmt und dadurch in ihrer Reaktivität kontrolliert.

Im Mittelteil windet sich die Polypeptidkette von Zn_yCu_4 - β MT ringförmig um den Metallthiolatcluster. Kurz bevor sich der Ring schließen würde, treten die beiden Enden der Kette auf entgegengesetzten Seiten aus der Ebene des Ringes hervor, überdecken diese auf beiden Seiten und begrenzen somit einen Innenraum nach oben und unten (Abb. 32).

Die Überlagerung der Strukturfamilie mit dem Rückgrat von Cd_3 - β MT verdeutlicht, dass die Zugabe von Cu(I) zu einer veränderten Struktur führt (Abb. 33). Die neue Struktur von Zn_yCu_4 - β MT erscheint kompakter als die der cadmiumbeladenen Form. Dies deutete sich bereits durch die größere Anzahl an NOEs im 1H - 1H -NOESY-Spektrum an. Für das gesamte Mausprotein Cd_7 -MT-1 wurden 381 NOEs dokumentiert, wohingegen alleine für die Strukturberechnungen von Zn_yCu_4 - β MT 380 bedeutungsvolle NOEs berücksichtigt wurden.

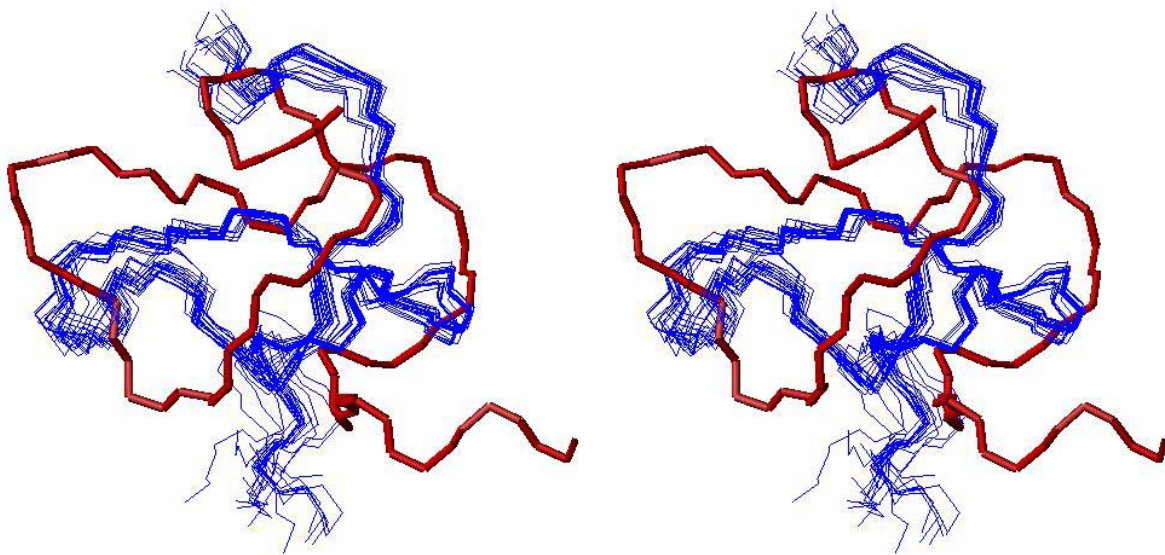


Abb. 33: Stereodarstellung der Strukturfamilie von Zn_yCu_4 - β MT (blau) überlagert von der bereits veröffentlichten Struktur von Cd_3 - β MT^[Zangger et al. 1999] (rot) im Bereich von P3-K30.

Ebenso wie in den bereits bekannten Strukturen von MT fehlen in dieser die Sekundärstrukturelemente β -Faltblatt und α -Helix. Die resultierende Struktur wird einzig durch die Metallkoordination über die Cysteinylschwefel vorgegeben. Da jedoch Abstandsdaten der Kupferionen zu den sie bindenden Cysteinylseitenketten fehlen, bleiben deren Positionen in der Struktur von Zn_yCu_4 - β MT unbekannt. Anhand der Lage der Schwefelatome wurden Überlegungen angestellt, ob sich einzelne Metallbindungsstellen auffinden ließen. Dabei ergaben sich folgende Schwierigkeiten:

1. Die genaue Metallstöchiometrie ist unbekannt. Höchstwahrscheinlich binden 4 Cu(I) an diese Spezies. Jedoch ist die Anzahl der noch gebundenen Zn(II) unbekannt. Analog zu den Überlegungen von Bofill et al. 2001 ist eine Zusammensetzung Zn_1Cu_4 - β MT wahrscheinlich, jedoch können andere Stöchiometrien wie Zn_2Cu_4 - β MT oder Cu_4 - β MT nicht vollständig ausgeschlossen werden.
2. Die Geometrie der Metallbindung ist nicht bekannt. Für Zn(II) wird analog zu den anderen bekannten MT-Strukturen eine tetraedrische Koordination als am wahrscheinlichsten eingestuft. Im Fall von Cu(I) stellt sich die Situation komplizierter dar. Wie die Kristallstruktur von Hefe-MT zeigt (Siehe oben), kommen innerhalb desselben Proteins sowohl lineare als auch trigonale Koordination vor.
3. Die Positionen der Schwefelatome konnten in der vorliegenden Struktur nicht exakt genug ermittelt werden, um eine eindeutige Zuordnung für eine Metallbindungsstelle zu ermöglichen. Geringe Abweichungen in den Schwefelpositionen eröffnen aufgrund der großen Anzahl möglicher Liganden auf sehr engem Raum bereits andere Bindungsmöglichkeiten.

Es wurde versucht, durch Einfügen von Metallatomen in die Berechnungen mögliche Bindungsstellen für Cu(I) oder Zn(II) zu finden. Dazu wurde wie in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben ein Metallatom über ein Verbindungsstück von 25 Pseudoresten an die Sequenz der β -Domäne angehängt. Je nachdem, ob eine tetraedrische oder eine trigonale Bindungsstelle gesucht werden sollte, wurden 4 bzw. 3 Schwefelatome ausgewählt und durch Abstandsinformationen entsprechend der Tabelle 2, Abschnitt 3.3.8.2 am Metallatom und untereinander fixiert. Auf diese Weise wurden je

48 potentielle tetraedrische und trigonale Metallbindungsstellen getestet. Die Zielfunktionen lagen im Fall der tetraedrischen Anordnungen der Schwefelatome in der Regel zwischen 0,4 und 0,8 Å², die mit trigonaler Geometrie zwischen 0,35 und 0,7 Å². Um die große Anzahl an Ergebnissen zu ordnen wurden drei Ausschlusskriterien festgelegt. Als erstes wurden Ergebnisse mit Zielfunktionen über 0,8 Å² im Fall der tetraedrischen Geometrie und 0,7 Å² bei trigonaler Koordination aussortiert. Als nächstes wurden Konformationen mit RMSD-Werten von mehr als 1 Å für die Atome des Polypeptidrückgrats eliminiert. Von den verbleibenden Strukturen wurden diejenigen, deren Metallbindungsstellen stark von der idealen Geometrie abwichen, eliminiert. Tabelle 14 listet das Ergebnis der Prozedur auf.

	Ausschlusskriterien			mögliche Kombinationen
	Zielfunktion	RMSD	Struktur	
Tetraedrisch	2	25	10	11
Trigonal	6	34	3	5

Tab. 14: Ausschluss ungeeigneter Metallbindungsstellen in Zn_yCu₄-βMT.

Nach Ausschluss für die Metallbindung ungeeigneter Kombinationen von Cysteinylschwefelatomen aus Zn_yCu₄-βMT blieben 11 Möglichkeiten für eine tetraedrische und 5 für eine trigonale Metallbindung. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sowohl die Ausbildung trigonaler als auch tetraedrischer Metallbindungsstellen innerhalb des ermittelten Proteingerüsts möglich ist. Einer Aufklärung der exakten Metallthiolatclusterstruktur stehen jedoch die drei oben genannten Punkte entgegen.

4.3 Additive Inkubation von Zn_xCu₃-αMT und Zn_yCu₄-βMT

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die beiden separierten Domänen während der Cu(I)-Titration definierte kupferhaltige Spezies bilden, die sich strukturell signifikant von den zinkhaltigen Strukturen unterscheiden, war es interessant zu erfahren, wie sich die beiden kupferhaltigen Spezies bei gemeinsamer Inkubation verhalten würden. Möglich wären neben der Koexistenz beider kupferhaltiger Formen in ihrer bekannten Struktur Austauschreaktionen zwischen den beiden Domänen oder eine Zusammenlagerung beider Domänen unter Bildung eines gemeinsamen

Kupferthiolatclusters. Die Frage wurde aufgeworfen, weil sich intaktes, rekombinant gewonnenes Maus-MT-1 bei Cu(I)-Zugabe anders verhielt als erwartet^[Luchinat 2004]. Die Zugabe von 4 Äquivalenten Cu(I) verursachte demnach das komplette Verschwinden aller Signale der β -Domäne. Die verbleibenden Signale konnten der α -Domäne zugeordnet werden. Für diese blieben alle Spinsysteme bestehen, jedoch waren nur wenige NOEs langer Reichweite zu finden. Aus diesen Daten konnte keine Struktur ermittelt werden. Die Spinsysteme unterschieden sich geringfügig von denen der Zn_4 - α -Domäne, jedoch weitaus stärker von denen des Zn_xCu_3 - α -MT. Die Zugabe von 7 Äquivalenten Cu(I) zu Zn_7 -MT-1 ergab ein nahezu identisches Spektrum wie nach der Zugabe von 4 Äquivalenten.

