

Technische Universität München

Max Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

Röntgenstrukturanalysen einer Loop-Verkürzungsmutante des Cupredoxins Pseudoazurin aus *Achromobacter cycloclastes* und biochemische Untersuchungen von humanem MyD88-Adapterprotein

Milko Enrique Velarde

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Stefan J. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. Robert Huber, i.R.
2. Univ.-Prof. Johannes Buchner
3. apl. Prof. Dr. Albrecht Messerschmidt, Universität Konstanz

Die Dissertation wurde am 18.09.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 21.01.2008 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Robert Huber.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Robert Huber bedanken für die Möglichkeit, diese interessanten Projekte zu bearbeiten und für seine Unterstützung, weiterhin für das stete Interesse am Fortgang der PAZAMI-Strukturlösung sowie für jegliche wissenschaftliche Freiheit bei der Wahl der weiteren Projekte und deren Durchführung.

Ein ebenso großer Dank gilt Herrn Professor Dr. Albrecht Messerschmidt, der mir durch ihre außerordentlich engagierte und zeitintensive Betreuung den Einstieg in die Kristallographie ermöglicht hat. Für seine Geduld bei der Beantwortung vieler fachlicher Fragen ein großes Dankeschön.

Herrn Professor Dr. Matthias Mann sei für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis der Proteomics und Signaltransduktion ab 2006 gedankt.

Herrn Dr. Christopher Dennison, University of Newcastle upon Tyne, danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die Bereitstellung des PAZAMI-Plasmides.

Frau Dr. Sofia Macieira möchte ich herzlich danken für die vielen Ratschläge bei der Bearbeitung der verschiedenen Kinasen-Projekte sowie die vielen Ideen bei dem Umgang mit den molekularbiologischen Problemen.

Dr. Michael Koch möchte insbesondere danken für die `Kostprobe` in die Kristallographie als wir den Umecyanin-Projekt bearbeiteten.

Danke sagen möchte ich auch meinen Kollegen in Labor und Büro, die mir immer hilfreich zur Seite standen: Dr. Martin Augustin, Dr. Peter Göttig, Dr. Manuel Than, Silke Pfeifer, Dr. Katja Wenig, Dr. Klaus Maskus, Olga Pipitone, Emina Savarese, Rasso Willkomm, Thomas Steiner, Charlotte Ungewickell, Dr. Cora Keil, Vesna Mors, Dr. Christian Benda, Dr. Karina Valer-Saldana, Marc Baumgärtner, Gretel Ureta, Dr. Mekdes Debela, Dr. Julia Georgescu.

Bedanke möchte ich mich auch an Martin Locher. Danke Martin für Deine Unterstützung, Ratschläge und Zuhören. Ich werde nie unsere Gespräche vergessen, die zu einer schönen Freundschaft führten.

Einen besonderen Dank verdienen auch Werner Dersch, Ottmar Paul, Snezan Marinkovic, Renate Rüller, Monika Schneider, Monika Bumann und Marion Heinze, ohne die ein geordnetes und effektives Arbeiten in der Abteilung für Strukturforschung nicht möglich gewesen wäre.

El agradecimiento mas grande va hacia mi familia, aquella que crecio en aquella calle llamada Jiron Simon Bolivar. Gracias a los Rotositos: Zancudito, Natita, Picapiedrita, Trompudita, Patito, Bobolita y a Piojito; a mis padres por haberme inculcado desde pequeño a luchar por algo que se quiere en esta vida: gracias Don Felix y Doña Lucila. A ti flaquita Ana, que no te encuentras mas entre nosotros, por darme alegrias y fuerzas cuando ya no las tenia. Algun dia espero volvamos a encontrarnos y poder juntarnos en un abrazo tan fuerte como el que nos dimos por ultima vez.

A ti Marita gracias por tu paciencia interminable, por estar ahi cuando te necesitaba, por la alegria que irradias y contagias; pepitas de cafe gracias por ser como eres.

Abschließend möchte ich mich noch bei all jenen Kollegen bedanken, die ich nicht explizit erwähnt habe, und die auch zu dem ausgezeichneten (Arbeits-)Klima in der Abteilung Huber beigetragen haben.

*En memoria a
Any
y
Martin*

Publikationen

- Velarde, M.**, Huber, R., Yanagisawa, S., Dennison, C., & Messerschmidt, A. (2007). Influence of Loop Shortening on the Metal Binding Site of Cupredoxin Pseudoazurin(.). *Biochemistry*, 46(35), 9981-9991.
- Alzari, P. M., Berglund, H., Berrow, N. S., Blagova, E., Busso, D., **Velarde M.**, et al. (2006). Implementation of semi-automated cloning and prokaryotic expression screening: the impact of SPINE. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 62(Pt 10), 1103-1113.
- Messerschmidt, A., Macieira, S., **Velarde, M.**, Badeker, M., Benda, C., Jestel, A., et al. (2005). Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C-iota reveals interaction mode of phosphorylation site in turn motif. *J Mol Biol*, 352(4), 918-931.
- Koch, M., **Velarde, M.**, Harrison, M. D., Echt, S., Fischer, M., Messerschmidt, A., et al. (2005). Crystal structures of oxidized and reduced stellacyanin from horseradish roots. *J Am Chem Soc*, 127(1), 158-166.

Poster

- “SPINE Training & Mobility Conference”, The Royal College of Surgeons, London, United Kingdom, October 18-19, 2004.
- “SPINE Congress 2005”, Cloning and Expression of human protein kinases, lipid kinases and adapter protein MyD88, Vittoria Centro Congressi, Montecatini Terme, Italy, August 31-1 September 2005
- "SPINE 2 First Annual Congress", Heterologous expression of dimeric complexes in TLR signalling The Masarykova kolej, Prague, Czech Republic, June 8-9, 2007.