Für die NMR-Messung einer Mischung aus beiden kupferhaltigen Domänen wurde wie zuvor beschrieben eine Probe hergestellt, die sowohl Zn_xCu_3 - α -MT als auch Zn_yCu_4 - β -MT in einer Konzentration von je 1 mM enthält. Das resultierende 1H - 1H -NOESY-Spektrum zeigte auffallende Ähnlichkeit mit den Spektren der einzelnen kupferhaltigen Domänen. In Abbildung 34 A ist das Spektrum der Mischung in rot von dem der kupferhaltigen α -Domäne in türkis überlagert. Vor allem in den Randgebieten ließ sich sofort erkennen, dass die Spinsysteme mit leichten Verschiebungen erhalten geblieben waren, jedoch in etwas schlechterer Qualität. In B ist das Spektrum der Mischung (rot) mit dem von Zn_yCu_4 - β -MT (grün) überlagert. Auf den ersten Blick fällt auf, dass einige Spinsysteme verschwunden und nur wenige NOEs zu beobachten sind. Die Verschlechterung des auf die β -Domäne zurückgehenden Teils des Spektrums durch die Cu(I)-Zugabe war bei weitem nicht so gravierend wie im Fall des intakten MT-1^[Luchinat 2004].

Die Signale im 1H - 1H -NOESY-Spektrum der Mischung wurden zugeordnet, um mögliche Unterschiede genauer zu untersuchen. In den Tabellen 18 und 19 im Datenanhang sind die Werte der bei dieser Zuordnung ermittelten chemischen Verschiebungen neben denen der einzelnen Domänen aufgelistet. Bis auf wenige Ausnahmen liegen die Werte in der Mischung weniger als 0,1 ppm von denen der isolierten Domänen entfernt. Dies ist wiederum ein Hinweis dafür, dass die chemische Umgebung in den kupferhaltigen Strukturen durch das Vorhandensein der anderen Domäne nicht beeinflusst wird. Jedoch fehlen im Spektrum der Mischung NOEs, die in den Spektren der isolierten kupferhaltigen Domänen beobachtet worden waren, obwohl die Domänen in allen Fällen in einer Konzentration von 1 mM vorlagen. In stärkerem Maße trifft dies auf NOEs der β -

Domäne zu. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass es durch das gleichzeitige Vorhandensein beider Domänen zu Cu(I)-Austauschreaktionen kommt, welche durch Umfaltungsprozesse eine gewisse Flexibilität in den Domänen induzieren. Die Konzentration der ordentlich gefalteten kupferhaltigen Spezies wird dadurch verringert. Somit verschwinden die in den Spektren der isolierten Domänen bereits schwachen NOEs und diejenigen, die sich in den flexibleren Regionen der Domänen befinden. Die β -Domäne scheint durch das gleichzeitige Vorhandensein der α -Domäne stärker beeinträchtigt zu sein. Jedoch ist der Effekt im intakten Protein stärker als bei den gemeinsam inkubierten Domänen. Möglicherweise spielt dabei die *linker*-Region eine Rolle, die die beiden Domänen in ihrer Nachbarschaft zueinander fixiert.

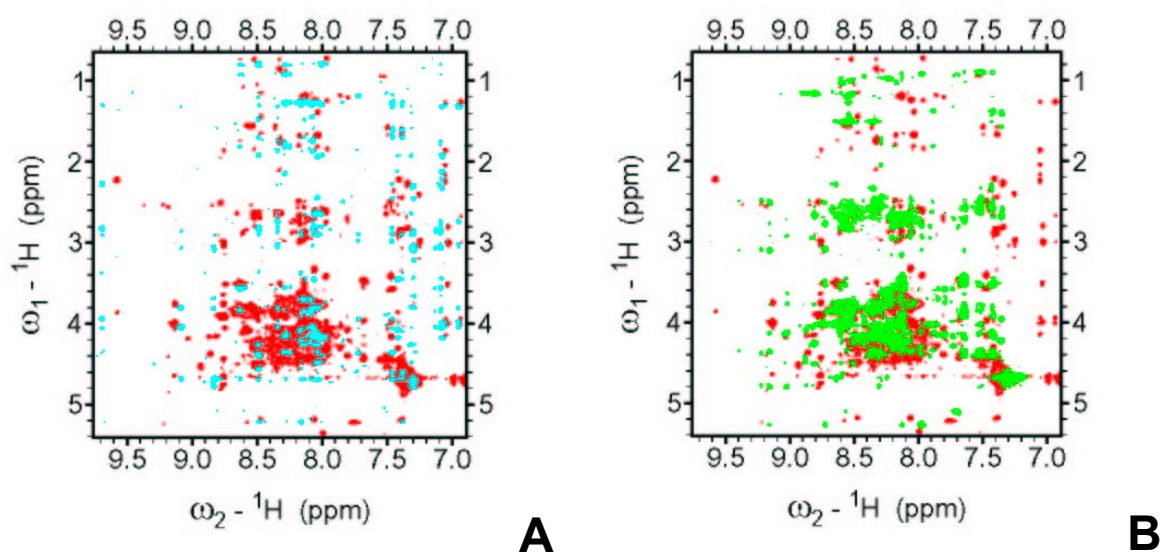


Abb. 34: (A) Überlagerung der ^1H - ^1H -NOESY-Spektren von Zn_xCu_3 - α -MT + $\text{Zn}_\gamma\text{Cu}_4$ - β MT (rot) und Zn_xCu_3 - α -MT (türkis). (B) Überlagerung der ^1H - ^1H -NOESY-Spektren von Zn_xCu_3 - α -MT + $\text{Zn}_\gamma\text{Cu}_4$ - β MT (rot) und $\text{Zn}_\gamma\text{Cu}_4$ - β -MT (grün). Die spektralen Parameter und die Probenpräparationsbedingungen sind der Legende zu Abb. Xx zu entnehmen.

5 Zur biologischen Bedeutung der Cu-Thioneine

Diese Arbeit beschäftigte sich mit den Raumstrukturen von Hefe- und Maus-Kupferthionein. Interessante Erkenntnisse wurden aus der Kristallstruktur einer verkürzten Form von Hefe-MT erhalten. Zum ersten Mal konnte die Struktur des Kupferthiolatzentrums aufgeklärt werden. Statt wie in jüngster Zeit angenommen sieben wurden acht Cu(I) angetroffen. Sechs davon waren trigonal, die zwei anderen linear von zehn Cysteinylothiolaten koordiniert.

In einem weiteren Projekt wurden die beiden komplett mit Zn(II) beladenen Domänen von Maus-MT-1 unter Sauerstoffausschluss mit Cu(I) titriert und die einzelnen Schritte mit ^1H - ^1H -NOESY-Spektren verfolgt. Hier war erwartet worden, dass beide Domänen bis zu sechs Cu(I) binden würden. Dabei zeigte sich jedoch, dass die α -Domäne nach Zugabe von drei Äquivalenten Cu(I) eine von der Ausgangssituation verschiedene Struktur besaß. Nach weiteren Zugaben verschwanden alle NOESY-Signale. Im Fall der β -Domäne wurde nach vier Äquivalenten Cu(I) eine neue Struktur entdeckt. Weitere Cu(I)-Zusätze führten wiederum zum Verschwinden der Signale. Die Strukturen von Zn_xCu_3 - α MT und Zn_yCu_4 - β MT konnten aus den Daten ihrer NMR-Spektren ermittelt werden, allerdings ohne Informationen über die Metallkoordination zu liefern.

Im Hinblick auf die physiologische Bedeutung liefern die gewonnenen Strukturinformationen neue Anhaltspunkte. Auf Basis der Kristallstruktur von Hefe-MT liegt die Vermutung nahe, dass dieses Protein als Abscheidungsort für hochreaktives Cu(I) dient. In fest gebundener Form werden die Metallionen im hydrophoben Innenraum des Proteins aufbewahrt, wo sie vor dem harten Sauerstoff der Wassermoleküle geschützt sind. Zudem werden sie durch die koordinative Bindung an Thiolate in ihrer monovalenten Form stabilisiert. Die zwei labilen, linear gebundenen Cu(I) lassen jedoch bei Bedarf auch die Abgabe an andere Cu(I) bindenden Proteine zu. Hefe-MT stellt also zumindest nicht nur ein Entsorgungssystem für Cu(I) dar, vielmehr kann es als Speicherort für momentan nicht benötigtes Cu(I) betrachtet werden. Wie zuvor bereits diskutiert besitzt intaktes Hefe-MT zwei weitere Cysteinyllreste nahe dem C-terminalen Ende seiner Sequenz, die nicht an der Ausbildung des Kupferthiolatclusters beteiligt sind. Diese könnten bei Cu(I)-Übertragungsreaktionen auf apo-Kupferchaperone oder andere apo-

Kupferproteine nach einem Mechanismus beteiligt sein, wie er bereits für die Cu(I)-Übertragung zwischen Kupferchaperonen und deren Zielproteine vorgeschlagen wurde (Abb. 1).