Inhaltverzeichnis

Danksagung

1.	Zusammenfassung	1
1.1.	Das MyD88-Protein	1
1.2.	PAZAMI-Protein	2
2.	Einleitung	3
2.1.	Die Toll-like-Rezeptoren und deren Adapterproteine	3
2.1.1.	TLR-Struktur	4
2.1.2.	MyD88 Adapterprotein	5
2.1.3.	MyD88-Struktur	5
2.1.4.	MyD88-Funktion	6
2.1.5.	MyD88-abhängiger Signalweg	8
2.1.6.	MyD88-unabhängiger Signalweg	9
2.1.7.	Inhibierung der MyD88 abhängigen und unabhängigen Signalwege	10
2.1.8.	Ziel der Arbeit	10
2.2.	Metalloproteine	11
2.2.1.	Die Familie der Kupferproteine	12
2.2.2.	Klassifizierung der Kupferproteine	13
2.2.3.	Typ 1 `Blaue´ Kupferproteine	18
2.2.4.	Histidin-Protonierung	20
2.2.5.	Elektronentransfer	21
2.2.6.	Mutagenese	21
	2.2.6.1.Ortspezifische Mutagenese	21
	2.2.6.2.Loop-gerichtete Mutagenese	22
2.2.7.	Ziel der Arbeit	25
3.	Material und Methoden	26
3.1.	Materialien	26
3.1.1.	Chemikalien	26
3.1.2.	Laborgeräte	26
3.1.3.	Kristallographie	27
3.1.4.	Chromatographiematerialien	28
3.1.5.	Bakterienstämme, Plasmide und DNA-Oligonukleotide	28
3.2.	Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
3.2.2.	Präparation Plasmid-DNA	31
3.2.3.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	31
3.2.4.	Agarosegelelektrophorese von DNA	31
3.2.5.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen und DNA Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
3.2.6.	Ligation von DNA Fragmenten	32
3.3.	Mikrobiologische Methoden	33

3.3.1.	Herstellung von Nährmedien	33
3.3.2.	Herstellung elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	34
3.3.3.	Transformation mittels Elektroporation	34
3.3.4.	Überexpression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	35
	3.3.4.1.Expression von humanen MyD8-GST-Fusionsprotein	35
	3.3.4.2.Expression von PAZAMI	35
3.4.	Proteinanalytische Methoden	36
3.4.1.	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.4.2.	Western blot und Edman-Sequenzierung	37
3.4.3.	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	37
3.4.4.	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	38
3.4.5.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	39
3.4.6.	Analytische Gelfiltration	39
3.4.7.	Konzentrierung von Proteinlösungen	40
3.5.	Proteinreinigung	40
3.5.1.	Zellaufschluss für die Reinigung von MyD88-GST	40
3.5.2.	Periplasmatischer Aufschluss der <i>E. coli</i> -Zellen mit PAZAMI	40
3.5.3.	Reinigung von humanem MyD88-GST mittels Affinitätschromatographie	41
3.5.4.	Reinigung von PAZAMI	42
3.5.5.	Verdau von humanem MyD88-GST-Protein	43
3.6.	Kristallographische Methoden	44
3.6.1.	Kristallisationsgrundlage	44
3.6.2.	Gasdiffusion	44
3.6.3.	Kristallisationsarbeiten	46
3.6.4.	Erzeugung von Röntgenstrahlung	46
3.6.5.	Beugung von Röntgenstrahlen an Einkristallen	48
3.6.6.	Datensammlung und Datenreduktion	52
3.6.7.	Das Phasenproblem	52
3.6.8.	<i>Molecular Replacement</i>	53
4.	Ergebnisse - humanes MyD88-Protein	56
4.1.	Klonierung und Expression	56
4.2.	Reinigung	57
4.3.	Abspaltung des MyD88-Proteins vom GST-Fusionspartner	58
4.4.	Analyse der Oligomerisierung des MyD88-GST-Fusionsproteins	59
4.5.	Gelfiltration von MyD88-GST	60
5.	Ergebnisse –PAZAMI	61
5.1.	Klonierung und Expression	61
5.2.	Reinigung	61
5.3.	Analyse der Oligomerisierung von PAZAMI	63
5.4.	CD-Spektrum von PAZAMI	64
5.5.	Denaturierungsexperiment mit PAZAMI	65
5.6.	MALDI-TOF-Massenspektrometrie von PAZAMI	65
5.7.	Kristallisation, Datensammlung und Strukturbestimmung	67
5.8.	Strukturbeschreibung von PAZAMI bei verschiedenen pH-Werten	72
	5.8.1. Gesamtstrukturen	72

5.8.2.	Strukturen der Kupferzentren. Allgemeine Bemerkungen	74
5.8.3.	Cu(II) PAZAMI bei pH 7,5	76
5.8.4.	Cu(II) PAZAMI bei pH 5,5	82
5.8.5.	Cu(I) PAZAMI bei pH 7,5	83
5.8.6.	Cu(I) PAZAMI bei pH 5,5	85
6.	Diskussion –PAZAMI	86
6.1.	Schlussfolgerungen	93
7.	Diskussion –MyD88	94
8.	Abkürzungsverzeichnis	96
	Literaturverzeichnis	98

1. Zusammenfassung

1.1. Das MyD88-Protein

MyD88-Protein ist ein wichtiges Adapterprotein, welches eine Schlüsselrolle bei einer erfolgreichen TLR-Signalvermittlung spielt. Das führt unter anderem zur Aktivierung von NF- κ B, welcher ein wesentlicher Transkriptionsfaktor für die Aktivierung immunrelevanter Gene, besonders für die induzierte Synthese von entzündungsvermittelnden Zytokinen ist, wie TNF- α und IL-1, sowie bakterizider Radikale, wie z.B. NO. Die Signaltransduktion wird in MyD88-abhängige und MyD88-unabhängige Signalwege unterteilt. Auffällig bei diesem Protein ist ihre Struktur, welche aus zwei verschiedenen Domänen besteht und welche auch in anderen Proteinfamilien vorkommen: die TIR- und die Todesdomäne. Das macht MyD88 zu einem interessanten Untersuchungsobjekt, weil man daraus mehr über die Interaktion zwischen Proteinen mit homologen Domänen mittels Röntgenkristallographie erfahren kann. MyD88 in voller Länge wurde kloniert und im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich in *E. coli* exprimiert, so dass Mengen an löslichem und homogenem Material gewonnen werden konnten. Durch eine optimierte Reinigungsstrategie war es möglich, das Fusionsprotein nahezu rein zu bekommen. Anschließend wurde versucht, es von seinem tag (GST) zu spalten, aber ohne Erfolg.

Wie man später herausfand bestand das lösliche und homogene Material aus zwei gebundenen Proteinen, nämlich MyD88 und Hsp60. Das wies auf eine nicht korrekte Faltung des Fusionsproteins nach der Expression in *E. coli*-Zellen hin. Es wurde deswegen noch versucht das Protein aus *inclusion bodies* rückzufalten, wieder ohne Erfolg.

1.2. PAZAMI-Protein

Strukturen mit atomarer Auflösung der Pseudoazurin(PAZ)-Variante, in welcher der kürzere Liganden-enthaltende Loop von Amicyanin (AMI) eingeführt wurde, sind bestimmt worden. Der mutierte Loop nimmt eine verschiedene Konformation in PAZAMI als in AMI an. Die Struktur des Kupferzentrums wird beeinträchtigt, wobei der Haupteinfluss eine erhöhte axiale Interaktion ist, welche zu der kürzesten Cu(II)-S(Met)-Bindung führt, die für die Cupredoxin-Familie von Elektron-Transferproteinen beobachtet wurde. Das wird durch eine Verlängerung der wichtigen Cu-S(Cys)-Bindung begleitet und eine verstärkte tetragonale Verzerrung, übereinstimmend mit dem Einfluss der Verkürzung des PAZAMI-Loops auf das UV/Vis-Spektrum. Die Änderung in der Geometrie des aktiven Zentrums ist die Hauptursache für die 50 mV-Abnahme in der Reduktionspotential. Die Struktur des Kupferzentrums ändert sich sehr wenig nach der Reduktion, übereinstimmend mit dem verzerrten Zentrum, welches immer noch die benötigten Eigenschaften besitzt, um den schnelleren Elektrontransfer zu erleichtern. Der exponierte Histidin-Ligand auf dem Loop protoniert im reduzierten Protein und Gründe für den erhöhten pK_s verglichen zu dem von PAZ werden diskutiert. Die Region um den Histidin-Liganden ist hydrophober in PAZAMI als in PAZ, während der Elektron-*self-exchange*, welcher die Bildung von Homodimeren über diesen Oberflächenbereich verursacht, abnimmt. Die Natur der Seitenketten in dieser Region, die durch die Sequenz des Liganden-enthaltenden Loops bestimmt wird, ist ein bedeutsamerer Faktor als die Hydrophobizität, um transiente Proteininteraktionen in PAZ zu erleichtern. Die Struktur von PAZAMI zeigt die Bedeutung der Interaktionen des Loop-Gerüsts für Metallzentren in Proteinen.

2. Einleitung

2.1 Die Toll-like-Rezeptoren und deren Adapterproteine

Der Name Toll-like-Rezeptor stammt von der bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als erstes entdeckten und berichteten Rezeptorfamilie „Toll“ ab, die dem konstitutiven Immunsystem angehört. Man schrieb dieser Familie ursprünglich eine Funktion bei der embryonalen Entwicklung zu: Festlegung der dorsoventralen Achse des sich entwickelnden Fliegenembryos (Hashimoto *et al.*, 1988). Weitere Analysen der Signalwege ergaben weitgehende funktionelle und strukturelle Übereinstimmung mit dem Zytokin-induzierten IL-1 Signalweg bei Säugern [Toll/IL-1, Cactus/I- κ B, und dorsal/NF- κ B (Lemaitre *et al.*, 1996)]. Man beobachtete, dass die intrazellulären Teile des dorsoventralen Signalweges (außer dorsal) und der extrazelluläre Toll-Ligand Spätzle die Expression des Peptids Drosomycin kontrollieren, welches eine große Rolle in der fungiziden Immunantwort spielt. Versuche mit mutierten ausgewachsenen Fliegen, denen wichtige Komponenten des Toll Signalweges fehlten, gingen mit einer stark verminderten Überlebensrate nach einer Pilzinfektion einher (Schimmelpilz *Aspergillus niger*).

Ein Jahr nach der Entdeckung der Bedeutung von *Drosophila* Toll in der Abwehrreaktion gegen Pilzinfektionen wurde das homologe Protein in Säugern identifiziert und mit Toll-like Rezeptor (TLR) bezeichnet (Medzhitov *et al.*, 1997).