Die Strukturen der Cu(I)-haltigen Maus-MT-Domänen sind die ersten Strukturen von Vertebraten-Kupferthionein überhaupt. Obwohl die eigentliche Metallthiolatclusterstruktur mit Hilfe der NMR nicht aufgeklärt werden konnte, ist das Ergebnis äußerst aufschlussreich. Zum einen waren die Stöchiometrien von 3 Cu(I) pro α -Domäne und 4 Cu(I) pro β -Domäne nicht erwartet worden. Zum anderen zeigte sich, dass die Cu(I)-Bindung zu einer signifikanten Umfaltung der Polypeptidkette führte. Die Speicherfunktion, die für das Hefe-MT beschrieben wurde, trifft in Säugetieren am ehesten auf die Isoformen MT-1 und MT-2 zu. Daneben wird eine ganze Reihe weiterer gewebsspezifischer Isoformen exprimiert. Interessant unter diesen ist das MT-3, welches auch unter dem Namen *neuronal growth inhibitory factor* bekannt ist und vorwiegend im Gehirn exprimiert wird^[Roschitzki & Vasak 2002, 2003]. Dieses Protein ist im Verlaufe der Alzheimererkrankung herunterreguliert^[Uchida et al. 1991]. Aus biologischem Material isoliertes MT-3 besitzt in der α -Domäne einen homometallischen Zn₄-Thiolatcluster und in der β -Domäne einen homometallischen Cu₄-Thiolatcluster. Strukturinformationen über die Cu(I)-haltige β -Domäne dieses Proteins liegen bisher noch nicht vor. Ein vielversprechender Ansatz wäre in diesem Fall eine Strukturuntersuchung nach dem Vorbild der mit NMR verfolgten Cu(I)-Titration der Maus-Domänen, um über die Struktur die Rolle, die MT-3 im physiologischen Geschehen und bei der Alzheimererkrankung spielt, besser zu verstehen. Eine Cu(I)-Titration bietet sich gerade deswegen an, um die bisher gemachten Aussagen zur Stöchiometrie über die Ausbildung einer korrekten Proteinfaltung zu überprüfen. Erhöhte Konzentrationen von MT-1 und MT-2 mRNA wurden im zentralen Nervensystem von Scrapie infizierten Nagern nachgewiesen^[Hanlon et al. 2002]. Die Rolle, die MT bei der Entstehung von Prionen induzierten Erkrankungen spielt, ist bisher noch unklar. Die Erforschung der Ursache für diesen Effekt und die Frage welche Metalle dabei eine Rolle spielen, stellt ein weiteres interessantes Aufgabengebiet für die Zukunft dar.

6 Datenanhang

6.1 Hefe-MT und seine zwei Fragmente

6.1.1 Chemische Verschiebungen der Protonen in Peptid_{AS 5-40}

AS-Reste	H ^N	H ^α	H ^β	H ^γ	H ^δ	H ^ε
5 His	8,34	5,01	3,33		7,39	9,22
6 Glu	8,87	4,53	2,27	2,52; 2,60		
7 Cys	8,55	4,49	4,02; 3,31			
8 Gln	9,76	5,00	2,05; 2,58	2,44		7,63; 6,94
9 Cys	8,22	4,25	2,87; 4,57			
10 Gln	7,96	4,73	1,76; 2,64	2,46; 2,53		7,42; 6,99
11 Cys	8,23	4,41	3,02; 3,91			
12 Gly	8,87	3,85 ; 4,14				
13 Ser	10,32	4,22	4,05			
14 Cys	7,34	4,40	3,82; 3,30			
15 Lys	8,12	4,14	1,80; 1,84	1,49		3,08
16 Asn	7,60	4,86	2,87; 3,14		7,84; 7,07	
17 Asn		4,85	2,88; 3,97		7,48; 7,17	
18 Glu	9,40	4,23	2,26	2,57; 2,61		
19 Gln	8,44	4,30	2,32	2,59		7,61; 6,95
20 Cys	7,47	5,34	2,82; 3,39			
21 Gln	7,29	4,26	2,25; 2,35	2,64; 2,84		7,99; 6,77
22 Lys	8,56	4,52	1,81; 2,05	1,60; 1,55		3,04
23 Ser	7,32	4,41	3,82			
24 Cys	8,88	4,61	4,02; 2,70			
25 Ser	8,55	4,79	4,37; 3,93			
26 Cys	9,51	4,37	3,11; 3,22			
27 Pro		4,79	2,19; 2,48	2,07; 2,30	3,68; 3,95	
28 Thr	8,63	3,97	4,10	1,32		
29 Gly	9,11	3,81; 4,08				
30 Cys	7,58	4,49	3,05; 4,15			
31 Asn	8,49	5,06	2,95; 3,08		7,45; 6,93	
32 Ser	8,13	4,99	3,95; 4,04			
33 Asp	9,12	4,60	2,75; 2,93			
34 Asp	8,55	4,45	2,82; 2,86			
35 Lys	7,65	4,57	1,83; 2,18	1,46; 1,53	1,79	3,04
36 Cys	7,40	4,79	3,48; 3,33			
37 Pro		5,11	2,53; 2,06	2,33; 1,94	4,67; 4,49	
38 Cys	8,44	3,93	2,54; 2,91			
39 Gly	8,55	3,95; 4,14				
40 Asn	7,99	4,92	2,67; 2,96		7,59; 6,93	

Tab. 15: Protonenresonanzen vom Peptid_{AS 5-40}. Für die Aufnahmebedingungen der Spektren gilt das gleiche wie in der Legende zu Tab. 3 beschrieben. Luchinat et al. 2003.

6.1.2 Chemische Verschiebungen der Protonen in Peptid_{AS} -1-40

AS-Reste	H ^N	H ^α	H ^β	H ^γ	H ^δ	H ^ε
1	Gln		4,36	2,76; 2,37	1,98; 2,10	
2	Asn	8,48	4,82	2,82; 2,91		7,67; 7,02
3	Glu	8,57	4,32	2,11; 2,00	2,33	
4	Gly	8,40	3,67; 3,90			
5	His	8,34	5,05	3,37		7,39 8,83
6	Glu	8,83	4,31	2,12	2,36; 2,46	
7	Cys	8,51	4,32	3,98; 3,20		
8	Gln	9,51	4,91	1,93; 2,51	2,41	7,53; 6,87
9	Cys	8,19	4,18	2,78; 4,47		
10	Gln	7,88	4,65	1,66; 2,56	2,38; 2,45	7,36; 6,90
11	Cys	8,16	4,34	2,93; 3,82		
12	Gly	8,78	3,76; 4,04			
13	Ser	10,33	4,14	3,97		
14	Cys	7,26	4,31	3,74; 3,23		
15	Lys	8,01	4,08	1,68; 1,73	1,43	2,99
16	Asn	7,50	4,82	3,06; 2,77		7,76; 6,98
17	Asn	7,50	4,82	3,89; 2,82		7,40; 6,82
18	Glu	9,33	4,12	2,15	2,37; 2,44	
19	Gln	8,34	4,23	2,23	2,50	7,62; 6,91
20	Cys	7,40	5,24	2,92; 3,38		
21	Gln	7,19	4,16	2,15; 2,25	2,54; 2,76	7,91; 6,68
22	Lys	8,41	4,51	1,70; 1,97	1,51; 1,45	3,05
23	Ser	7,08	4,27	3,71		
24	Cys	8,61	4,61	4,05; 2,77		
25	Ser	8,35	4,76	4,26; 3,88		
26	Cys	9,42	4,29	3,04; 3,11		
27	Pro		4,69	2,09; 2,37	1,99; 2,20	3,58; 3,90
28	Thr	8,50	3,92	4,02	1,25	
29	Gly	9,00	4,01; 3,74			
30	Cys	7,54	4,40	2,98; 4,09		
31	Asn	8,40	4,97	2,87; 2,99		7,46; 6,85
32	Ser	8,05	4,93	3,87; 3,96		
33	Asp	9,03	4,51	2,64; 2,84		
34	Asp	8,45	4,36	2,71; 2,77		
35	Lys	7,54	4,50	1,75; 2,12	1,38; 1,46	1,69 3,04
36	Cys	7,30	4,71	3,40; 3,25		
37	Pro		5,02	2,45; 1,97	2,24; 1,85	4,61; 4,41
38	Cys	8,35	3,87	2,51; 2,83		
39	Gly	8,46	3,87; 4,02			
40	Asn	7,90	4,89	2,65; 3,00		7,59; 6,93

Tab. 16: Protonenresonanzen vom Peptid_{AS} -1-40. Für die Aufnahmebedingungen der Spektren gilt das gleiche wie in der Legende zu Tab. 3 beschrieben. Luchinat et al. 2003.