Bislang sind im humanen System 10 verschiedene TLRs und in der Maus 12 TLRs entdeckt worden, die alle unterschiedliche Strukturen, spezifische Strukturgruppen oder einzelne Moleküle erkennen. Durch Rezeptor/Ligand-Bindung und mit Hilfe von Adapterproteinen wird über entsprechende Signalkaskaden eine Entzündungsreaktion ausgelöst (Kaisho und Akira, 2006). Die Signalweitergabe bei den TLRs schließt fünf Adapterproteine ein: **MyD88** (*myeloid differentiation primary response gene 88*), **MAL** [*MyD88-adaptor-like* (auch bekannt als TIRAP: *toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein*)], **TRIF** [*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β* (auch bekannt als TICAM1: *TIR domain containing adaptor inducing interferon-beta*)], **TRAM** [*TRIF-related adaptor molecule* (auch bekannt als TICAM2: *TIR-containing adaptor molecule 2*)] und **SARM** (*sterile α - und armadillo-motif-containing protein*), welche die TLRs mit den stromabwärts liegenden Proteinkinasen koppeln. Das führt letztendlich zur Aktivierung von Transkriptions-

faktoren wie dem Nuklear Faktor-kappa B (NF- κ B) und Mitgliedern der Interferon(IFN)-Regulatory- Factor-Familie(IRF) (O’Neil und Bowie 2007).

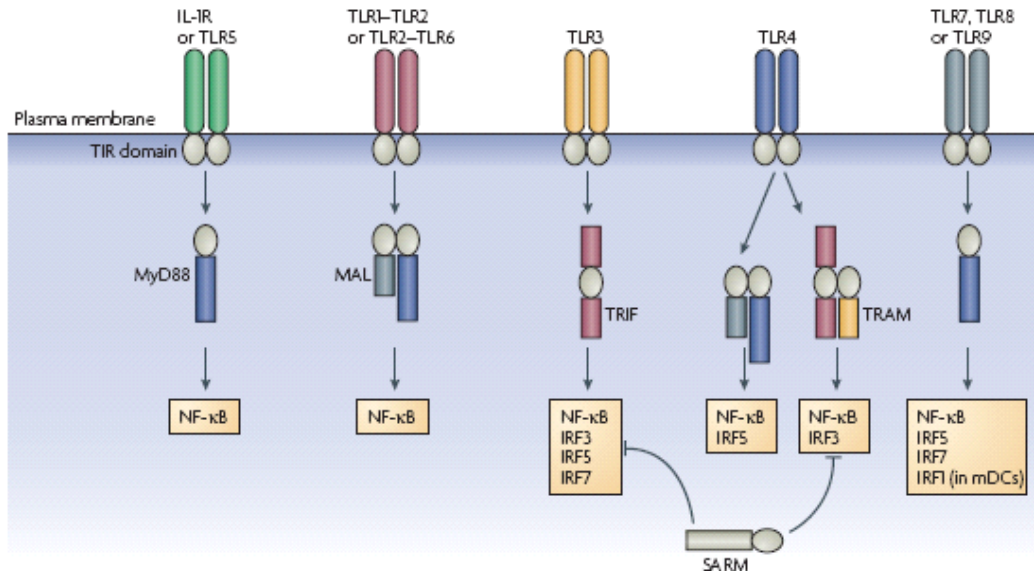


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch TIR-enthaltende Adapterproteine für die TLR/IL-1R Superfamilie. Jedes Adapterprotein wird durch unterschiedliche Rezeptorkomplexe benutzt, um die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren positiv zu regulieren. Die Ausnahme hier ist SARM, welches die durch TRIF vermittelnde Aktivierung von Transkriptionsfaktoren inhibiert (entnommen aus O’Neil und Bowie, 2007).

2.1.1. TLR-Struktur

TLRs sind strukturell stark konservierte integrale Membranglycoproteine, die charakterisiert sind durch eine extrazelluläre Domäne mit einem Signalpeptid, Leucin-reichen Abschnitten (*LRR: leucin rich repeats*) und einer Cystein-reichen Domäne, die von einer Transmembranregion gefolgt ist. Der zyttoplasmatische Teil zeigt eine hohe Homologie zur IL-1 Rezeptorfamilie, daher wird er als Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet (Slack *et al.*, 2000). Ferner zeigt er drei konservierte Bereiche, welche für die Signaltransduktion von Bedeutung sind.

Auf der anderen Seite unterscheiden sich die extrazellulären Regionen der TLRs und IL-1R. Während TLRs in der extrazellulären Region Wiederholungen von LRRs besitzen, enthält die extrazelluläre Region der IL-1R drei Immunoglobulin ähnliche Domänen.

Obwohl die LRR konserviert sind können TLRs multimere Komplexe bilden (Homo- oder Heterodimere), um dadurch eine Vielzahl strukturell nicht miteinander verwandter Liganden erkennen zu können (Medzhitov, 2001).

2.1.2. MyD88-Adapterprotein

MyD88 wurde ursprünglich identifiziert als eines von mehreren Genen [*MyD88*, *MyD116*, *MyD118*, *IRF-1*, (*AP-1*)*Fos/Jun*.*EGR-1*], welche durch das Zytokin IL-6 in Antwort auf das Fehlen der *de novo* Proteinsynthese hoch reguliert werden. IL-6 ist multifunktionell in der M1 myeloblastischen leukämischen Zelllinie der Maus (Lord *et al.*, 1990), wo es das Anhalten des Zellwachstums dieser Zellen und folglich deren Enddifferenzierung zu Makrophagen induziert. Diese resultierenden Zellen leben kurz und sterben durch Apoptose innerhalb von 2-3 Tagen. ‚MyD‘ steht für myeloische Differenzierung (*myeloid differentiation*) und ‚88‘ bezieht sich auf die Nummer des Gens in der Liste von induzierten Genen (Lord *et al.*, 1990). Die vollständige kodierende Sequenz von Maus MyD88 umfasst fünf Exone, wobei das erste Exon die gesamte Todesdomäne (siehe unten) kodiert. Während in der Maus das MyD88-Gen sich in der distalen Region von Chromosom 9 befindet, liegt es bei dem humanen Homologen auf Chromosom 3p22-p21.3 (Hardiman *et al.*, 1997).

2.1.3 MyD88-Struktur

MyD88 kodiertes Protein hat eine modulare Struktur bestehend aus einer N-terminalen Todesdomäne (*death domain*), die durch einen kurzen Linker von einer C-terminalen Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne getrennt wird (Feinstein *et al.*, 1995; Hardiman *et al.*, 1996; Hultmark, 1994; Mitcham *et al.*, 1996; Hofman and Tschopp, 1995; Yamagata *et al.*, 1994). Diese *death domain* ist mit einem Motiv von über 90 Aminosäuren verwandt, das ursprünglich als eine Ähnlichkeitsregion zwischen den zytoplasmatischen Teilen von den FAS/Apo1/CD95- und den TNF-Rezeptoren definiert war. Diese Teile wurden für die Induktion der zytotoxischen Signale benötigt (Itoh and Nagata, 1993; Tartaglia *et al.*, 1993). Demgegenüber zeigt die C-terminale Domäne von MyD88 eine Homologie zu den zytoplasmatischen signalisierenden Regionen der TLR und des IL-1-Rezeptorkomplexes (Hashimoto *et al.*, 1988; Medzhitov *et al.*, 1997; Parnet *et al.*, 1996).

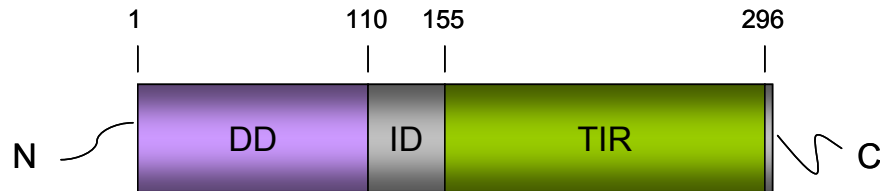


Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteindomäne in MyD88
DD: Todesdomäne (*death domain*); **ID:** Zwischendomäne (*intermediary domain*); **TIR:** Toll/Interleukin-1-Rezeptordomäne; **N:** N-terminales Ende; **C:** C-terminales Ende. Die Anzahl der Aminosäuren, aus welchen jede Domäne besteht, ist auch angegeben.

2.1.4. MyD88-Funktion

Es wurde zuerst gezeigt, dass MyD88 bei der Signalübermittlung des Typ1 IL-1-Rezeptors (IL-1R1) involviert ist (Wesche *et al.*, 1997; Muzio *et al.*, 1997) und ein Jahr später bei der Signalübertragung von verschiedenen TLRs (Medzhitov *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1998). Der entscheidende Beweis seiner Funktion kam aber von Untersuchungen an Mäusen, welche MyD88 defizient waren (Kawai *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 2000). Solche Mäuse waren stark unempfindlich nach Ligandenbindung an TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 und TLR9, woraus man schließen konnte, dass die TLRs bei ihrer Signalübermittlung vollständig von MyD88 abhängen. Andererseits wurde auch gezeigt, dass es unterhalb von einzelnen TLRs einen MyD88 unabhängigen Weg geben muss. So wurde die NF- κ B-Induktion nach Stimulation mit LPS (Ligand von TLR4) oder dsRNA (Ligand von TLR3) in MyD88 defizienten Mäusen nicht unterbunden, sondern nur verzögert. LPS ist eine integrale Komponente der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien und ein sehr starker Aktivator von Makrophagen. Zusätzlich ist die Reifung der dendritischen Zellen nach einer Stimulation mit LPS oder dsRNA in solchen Mäusen nicht beeinträchtigt (Alexopoulou *et al.*, 2001). Werden aber MyD88 defiziente Zellen mit Stimuli, die TLR2 oder TLR9 aktivieren, behandelt, so wird die Induktion von NF- κ B und die Reifung der dendritischen Zellen komplett unterbunden.