6.1.3 Chemische Verschiebungen der Protonen im intakten Hefe-MT

AS-Reste	H ^N	H ^α	H ^β	H ^γ	H ^δ	H ^ε
1	Gln		4,43	2,76; 2,38	1,99; 2,11	
2	Asn	8,66	4,82	2,78; 2,91		7,67; 6,98
3	Glu	8,70	4,31	2,10; 1,98	2,34	
4	Gly	8,36	3,69; 3,91			
5	His	8,34	5,04	3,37		7,39
6	Glu	8,81	4,33	2,11	2,37; 2,46	
7	Cys	8,54	4,30	3,97; 3,19		
8	Gln	9,51	4,89	1,96; 2,51	2,41	7,52; 6,85
9	Cys	8,18	4,16	2,77; 4,44		
10	Gln	7,86	4,64	1,65; 2,55	2,37; 2,44	7,33; 6,90
11	Cys	8,14	4,33	2,92; 3,81		
12	Gly	8,78	3,76; 4,03			
13	Ser	10,31	4,17	3,96		
14	Cys	7,22	4,32	3,71; 3,25		
15	Lys	8,02	4,05	1,65; 1,73	1,43	2,98
16	Asn	7,54	4,82	2,79; 3,06		7,74; 6,98
17	Asn	7,42	4,82	2,76; 3,82		7,55; 7,14
18	Glu	9,35	4,10	2,14	2,39; 2,44	
19	Gln	8,34	4,20	2,22	2,52	7,62; 6,91
20	Cys	7,40	5,22	2,70; 3,35		
21	Gln	7,19	4,18	2,15; 2,22	2,52; 2,72	7,87; 6,69
22	Lys	8,40	4,49	1,68; 1,96	1,49; 1,44	3,04
23	Ser	7,08	4,27	3,69		
24	Cys	8,59	4,56	4,03; 2,75		
25	Ser	8,37	4,76	4,20; 3,84		
26	Cys	9,39	4,28	3,03; 3,09		
27	Pro		4,68	2,09; 2,37	1,97; 2,20	3,57; 3,89
28	Thr	8,50	3,91	4,00	1,24	
29	Gly	9,00	3,72; 4,01			
30	Cys	7,53	4,39	2,97; 4,07		
31	Asn	8,38	4,96	2,86; 2,98		7,45; 6,84
32	Ser	8,04	4,92	3,86; 3,94		
33	Asp	9,04	4,49	2,63; 2,80		
34	Asp	8,46	4,34	2,70; 2,75		
35	Lys	7,48	4,49	1,73; 2,10	1,37; 1,44	1,69
36	Cys	7,27	4,69	3,39; 3,21		3,04
37	Pro		5,01	2,41; 1,96	2,24; 1,83	4,58; 4,39
38	Cys	8,33	3,86	2,51; 2,72		
39	Gly	8,40	3,93; 4,07			
40	Asn	8,00	4,87	2,67; 2,96		7,59; 6,93

Tab. 17: Protonenresonanzen vom Wildtyp-Hefe-MT. Für die Aufnahmebedingungen der Spektren gilt das gleiche wie in der Legende zu Tab. 3 beschrieben. Luchinat et al. 2003.

6.2 Chemisch synthetisierte Domänen von Maus-MT

6.2.1 Chemische Verschiebungen der Protonen von Maus- α -MT

α MT						
AS-Rest Nr.	AS-Rest	Proton	Cd ₄ - α MT	Zn ₄ - α MT	Zn _x Cu ₃ - α MT	Zn _x Cu ₃ - α MT gemischt mit Zn _y Cu ₄ - β MT
1	LYS	HN	8,37			
1	LYS	HA	4,47		4,26	4,20
1	LYS	HB2	1,87		2,21	2,14
1	LYS	HB3	1,71		2,21	1,84
1	LYS	HG2	1,67		1,67	1,60
1	LYS	HG3	1,46		1,67	1,60
1	LYS	QD			1,86	1,80
1	LYS	QE			3,16	3,11
2	SER	HN	8,82			
2	SER	HA	4,41		4,76	4,72
2	SER	HB2	4,04		4,07	4,03
2	SER	HB3	3,90		4,07	4,03
3	CYS	HN	8,18	8,12	8,32	8,33
3	CYS	HA	4,45	4,43	4,54	4,48
3	CYS	HB2	3,26	3,24	3,18	3,15
3	CYS	HB3	3,13	3,07	2,92	2,86
4	CYS	HN	8,36	8,24	7,60	7,58
4	CYS	HA	5,04	5,03	4,98	4,93
4	CYS	HB2	3,56	3,56	3,37	3,32
4	CYS	HB3	3,48	3,47	3,33	3,27
5	SER	HN	8,99	9,04	9,11	9,04
5	SER	HA	4,41	4,27	5,07	5,05
5	SER	HB2	3,99	3,94	4,09	4,04
5	SER	HB3	3,85	3,82	3,96	3,92
6	CYS	HN	8,51	8,47	7,58	7,54
6	CYS	HA	4,49	4,36	4,98	4,99
6	CYS	HB2	3,20	3,12	3,15	3,48
6	CYS	HB3	2,76	2,70	2,58	2,68
7	CYS	HN	7,21	7,07	7,58	7,62
7	CYS	HA	5,12	5,22	5,02	4,92
7	CYS	HB2	3,03	3,12	3,50	3,08
7	CYS	HB3	2,98	2,98	2,73	2,55
8	PRO	HA	4,96	4,74	4,64	4,58
8	PRO	HB2	2,30	2,30	2,42	2,38
8	PRO	HB3	2,02	2,09	2,19	2,15
8	PRO	HG2	2,05	1,80	2,07	2,00
8	PRO	HG3	1,84	1,80	2,03	2,00
8	PRO	HD2	3,80	3,85	3,94	3,88
8	PRO	HD3	3,76	3,83	3,71	3,66
9	VAL	HN	8,59	8,60	8,57	8,61
9	VAL	HA	3,82	3,85	3,83	3,77
9	VAL	HB	1,92	1,95	2,08	2,03
9	VAL	QG1	0,94	1,01	1,20	1,13
9	VAL	QG2	0,88	0,94	1,08	1,01
10	GLY	HN	8,91	8,88	8,91	8,91
10	GLY	HA1	4,08	4,13	4,11	4,04
10	GLY	HA2	3,66	3,67	3,84	3,81
11	CYS	HN	7,04	7,14	7,37	7,31

α MT						
AS-Rest Nr.	AS-Rest	Proton	Cd ₄ - α MT	Zn ₄ - α MT	Zn _x Cu ₃ - α MT	Zn _x Cu ₃ - α MT gemischt mit Zn _y Cu ₄ - β MT
11	CYS	HA	4,11	4,15	4,32	4,28
11	CYS	HB2	3,15	3,21	3,34	3,28
11	CYS	HB3	3,15	3,14	3,14	3,07
12	SER	HN	9,43	9,40	9,36	9,41
12	SER	HA	4,16	4,15	4,32	4,29
12	SER	HB2		4,01	4,08	4,04
12	SER	HB3		4,01	4,08	4,04
13	LYS	HN	8,33	8,21	8,35	8,31
13	LYS	HA	4,25	4,29	4,33	4,29
13	LYS	HB2	2,03	2,09	2,15	2,09
13	LYS	HB3	2,03	2,09	2,02	1,95
13	LYS	HG2	1,78	1,76	1,72	1,67
13	LYS	HG3	1,59	1,63	1,56	1,49
13	LYS	QD			1,87	1,83
13	LYS	QE			3,15	3,09
14	CYS	HN	7,66	8,24	8,63	8,45
14	CYS	HA	4,65	4,43	4,09	4,05
14	CYS	HB2	3,70	3,75	3,31	3,27
14	CYS	HB3	2,63	2,63	3,02	3,97
15	ALA	HN	7,11	7,28	7,24	7,22
15	ALA	HA	4,14	4,13	4,26	4,23
15	ALA	QB	1,48	1,51	1,60	1,54
16	GLN	HN	8,15	8,01	7,36	7,33
16	GLN	HA	4,53	4,51	4,46	4,43
16	GLN	HB2	2,41	2,42	2,40	2,32
16	GLN	HB3	2,35	2,42	2,20	2,14
16	GLN	HG2	1,96	2,02	2,61	2,52
16	GLN	HG3	1,96	2,02	2,50	2,44
16	GLN	HE21	7,72	7,52		
16	GLN	HE22	6,98	6,97		
17	GLY	HN	7,40	7,52	7,70	7,73
17	GLY	HA1	4,37	4,34	4,36	4,26
17	GLY	HA2	3,60	3,56	3,73	3,70
18	CYS	HN	8,85	8,91	8,35	8,25
18	CYS	HA	4,37	4,28	4,46	4,39
18	CYS	HB2	2,96	2,96	3,08	3,03
18	CYS	HB3	2,87	2,88	2,93	2,89
19	VAL	HN	7,40	7,67	8,29	8,24
19	VAL	HA	4,65	4,62	4,68	4,59
19	VAL	HB	2,52	2,49	2,19	2,12
19	VAL	QG1	1,03	1,01	1,10	1,00
19	VAL	QG2	0,86	0,97	1,06	1,00
20	CYS	HN	9,14	8,85	8,77	8,80
20	CYS	HA	4,52	4,73	4,84	4,77
20	CYS	HB2	3,12	3,17	3,11	3,07
20	CYS	HB3	2,60	2,40	3,11	2,98
21	LYS	HN	8,50	8,67	8,77	8,76
21	LYS	HA	4,27	4,37	4,54	4,51
21	LYS	HB2	1,80	1,85	1,98	1,92
21	LYS	HB3	1,66	1,79	1,75	1,74
21	LYS	HG2	1,46	1,49	1,48	1,44
21	LYS	HG3	1,38	1,41	1,45	1,39
21	LYS	QD			1,58	1,70
21	LYS	QE			3,01	2,96