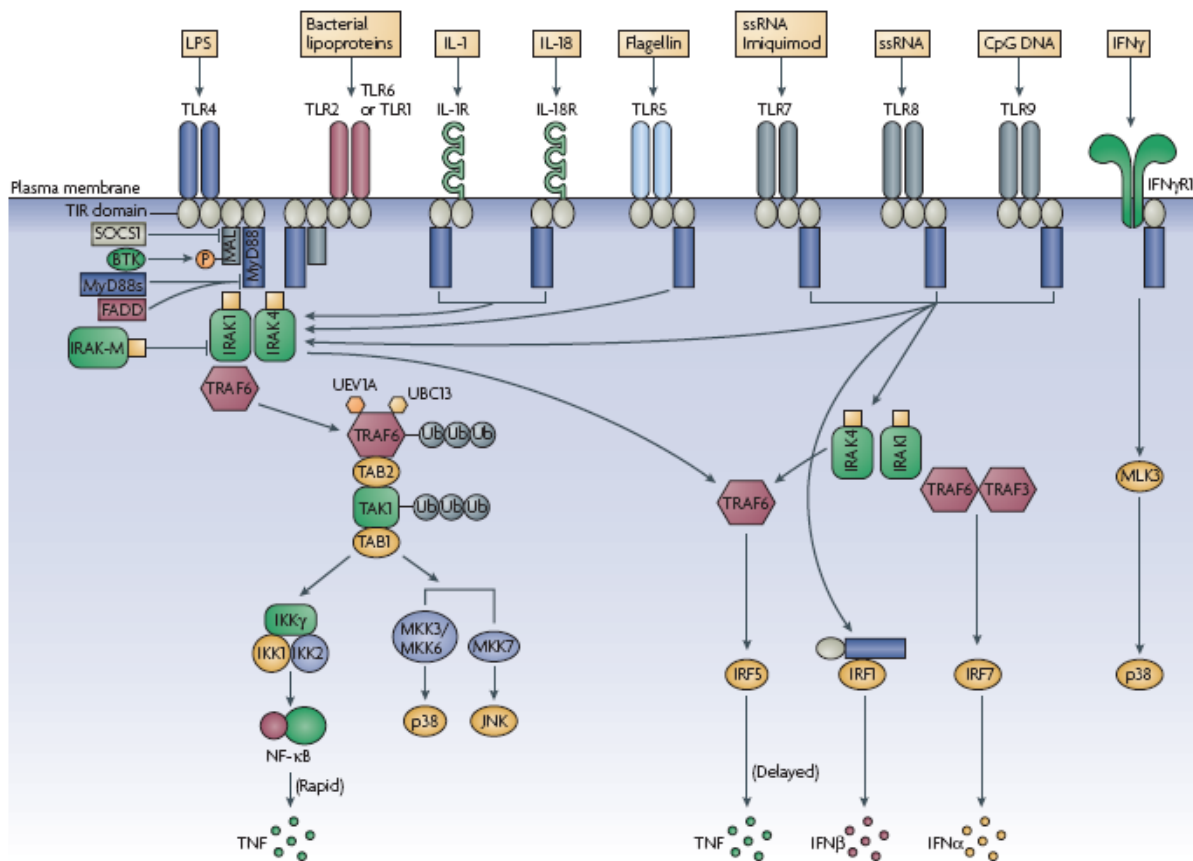


Abb. 3: MyD88-Teilnahme an Signalkaskaden

MyD88 ist ein sehr wichtiges Adapterprotein für die Signalweitergabe in allen Toll-like-Rezeptoren (mit der Ausnahme von TLR3 und gewissen TLR4-Signalen), IL-1R und IL-18R. Seine Hauptrolle ist die Aktivierung von NF- κ B. Es wird direkt zu den TIR-Domänen [Toll/interleukin-1 receptor (IL-1R)] von gewissen TLRs rekrutiert (hier gezeigt für TLR5, TLR7, TLR8 und TLR9), um in der Folge IRAK-4 zu binden. Das führt zu einer Signalkaskade, in welcher IRAK-1, TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor-6*), TAK1 (*transforming-growth-factor- β -activated kinase*) und die ubiquitinierenden Faktoren UEV1A (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*) und UBC13 (*ubiquitin-conjugating enzyme 13*), welche TRAF6 und TAK1 modifizieren und aktivieren, teilnehmen. Dieser letzte Vorgang führt zur Aktivierung der IKK (*inhibitor of κ B kinase*) und NF- κ B und der stromaufwärts gelegenen Kinasen für p38 und JNK (*Jun N-terminal kinase*). MyD88 ist Ziel von negativen Regulatoren, wie MyD88s und FADD (*FAS-associated via death domain*). MyDs ist eine verkürzte Form von MyD88, welche die Rekrutierung von IRAK-4 beeinträchtigt. IRAK-M kann auch den Signalweg durch Verhinderung der Freisetzung von IRAK-1 und IRAK-4 aus MyD88 inhibieren. MyD88 geht auch eine Bindung mit interferon-regulatory factor 5 (IRF5)- und IRF1-Protein ein (entnommen aus O'Neill und Bowie, 2007).

In anderen Studien wurde herausgefunden, dass TLR3 und TLR4 den Transkriptionsfaktor IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) aktivieren und die Produktion der Zytokine IFN- β

unabhängig von MyD88 induzieren können (Doyle *et al.* 2002; Kawai *et al.*, 2001). Das heißt also, dass es zwei unterschiedliche Gruppen von TLRs gibt, wovon eine (TLR3 und TLR4) nicht ausschließlich auf MyD88 für die Signalweiterleitung angewiesen ist.

Eine andere Rolle von MyD88 scheint dessen Teilnahme am Interferon γ -Signalweg zu sein. Dort bindet MyD88 an den IFN γ -Rezeptor 1 (IFN γ R1), was zur Rekrutierung der stromabwärts von IFN γ R1 liegenden *mixed-lineage-kinase3* (MLK3) führt, und welche ihrerseits p38 aktiviert. Das führt schließlich zur Produktion von Chemokinen (Sun und Ding, 2006).

2.1.5. MyD88-abhängiger Signalweg

TLR-Signalwege werden von intrazytoplasmatischen TIR-Domänen aus initiiert, nachdem ein Komplex zwischen der TIR-Domäne von TLR und der von MyD88 (TIR-TIR) gebildet wird. Die Signaltransduktionswege der TLR Familie sind in hohem Maß homolog zu den Signaltransduktionswegen der IL-1R Familie. Erfolgt eine Stimulation mit einem TLR-Liganden (wie ein PAMP: *pathogen-associated molecular patterns*), rekrutiert MyD88 zwei *death domains* enthaltende Serin/Threonin Kinasen: IRAK-1 und IRAK-4 (*IL-1R-associated kinase 1/4*). Sobald IRAK-4 an MyD88 gebunden hat, rekrutiert der neu gebildete Komplex IRAK-1, welches dann durch Phosphorylierung durch IRAK-4 aktiviert wird.

IRAK-1 unterliegt dann einer Hyperphosphorylierung, initiiert wahrscheinlich durch Auto-phosphorylierung, und verlässt in diesem Zustand den Rezeptorkomplex, um mit TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor-6*) zu interagieren. Der aus IRAK-1 und TRAF6 bestehende Molekülverbund interagiert dann mit einem Komplex aus *transforming growth factor (TGF) β -activated kinase* (TAK) 1, TAK-1-Bindeprotein (TAB) 1 und 2 an der Plasmamembran. Der TRAF6-TAK1-TAB1/2-Komplex gelangt in das Zytoplasma, wo die Assoziation mit den Ubiquitin-Ligasen *ubiquitin-conjugating enzyme* (UBC) 13 und *ubiquitin-conjugating enzyme 2 variant 1* (UEV1A) erfolgt. TAK1 wird hierdurch aktiviert und kann daraufhin MAP-Kinasen sowie den *inhibitor of nuclear factor- κ B* (IKK)-Komplex aktivieren. IKK besteht aus einer regulatorischen Untereinheit (IKK γ) und den beiden homodimerisierenden, katalytischen Untereinheiten (IKK α und β). Der NF- κ B-Inhibitor I κ B, der das Kernlokalisationsignal von NF- κ B normalerweise maskiert (Miyamoto *et al.*, 1994), wird durch den aktivierten IKK-Komplex an zwei Serin-Resten phosphoryliert, für eine Ubiquitinierung markiert und durch einen Proteasomenkomplex degradiert. NF- κ B wandert

dann in den Kern, wo es die Transkription von Genen auslöst, welche proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie TNF α , IL-6, IL-8, und IL-1 β kodieren (Chen und Goeddel, 2002; Takeda und Akira, 2005; Hayden und Ghosh, 2004).

Bei TLR2 und TLR4 ist noch ein weiteres Adapterprotein neben MyD88 in diesem Signalweg an der Signaltransduktion beteiligt: TIRAP.

Neue Studien zeigen, dass der MyD88-abhängige Signalweg in der Transplantatabstoßung eine Rolle spielt (Walker *et al.*, 2006).

2.1.6. MyD88-unabhängiger Signalweg

Wie bereits erwähnt fand man für LPS und dsRNA MyD88 unabhängige Signalwege. Der TLR3 Ligand dsRNA zeigt eine Aktivierung von NF- κ B in MyD88-defizienten Zellen. Dieser Ligand aktiviert den MyD88-unabhängigen Signalweg, in dem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 zur Induktion von IFN-induzierbaren Genen führt. Dabei spielt das Adapterprotein TRIF als Interaktionspartner von MyD88 eine wichtige Rolle.

Auch TRAM tritt über seine TIR-Domäne mit TLR4 in Verbindung. Nach Komplexbildung wird das Adapterprotein TRIF zusätzlich rekrutiert. Der Molekülverbund kann dann einerseits mit RIP1 (*receptor interacting protein 1*) interagieren und die Aktivierung des IKK-Komplexes und damit, unabhängig von MyD88, die Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors auslösen. Andererseits kann eine Verbindung mit dem TBK1 (*TANK binding kinase 1*)-IKK ϵ -Komplex entstehen. Dieser Komplex aktiviert den Transkriptionsfaktor IRF-3 und induziert die Expression von IFN- β . Der MyD88-unabhängige Signalweg führt daher zur Expression von inflammatorischen Zytokinen und zur Sekretion von Typ 1-IFN (IFN- α und - β).

2.1.7. Inhibierung der MyD88-abhängigen und -unabhängigen Signalwege

MyD88s, eine *splice* Variante von MyD88, bindet nicht die Kinase IRAK-4, wodurch die Phosphorylierung von IRAK-1 verhindert und die Aktivierung des NF- κ B gehemmt wird (Burns *et al.*, 2003). Dieser *splice* Variante fehlt die Zwischendomäne des Wildtyps (siehe Abb. 2), welche eine wichtige Region für die Interaktion mit IRAK-4 ist. Es wurde auch beobachtet, dass MyD88s die Aktivierung von JNK nicht inhibiert, was die Notwendigkeit von IRAK4 in diesem Signalweg in Frage stellt.

Auch das Protein IRAK-M wirkt negativ auf den TLR-Signalweg. IRAK-M ist ein Mitglied der Kinase-Familie, aber im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern, weist sie keine Kinase-Aktivität auf. Dieses Protein, das nur von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, verhindert, dass sich der IRAK1-IRAK4-Komplex von MyD88 löst. Als Folge davon kann sich der IRAK1-TRAF6-Komplex nicht bilden, und infolgedessen wird das TLR-Signal abgeschwächt (Kobayashi *et al.*, 2002).

2.1.8. Ziel der Arbeit

Klonierung, Expression Reinigung und Strukturauflösung von MyD88 wurde als primäres Ziel vorgenommen. Dieses Protein wurde im Rahmen des EU-Projektes SPINE (*Structural Proteomics in Europe*) bearbeitet. Eins der Ziele im SPINE-Projekt ist die Bestimmung der atomaren Struktur von medizinisch relevanten humanen Proteinen, welche in fundamentalen Prozessen und Krankheiten verwickelt sind. Schwerpunkt sind hier krebsrelevanten Proteinfamilien, sowie diejenige, welche für Immunfunktion und neurodegenerative Krankheit wichtig sind, wie Kinasen, und deren Adapterproteine, Proteasen, Zelloberflächemoleküle, Kernrezeptoren usw. Das SPINE-Projekt wurde Ende 2005 abgeschlossen und seine Ergebnisse sind in einem Sonderheft der Zeitschrift Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, Band 62, Heft 10, Oktober 2006 zusammenfassend veröffentlicht.