α MT						
AS-Rest Nr.	AS-Rest	Proton	Cd ₄ - α MT	Zn ₄ - α MT	Zn _x Cu ₃ - α MT	Zn _x Cu ₃ - α MT gemischt mit Zn _y Cu ₄ - β MT
22	GLY	HN	8,62	8,66	8,42	8,41
22	GLY	HA1	4,04	4,05	4,13	4,07
22	GLY	HA2	3,83	3,86	3,98	3,96
23	ALA	HN	8,16	8,29	8,36	8,41
23	ALA	HA	4,39	4,43	4,45	4,35
23	ALA	QB	1,40	1,41	1,56	1,48
24	ALA	HN	7,77	8,29	8,56	
24	ALA	HA	4,33	4,51	4,42	
24	ALA	QB	1,39	1,48	1,55	
25	ASP	HN	8,40	8,44	8,32	8,41
25	ASP	HA	4,31	4,36	4,64	4,60
25	ASP	HB2	2,73	2,72	2,92	2,93
25	ASP	HB3	2,68	2,68	2,73	2,72
26	LYS	HN	7,76	7,57	7,74	7,78
26	LYS	HA	4,68	4,71	4,89	4,82
26	LYS	HB2	1,79	1,83	1,97	1,95
26	LYS	HB3	1,70	1,74	1,89	1,85
26	LYS	HG2	1,40	1,41	1,59	1,54
26	LYS	HG3	1,40	1,41	1,55	1,48
26	LYS	QD			1,77	1,73
26	LYS	QE			3,10	
27	CYS	HN	8,57	8,46	7,66	7,67
27	CYS	HA	5,20	5,30	5,50	5,47
27	CYS	HB2	3,62	3,61	3,65	3,62
27	CYS	HB3	3,52	3,56	3,18	3,09
28	THR	HN	8,96	8,88	8,45	8,34
28	THR	HA	4,54	4,53	4,76	4,68
28	THR	HB		4,45	4,34	4,26
28	THR	QG2	1,20	1,25	1,58	1,53
29	CYS	HN	8,39	8,44	9,98	9,86
29	CYS	HA	4,59	4,57	4,23	4,15
29	CYS	HB2	3,25	3,15	3,11	3,04
29	CYS	HB3	3,17	3,10	2,56	2,51
30	CYS	HN	7,84	8,09	7,74	7,70
30	CYS	HA	4,69	4,59	4,63	4,58
30	CYS	HB2	3,07	3,16	3,26	3,19
30	CYS	HB3	2,58	2,60	3,17	3,14
31	ALA	HN	7,18	7,19	8,00	8,14
31	ALA	HA	4,07	4,10	4,22	4,32
31	ALA	QB	1,35	1,39	1,46	1,47

Tab. 18: Protonenresonanzen der verschiedenen Spezies der α -Domäne von murinem MT-1. Die Werte für Cd₄- α MT wurden aus der BMRB-Datenbank (Zugangsnummer 4462) übernommen^[Zangger et al. 1999]. Die chemischen Verschiebungen wurden auf die temperaturkorrigierte chemische Verschiebung von Wasser bezogen. Diese beträgt bei 283 K 4,95 ppm.

6.2.2 Chemische Verschiebungen der Protonen von Maus- β -MT

β MT						
AS-Rest Nr.	AS-Rest	Proton	Cd ₃ - β MT	Zn ₃ - β MT	Zn _y Cu ₄ - β MT	Zn _x Cu ₃ - α MT gemischt mit Zn _y Cu ₄ - β MT
1	MET	HN	7,94			
1	MET	HA	4,61		4,12	4,16
1	MET	HB2	2,63		2,16	2,23
1	MET	HB3	2,5		2,16	2,23
1	MET	QG			2,61	2,65
1	MET	HE				
2	ASP	HN	7,7		8,91	9,05
2	ASP	HA	4,96		5,00	5,09
2	ASP	HB2	2,98		2,88	3,04
2	ASP	HB3	2,55		2,56	2,77
3	PRO	HA	4,39	4,38	4,46	4,51
3	PRO	HB2	2,31	2,29	2,31	2,36
3	PRO	HB3	2,31	2,29	2,31	2,36
3	PRO	HG2	2,04	2,02	2,06	2,12
3	PRO	HG3	1,96	1,94	2,00	2,07
3	PRO	HD2	3,87	3,87	3,88	3,88
3	PRO	HD3	3,87	3,87	3,88	3,88
4	ASN	HN	8,69	8,74	8,56	8,45
4	ASN	HA	4,76	4,74	4,64	4,69
4	ASN	HB2	2,83	2,91	2,81	2,83
4	ASN	HB3	2,83	2,80	2,72	2,76
4	ASN	HD21	7,96	8,01	7,79	7,74
4	ASN	HD22	7,08	7,12	7,01	7,06
5	CYS	HN	7,81	7,66	8,33	8,41
5	CYS	HA	4,98	5,42	4,40	4,46
5	CYS	HB2	3,2	3,36	3,20	3,22
5	CYS	HB3	2,91	2,80	3,00	3,01
6	SER	HN	8,47	8,95	9,29	9,30
6	SER	HA	4,74	4,72	5,07	5,11
6	SER	HB2	3,92	4,18	4,04	4,07
6	SER	HB3	3,92	3,90	3,91	3,96
7	CYS	HN		9,09	9,43	9,45
7	CYS	HA	4,37	4,25	4,64	4,68
7	CYS	HB2	3,26	3,02	3,37	3,41
7	CYS	HB3	3,26	2,96	2,78	2,83
8	SER	HN	8,79	8,68	8,58	8,58
8	SER	HA	4,65		4,41	4,44
8	SER	HB2	4,15	4,12	4,11	4,14
8	SER	HB3	3,91	3,94	4,06	4,11
9	THR	HN	8,26	8,47	7,79	7,79
9	THR	HA	4,58	4,39	4,68	4,72
9	THR	HB	4,27	4,24		
9	THR	QG2	1,38	1,23	1,17	1,21
10	GLY	HN	8,07	8,10	7,69	7,75
10	GLY	HA1	4,22	4,40	4,43	4,43
10	GLY	HA2	4,04	3,89	3,80	3,84
11	GLY	HN	8,19	8,36	7,91	7,95
11	GLY	HA1	4,25	4,46	4,19	4,24
11	GLY	HA2	4,03	3,92	3,72	3,75
12	SER	HN	8,01	8,28	8,40	8,41
12	SER	HA	4,55	4,56	4,29	4,37

β MT						
AS-Rest Nr.	AS-Rest	Proton	Cd ₃ - β MT	Zn ₃ - β MT	Zn _y Cu ₄ - β MT	Zn _x Cu ₃ - α MT gemischt mit Zn _y Cu ₄ - β MT
12	SER	HB2	3,8	3,87	3,81	3,85
12	SER	HB3	3,8	3,87	3,76	3,79
13	CYS	HN		8,38	9,00	9,01
13	CYS	HA	4,25	4,57	5,54	5,62
13	CYS	HB2	3,26	3,14	3,37	3,40
13	CYS	HB3	3,26	3,07	3,04	3,09
14	THR	HN	8,24	8,51	8,25	8,27
14	THR	HA	4,84	4,64	4,56	4,61
14	THR	HB				
14	THR	QG2	1,31	1,20	1,19	1,18
15	CYS	HN	8,61		8,40	8,38
15	CYS	HA	4,24		4,27	4,32
15	CYS	HB2	3,2		3,43	3,49
15	CYS	HB3	2,94		2,96	2,99
16	THR	HN	8,21	8,36	8,88	8,86
16	THR	HA	4,33	4,31	4,43	4,49
16	THR	HB		4,15		
16	THR	QG2	1,4	1,26	1,24	1,28
17	SER	HN	8,46	8,44	8,51	8,56
17	SER	HA	4,45	4,46	4,41	4,47
17	SER	HB2	3,96	4,14	4,02	4,03
17	SER	HB3	3,89	4,14	3,95	3,97
18	SER	HN	7,96	7,96	8,06	8,06
18	SER	HA	4,43	4,39	4,43	4,46
18	SER	HB2	3,8	4,15	3,85	3,88
18	SER	HB3	3,8	4,15	3,85	3,88
19	CYS	HN	8,43		8,48	8,45
19	CYS	HA	4,44		4,53	4,64
19	CYS	HB2	3,1	3,14	3,22	3,22
19	CYS	HB3	2,92	2,88	2,93	2,95
20	ALA	HN	9,09	8,98	9,08	9,13
20	ALA	HA	4,68	4,65	4,79	4,82
20	ALA	QB	1,42	1,43	1,43	1,47
21	CYS	HN	8,78	8,76	8,79	8,79
21	CYS	HA	4,12	4,05	4,05	4,09
21	CYS	HB2	3,38	3,43	2,91	2,95
21	CYS	HB3	2,94	3,04	2,84	2,89
22	LYS	HN	8,77	8,68	8,81	8,81
22	LYS	HA	4,23	4,10	4,14	4,16
22	LYS	HB2	1,8	1,87	1,78	1,82
22	LYS	HB3	1,68	1,80	1,78	1,82
22	LYS	HG2	1,51	1,54	1,53	1,55
22	LYS	HG3	1,42	1,46	1,46	1,55
22	LYS	QD		1,70	1,70	1,75
22	LYS	QE		2,98	3,02	3,08
23	ASN	HN	8,9	9,05	8,62	8,62
23	ASN	HA	4,66	4,67	4,62	4,66
23	ASN	HB2	2,75	2,65	2,86	2,90
23	ASN	HB3	2,59	2,52	2,61	2,66
23	ASN	HD21	7,6	7,47	7,70	7,72
23	ASN	HD22	6,92	6,86	6,95	6,98
24	CYS	HN	8,5	8,95	7,79	7,77
24	CYS	HA	4,48	4,25	4,29	4,32
24	CYS	HB2	2,99	3,12	2,89	2,92

β MT						
AS-Rest Nr.	AS-Rest	Proton	Cd ₃ - β MT	Zn ₃ - β MT	Zn _y Cu ₄ - β MT	Zn _x Cu ₃ - α MT gemischt mit Zn _y Cu ₄ - β MT
24	CYS	HB3	2,99	2,73	2,78	2,82
25	LYS	HN	9,21	9,46	8,16	8,11
25	LYS	HA	4,42	4,33	4,61	4,66
25	LYS	HB2	4,04	1,95	2,09	2,18
25	LYS	HB3	3,9	1,95	2,09	1,74
25	LYS	HG2		1,54	1,52	1,52
25	LYS	HG3		1,54	1,44	1,47
25	LYS	QD		1,69	1,65	1,67
25	LYS	QE		3,02		
26	CYS	HN	8,66	8,59	8,47	8,50
26	CYS	HA	4,22	4,19	4,32	4,37
26	CYS	HB2	3,24	3,14	3,08	3,14
26	CYS	HB3	2,94	3,08	2,98	3,02
27	THR	HN	8,83	8,66	8,87	8,87
27	THR	HA	4,17	4,30	4,34	4,37
27	THR	HB	4,41		4,24	4,26
27	THR	QG2	1,29	1,23	1,30	1,35
28	SER	HN	8,21	8,08	8,45	
28	SER	HA	4,41	4,25	4,51	
28	SER	HB2	4,07	3,95	3,85	
28	SER	HB3	4,01	3,88	3,80	
29	CYS	HN	7,33	7,56	8,37	8,49
29	CYS	HA	4,43	4,25	4,51	4,53
29	CYS	HB2	3,1	3,01	2,96	2,99
29	CYS	HB3	2,94	2,88	2,96	2,99
30	LYS	HN	7,78	7,19	7,63	7,61
30	LYS	HA	4,33	4,17	4,23	4,40
30	LYS	HB2	1,77	1,88	1,84	1,93
30	LYS	HB3	1,65	1,77	1,84	1,86
30	LYS	HG2	1,4	1,49	1,43	1,53
30	LYS	HG3	1,4	1,39	1,37	1,47
30	LYS	QD		1,69	1,68	1,74
30	LYS	QE			3,00	3,06

Tab. 19: Protonenresonanzen der verschiedenen Spezies der β -Domäne von murinem MT-1. Die Werte für Cd₃- β MT wurden aus der BMRB-Datenbank (Zugangsnummer 4462) übernommen^[Zangger et al. 1999]. Die chemischen Verschiebungen wurden auf die temperaturkorrigierte chemische Verschiebung von Wasser bezogen. Diese beträgt bei 283 K 4,95 ppm.

7 Literaturverzeichnis

Arseniev, A., Schultze, P., Worgötter, E., Braun, W., Wagner, G., Vasak, M., Kägi, J.H., & Wüthrich, K. (1988) Three-dimensional structure of rabbit liver Cd₇-metallothionein-2a in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* 201, 637-657.

Assfalg, M., Bertini, I., Turano, P., Bruschi, M., Durand, M.C., Giudici-Orticoni, M.T., & Dolla, A. (2002) A quick solution structure determination of the fully oxidized double mutant K9-10A cytochrome c7 from *Desulfuromonas acetoxidans* and mechanistic implications. *J. Biomol. NMR* 22, 107-122.

Bertini, I., Hartmann, H.J., Klein, T., Liu, G., Luchinat, C., & Weser, U. (2000) High resolution solution structure of the protein part of Cu₇ metallothionein. *Eur. J. Biochem.* 267, 1008-1018.

Bofill, R., Palacios, O., Capdevila, M., Cols, N., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S., & Gonzalez-Duarte, P. (1999) A new insight into the Ag⁺ and Cu⁺ binding sites in the metallothionein beta domain. *J. Inorg. Biochem.* 73, 57-64.

Bofill, R., Capdevila, M., Cols, N., Atrian, S., & Gonzalez-Duarte, P. (2001) Zinc(II) is required for the in vivo and in vitro folding of mouse copper metallothionein in two domains. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6, 405-417.

Bogumil, R., Faller, P., Pountney, D.L., & Vasak, M. (1996) Evidence for Cu(I) clusters and Zn(II) clusters in neuronal growth-inhibitory factor isolated from bovine brain. *Eur. J. Biochem.* 238, 698-705.

Bogumil, R., Faller, P., Binz, P.A., Vasak, M., Charnock, J.M., & Garner, C.D. (1998) Structural characterization of Cu(I) and Zn(II) sites in neuronal-growth-inhibitory factor by extended X-ray absorption fine structure (EXAFS). *Eur. J. Biochem.* 255, 172-177.

Bordas, J., Koch, M.H., Hartmann, H.J., & Weser, U. (1982) Tetrahedral copper-sulphur coordination in yeast Cu-thionein. An EXAFS study. *FEBS Lett.* 140, 19-21.

Bordas, J., Koch, M.H.J., Hartmann, H.J., & Weser, U. (1983) The Cu-thiolate chromophore of yeast Cu-thionein. *Inorg. Chim. Acta* 78, 113-120.

Braun, W., Vasak, M., Robbins, A.H., Stout, C.D., Wagner, G., Kägi, J.H., & Wüthrich, K. (1992) Comparison of the NMR solution structure and the X-ray crystal structure of rat metallothionein-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10124-10128.

Byrd, J., Berger, R.M., McMillin, D.R., Wright, C.F., Hamer, D., & Winge, D.R. (1988) Characterization of the copper-thiolate cluster in yeast metallothionein and two truncated mutants. *J. Biol. Chem.* 263, 6688-6694.

Collaborative Computational Project No.4. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 50, 760-763.

Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881-10890.

Culotta, V.C., Klomp, L.W., Strain, J., Casareno, R.L., Krems, B., & Gitlin, J.D. (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272, 23469-23472.

Culotta, V.C., Lin, S.J., Schmidt, P., Klomp, L.W., Casareno, R.L., & Gitlin, J. (1999) Intracellular pathways of copper trafficking in yeast and humans. *Adv. Exp. Med. Biol.* 448, 247-254.

Dameron, C.T., & Harrison, M.D. (1998) Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1091S-1097S.

Desideri, A., Hartmann, H.J., Morante, S., & Weser, U. (1990) An EXAFS study of the copper accumulated by yeast cells. *Biol. Met.* 3, 45-47.

Ding, X.Q., Bill, E., Trautwein, A.X., Hartmann, H.J., & Weser, U. (1994) Mossbauer studies on iron(II)-substituted yeast metallothionein. *Eur. J. Biochem.* 223, 841-845.

Dolderer, B. (2002) Elektronenabsorption, Circular dichroismus, Lumineszenz und ¹H-NMR von Hefe-Cu(I)-Metallothionein-Fragmenten. Diplomarbeit am Physiologisch-chemischen Institut, Universität Tübingen.

Eccles, C., Güntert, P., Billeter, M., & Wüthrich, K. (1991) Efficient analysis of protein 2D NMR spectra using the software package EASY. *J. Biomol. NMR* 1, 111-130.

Echner, H., & Voelter, W. (1988) A new synthesis of thymosin α 1. *Liebigs Ann. Chem.* 1095-1097.

Evans, P.R. (1993) Data collection & processing. In *Proceedings of CCP4 study weekend* 114-122.

Felix, K., Hartmann, H.J., & Weser, U. (1989) Cu(I)-thionein release from copper-loaded yeast cells. *Biol. Met.* 2, 50-54.

Felix, K., Nagel, W., Hartmann, H.J., & Weser, U. (1990) Copper transfer through the intestinal wall. Serosal release of metallothionein. *Biol. Met.* 3, 141-145.

Finney, L.A., & O'Halloran, T.V. (2003) Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 300, 931-936.

Fowler, B.A., Hildebrand, C.E., Kojima, Y., & Webb, M. (1987) Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl.* 52, 19-22.

Freedman, J.H., Powers, L., & Peisach, J. (1986) Structure of the copper cluster in canine hepatic metallothionein using X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry* 25, 2342-2349.

Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., & Peisach, J. (1989) The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598-5605.

George, G.N., Winge, D.R., Stout, C.D., & Cramer, S.P. (1986) X-ray absorption studies of the copper beta domain of rat liver metallothionein. *J. Inorg. Biochem.* 27, 213-220.

George, G.N., Byrd, J., & Winge, D.R. (1988) X-ray absorption studies of yeast copper metallothionein. *J. Biol. Chem.* 263, 8199-8203.

Glerum, D.M., Shtanko, A., & Tzagoloff, A. (1996) Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 271, 14504-14509.

Goddard, T.D., & Kneller, D.G. (2004) *Sparky 3*. University of California, San Francisco.

Green, A.R., & Stillman, M.J. (1996) Mobility of copper in binding sites in rabbit liver metallothionein 2. *Inorg. Chem.* 35, 2799-2807.

Grill, E., Winnacker, E.L., & Zenk, M.H. (1985) Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674-676.

Güntert, P., Braun, W., & Wüthrich, K. (1991) Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J. Mol. Biol.* 217, 517-530.

Güntert, P., Mumenthaler, C., & Wüthrich, K. (1997) Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* 273, 283-298.

Hanlon, J., Monks, E., Hughes, C., Weavers, E., & Rogers, M. (2002) Metallothionein in bovine spongiform encephalopathy. *J. Comp Pathol.* 127, 280-289.

Hartmann, H.J., Morpurgo, L., Desideri, A., Rotilio, G., & Weser, U. (1983) Reconstitution of stellacyanin as a case of direct Cu(I) transfer between yeast copper thionein and 'blue' copper apoprotein. *FEBS Lett.* 152, 94-96.

Hartmann, H.J., Li, Y.J., & Weser, U. (1992) Analogous copper(I) coordination in metallothionein from yeast and the separate domains of the mammalian protein. *Biomaterials* 5, 187-191.

Hemmerich, P. & Sigwart, C. (1963) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_2^+$, a method for the study of the homogeneous reactions of univalent copper in aqueous solution. *Experientia* 19, 488-489.

Huang, X., & Miller, W. (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* 12, 337-357.

Huffman, D.L., & O'Halloran, T.V. (2001) Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 677-701.

Jackson, P.J., Unkefer, C.J., Doolen, J.A., Watt, K., & Robinson, N.J. (1987) Poly(γ -glutamylcysteinyl)glycine: its role in cadmium resistance in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6619-6623.

Kägi, J.H., & Vallee, B.L. (1960) Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235, 3460-3465.

Kägi, J.H., & Vallee, B.L. (1961) Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 236, 2435-2442.

Kägi, J.H., Kojima, Y., Kissling, M.M., & Lerch, K. (1979) Metallothionein: an exceptional metal thiolate protein. *Ciba Found. Symp.* 223-237.

Kägi, J.H., & Kojima, Y. (1987) Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Suppl.* 52, 25-61.

Klomp, L.W., Lin, S.J., Yuan, D.S., Klausner, R.D., Culotta, V.C., & Gitlin, J.D. (1997) Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J. Biol. Chem.* 272, 9221-9226.

Koradi, R., Billeter, M., & Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* 14, 51-32.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., & Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.

Lerch, K. (1980) Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. *Nature* 284, 368-370.

Leslie, A.G.W. (1991) Molecular data processing. In *Crystallographic Computing V*, eds. Moras, D., Podjarny, A.D., & Thierry, J.P. (Oxford Univ. Press, Oxford) 50-61.

Li, Y.J., Zhang, L.S., Bayer, E., Oelkrug, D., & Weser, U. (1990) Comparative luminescence of rat liver Cu-thionein and its chemically synthesized alpha-domain. *Z. Naturforsch. [C.]* 45, 1193-1196.

Li, Y.J., & Weser, U. (1992) Circular dichroism, luminescence, and electronic absorption of copper binding sites in metallothionein and its chemically synthesized α and β domains. *Inorg. Chem.* 31, 5526-5533.

Luchinat, C., Dolderer, B., Del Bianco, C., Echner, H., Hartmann, H.J., Voelter, W., & Weser, U. (2003) The Cu(I)₇ cluster in yeast copper thionein survives major shortening of the polypeptide backbone as deduced from electronic absorption, circular dichroism, luminescence and ¹H NMR. *J. Biol. Inorg. Chem.* 8, 353-359.

Luchinat, C. (2004) Persönliche Mitteilung.

Margoshes, M., & Vallee, B.L. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813-4814.

McRee, D.E. (1999) XtalView/Xfit--A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J. Struct. Biol.* 125, 156-165.

Messerle, B.A., Schaffer, A., Vasak, M., Kägi, J.H., & Wüthrich, K. (1990) Three-dimensional structure of human ¹¹³Cd₇-metallothionein-2 in solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 214, 765-779.

Messerle, B.A., Schaffer, A., Vasak, M., Kägi, J.H., & Wüthrich, K. (1992) Comparison of the solution conformations of human Zn₇-metallothionein-2 and Cd₇-metallothionein-2 using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 225, 433-443.

Morpurgo, L., Hartmann, H.J., Desideri, A., Weser, U., & Rotilio, G. (1983) Yeast copper-thionein can reconstitute the Japanese-lacquer-tree (*Rhus vernicifera*) laccase from the Type 2-copper-depleted enzyme via a direct copper(I)-transfer mechanism. *Biochem. J.* 211, 515-517.

Murshudov, G.N., Vagin, A.A., & Dodson, E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 53, 240-255.

Narula, S.S., Mehra, R.K., Winge, D.R., & Armitage, I.M. (1991) Establishment of the metal-to-cysteine connectivities in silver-substituted yeast metallothionein. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 9354-9358.

Narula, S.S., Winge, D.R., & Armitage, I.M. (1993) Copper- and silver-substituted yeast metallothioneins: sequential ¹H NMR assignments reflecting conformational heterogeneity at the C terminus. *Biochemistry* 32, 6773-6787.

Nemer, M., Wilkinson, D.G., Travaglini, E.C., Sternberg, E.J., & Butt, T.R. (1985) Sea urchin metallothionein sequence: key to an evolutionary diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4992-4994.

Nielson, K.B., & Winge, D.R. (1985) Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *J. Biol. Chem.* 260, 8698-8701.

O'Halloran, T.V., & Culotta, V.C. (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* 275, 25057-25060.

Otvos, J.D., & Armitage, I.M. (1980) Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 7094-7098.

Palmiter, R.D. (1998) The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8428-8430.

Perrakis, A., Morris, R., & Lamzin, V.S. (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* 6, 458-463.

Peterson, C.W., Narula, S.S., & Armitage, I.M. (1996) 3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins. *FEBS Lett.* 379, 85-93.

Poulos, T.L. (1999) Helping copper find a home. *Nat. Struct. Biol.* 6, 709-711.

Prinz, R., & Weser, U. (1975) Cuprodoxin. *FEBS Lett.* 54, 224-229.

Prinz, R., & Weser, U. (1975) A naturally occurring Cu-thionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 356, 767-776.

Pufahl, R.A., Singer, C.P., Peariso, K.L., Lin, S.J., Schmidt, P.J., Fahrni, C.J., Culotta, V.C., Penner-Hahn, J.E., & O'Halloran, T.V. (1997) Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* 278, 853-856.

Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., & O'Halloran, T.V. (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284, 805-808.

Robbins, A.H., McRee, D.E., Williamson, M., Collett, S.A., Xuong, N.H., Furey, W.F., Wang, B.C., & Stout, C.D. (1991) Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 221, 1269-1293.

Romero-Isart, N., & Vasak, M. (2002) Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* 88, 388-396.

Roschitzki, B., & Vasak, M. (2002) A distinct Cu(4)-thiolate cluster of human metallothionein-3 is located in the N-terminal domain. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7, 611-616.

Roschitzki, B., & Vasak, M. (2003) Redox labile site in a Zn₄ cluster of Cu₄Zn₄-metallothionein-3. *Biochemistry* 42, 9822-9828.

Rosenzweig, A.C. (2001) Copper delivery by metallochaperone proteins. *Acc. Chem. Res.* 34, 119-128.

Sarkar, B. (1999) Treatment of Wilson and Menkes diseases. *Chem. Rev.* 99, 2535-2544.

Schultze, P., Worgötter, E., Braun, W., Wagner, G., Vasak, M., Kägi, J.H., & Wüthrich, K. (1988) Conformation of Cd₇-metallothionein-2 from rat liver in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 203, 251-268.

Smith, G., & Wilkins, D. (1953) New colorimetric reagent specific for copper. *Anal. Chem.* 25, 510-511.

Terwilliger, T.C., & Berendzen, J. (1999) Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 55 (Pt 4), 849-861.

Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y., & Tomonaga, M. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7, 337-347.

Vasak, M., & Hasler, D.W. (2000) Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 177-183.

Weser, U., Hartmann, H.J., Fretzdorff, A., & Strobel, G.J. (1977) Homologous copper(I)-(thiolate)₂-chromophores in yeast copper thionein. *Biochim. Biophys. Acta* 493, 465-477.

Weser, U., Mutter, W., & Hartmann, H.J. (1986) The role of Cu(I)-thiolate clusters during the proteolysis of Cu-thionein. *FEBS Lett.* 197, 258-262.

Weser, U., & Hartmann, H.J. (1988) Differently bound copper(I) in yeast Cu₈-thionein. *Biochim. Biophys. Acta* 953, 1-5.

Weser, U., & Hartmann, H.J. (1991) Purification of yeast copper-metallothionein. *Methods Enzymol.* 205, 274-278.

Winge, D.R., & Miklossy, K.A. (1982) Domain nature of metallothionein. *J. Biol. Chem.* 257, 3471-3476.

Winge, D.R., Nielson, K.B., Gray, W.R., & Hamer, D.H. (1985) Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* 260, 14464-14470.

Zangger, K., Oz, G., Otvos, J.D., & Armitage, I.M. (1999) Three-dimensional solution structure of mouse Cd₇-metallothionein-1 by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci.* 8, 2630-2638.

8 Publikationen und Tagungsbeiträge

Zur Wahrung der Priorität gegenüber konkurrierenden Arbeitsgruppen mussten Teile dieser Arbeit vorab veröffentlicht werden.

Originalarbeiten:

Luchinat, C., Dolderer, B., Del Bianco, C., Echner, H., Hartmann, H.-J., Voelter, W. & Weser, U. The Cu(I)₇ cluster in yeast copper thionein survives major shortening of the polypeptide backbone as deduced from electronic absorption, circular dichroism, luminescence and ¹H NMR. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 353-359 (2003).

Calderone, V., Dolderer, B., Hartmann, H.-J., Echner, H., Luchinat, C., Del Bianco, C., Mangani, S. & Weser, U. The Crystal Structure of Yeast Cu-Thionein. The Solution of a long lasting Enigma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Im Druck.

Tagungsbeiträge:

Poster: Luchinat, C., Dolderer, B., Bertini, I., Hartmann, H.-J., Echner, H., Voelter, W. & Weser, U. The oligomeric Cu(I)₇-thiolate cluster in intact yeast Cu-metallothionein survives significant shortening of the polypeptide chain.

präsentiert: 5th User Meeting of the European Large-Scale Facilities for NMR (8. - 11. November 2001) in Frankfurt, Deutschland
und
Gordon Conference "Metals in Biology" (20. - 25. Januar 2002) in Ventura, USA

- Poster: Luchinat, C., Dolderer, B., Del Bianco, C., Bertini, I., Hartmann, H.-J., Echner, H., Voelter, W. & Weser, U. Electronic absorption, circular dichroism, luminescence and $^1\text{H-NMR}$ of Cu(I)_7 -thiolate clusters in different polypeptide matrices
- präsentiert: 6th User Meeting of the European Large-Scale Facilities for NMR (October 17. – 20. 2002) in Montecatini, Italien
und
Gordon Conference “Metals in Biology” (February 2. – 7. 2003) in Ventura, USA
-
- Poster: Dolderer, B., Luchinat, C., Del Bianco, C., Echner, H., Hartmann, H.-J. & Weser, U. $^1\text{H-NMR}$ of separate Cu(I) titrated α - and β -murine metallothionein-1 domains allows the assignment of distinct polypeptide folding
- präsentiert: 7th User Meeting of the European Large-Scale Facilities for NMR (21. – 22. November 2003) in Oosterbeek, Niederlande
und
Gordon Conference “Metals in Biology” (18. –23. Januar 2004) in Ventura, USA

Meine akademischen Lehrer waren:

In Tübingen:

Prof. Dr. K. Albert (Organische Chemie); Prof. Dr. H.-A. Bisswanger (Biochemie); Prof. Dr. K.W. Bock (Toxikologie); Prof. Dr. P. Bohley (Biochemie); Prof. Dr. M. Duszenko (Biochemie); Prof. Dr. K. Eisele (Biochemie); Dr. K.-U. Fröhlich (Biochemie); Dr. H. Günzl (Zoologie); Priv. Doz. Dr. P. Grabmayr (Physik); Prof. Dr. H.-P. Hagenmaier (Organische Chemie); Prof. Dr. B. Hamprecht (Biochemie); Prof. Dr. Dr. h.c. M. Hanack (Organische Chemie); Prof. Dr. G. Jung (Organische Chemie); Prof. Dr. D. Krug (Anorganische Chemie); Prof. Dr. E. Lindner (Anorganische Chemie); Prof. Dr. D. Mecke (Biochemie); Prof. Dr. W. Nakel (Physik); Prof. Dr. H. Ninnemann (Pflanzenbiochemie); Prof. Dr. H. Oberhammer (Physikalische Chemie); Prof. Dr. D. Oelkrug (Physikalische Chemie); Prof. Dr. W. Pfeiffer (Zoologie); Priv. Doz. Dr. H. Pommer (Mathematik); Prof. Dr. K. Poralla (Mikrobiologie); Prof. Dr. H. Probst (Biochemie); Akad. Dir. Dr. H.-J. Reinecke (Strahlenschutz); Prof. Dr. K. Reutter (Anatomie); Prof. Dr. Dr. h.c. J. Strähle (Anorganische Chemie); Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Voelter (Physikalische Biochemie); Prof. Dr. U. Weser (Anorganische Biochemie); Prof. Dr. W. Wohlleben (Mikrobiologie).

In Salamanca:

Prof. Dr. J. Martín Barrientos (Biochemie); Prof. Dr. J.M. Medina Jiménez (Biochemie); Prof. Dr. M.I. Muñoz-Barroso (Biochemie)

In Florenz:

Prof. Dr. C. Luchinat (Strukturbiochemie); Prof. Dr. I. Bertini (Strukturbiochemie)

Lebenslauf

Name	Benedikt Dolderer
Geburtsdatum	02. Juni 1976
Geburtsort	Schwäbisch Gmünd
Schulbildung	
09/1982 – 07/1986	Uhlandschule in Schwäbisch Gmünd
09/1986 – 06/1995	Scheffold-Gymnasium in Schwäbisch Gmünd
07/1995 – 07/1996	Zivildienst
Studium	
WS 1996/97	Immatrikulation für das Fach Biochemie an der Eberhard-Karls- Universität (Tübingen)
SS 1997	Diplom Vorprüfung (1. Teil)
02/1999 – 06/1999	Auslandsemester an der Universität Salamanca (Spanien)
SS 1999	Diplom Vorprüfung (2. Teil)
WS 2000/01	Diplom Hauptprüfung
05/2001 – 02/2002	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel „Elektronenabsorption, Circular dichroismus, Lumineszenz und ¹ H-NMR von Hefe-Cu(I)-Metallothionein-Fragmenten“ bei Herrn Prof. Dr. U. Weser, Anorganische Biochemie, Physiologisch-chemisches Institut, Universität Tübingen.
10/2001 – 11/2001	Forschungsaufenthalt am Zentrum für magnetische Resonanz der Universität Florenz (Italien)
03/2002 – 11/2004	Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Titel „Zur molekularen Architektur von Cu(I)-Thiolatzentren in Cu-Thioneinen“ bei Herrn Prof. Dr. U. Weser, Anorganische Biochemie, Physiologisch-chemisches Institut, Universität Tübingen.
10/2002 – 09/2003	Forschungsaufenthalt am Zentrum für magnetische Resonanz der Universität Florenz (Italien)

Tübingen, den 20.10.2004