2.2. Metalloproteine

Um biologische Vorgänge besser zu verstehen, ist das Studium von Struktur, Evolution and Funktion von Proteinen von größter Bedeutung. In biologischen Systemen sind sie für den Aufbau zellulärer Strukturen, die Energiegewinnung, den Stoffwechsel, die Zellteilung und die Reaktionen bei der Weitergabe der Erbinformation verantwortlich.

Eine wichtige Klasse dieser Biomoleküle enthalten als Kofaktoren Metalle. Diese sind entsprechend komplexiert am Protein gebunden und bilden oft die katalytischen Zentren von Enzymen oder stabilisieren die Struktur des Proteins entscheidend. Diese Proteine werden als Metalloproteine bezeichnet.

Nach den redox-inaktiven Hauptgruppenelementen Calcium, Kalium, Natrium und Magnesium sind die Übergangsgruppenelemente Eisen, Zink und Kupfer die wichtigsten Biometalle (Kaim und Schwederski, 1991). Die häufigsten Metallionen, die in Metalloproteinen als essentielle Kofaktoren oder mit anderer wichtiger Funktion gebunden werden, sind Eisen, Calcium, Zink und Kupfer, angeführt in abnehmender Anzahl der aktuell charakterisierten Metalloproteine. Eisen und Kupfer sind redoxaktive Elemente und ihre Metalloproteine sind häufig Redoxproteine

Redoxproteine nehmen eine zentrale Rolle in der Energiegewinnung durch Atmung und Gärung ebenso wie in der pflanzlichen und bakteriellen Photosynthese ein. Redoxproteine spielen auch eine große Rolle beim Elektronentransfer in denitrifizierenden Bakterien. Die Bindung des Kofaktors im Proteingerüst verändert dessen Eigenschaft deutlich. Je nach Art der Komplexierung und der genauen Umgebung des Metallions kann die gleiche Gruppe in verschiedenen Proteinen unterschiedliche Aktivitäten und elektrochemische Eigenschaften besitzen.

Redoxproteine werden in zwei Gruppen unterteilt (Guo *et al.*, 1991) nämlich in *intrinsische* und *extrinsische*. Intrinsische Redoxenzyme zeichnen sich durch ein katalytisches Zentrum im Innern der Polypeptidstruktur aus. Sie interagieren im Organismus mit kleinen Substratmolekülen, ohne einen Elektronentransfer zur Oberfläche des Enzyms zu benötigen.

Extrinsische Redoxproteine hingegen tauschen im Rahmen ihrer biologischen Funktion Elektronen mit anderen Proteinen aus, indem die redoxaktiven Gruppen beider Proteine räumlich nah aneinander positioniert werden und somit die Elektronentransferreaktion im Oberflächenbereich stattfindet. Dies kann durch eine räumliche Annäherung von Protein und

Elektrode nachgeahmt und damit für die Untersuchung der Redoxeigenschaften des Proteins genutzt werden.

Da ein wesentlicher Teil dieser Dissertation sich mit der Bestimmung der Raumstruktur von Loopmutanten des kupferhaltigen Redoxproteins Pseudoazurin bei unterschiedlichem pH und Oxidationszustand beschäftigt, wird im folgenden kurz auf Kupferproteine und ausführlicher auf die entsprechenden Redoxproteine eingegangen.

2.2.1. Die Familie der Kupferproteine

Kupferproteine sind in der Natur weit verbreitet und erfüllen unterschiedliche grundlegende Aufgaben. Sie agieren als Elektronentransferproteine in Redoxketten und Sauerstofftransporter in Spinnen und Mollusken sowie als Oxidasen, Oxygenasen, Superoxid-abbauende Enzyme und Stickoxid-(NO_x)-Reduktasen (Messerschmidt *et al.*, 1997). Weiterhin sind sie beteiligt an der Homöostasis von Kupfer in biologischen Systemen, was die Speicherung, den Transport und den Einbau von Kupfer in die entsprechenden Zielproteine betrifft (Arnesano *et al.*, 2004).

In Biomolekülen tritt Kupfer fast ausschließlich in den Oxidationszuständen +I und +II auf, da der Cu(II)/Cu(+III)-Übergang ein sehr hohes Redoxpotential besitzt (Solomon *et al.*, 2001). Ähnlich wie bei den Hämproteinen ist auch im Falle der Kupferproteine das formale Potential stark abhängig von der Proteinumgebung und der Liganden des Metallions (Battistuzzi *et al.*, 1999).

Die Vielseitigkeit in der Funktion von Kupferproteinen wird durch die unterschiedliche Koordinationsgeometrie der Kupferzentren sowie die Wahl der Liganden vorgegeben. Von einem biologischen Gesichtspunkt aus betrachtet, ist das komplexchemische Verhalten von Kupfer geprägt durch die mittelgroße Stabilität der Cu(I)- d^{10} -Konfiguration (Solomon und Lowery, 1993). Durch die fehlende Ligandenfeldstabilisierungsenergie (d^{10}) ist das Cu(I)-Ion recht flexibel bezüglich seiner Koordinationszahl und -geometrie.

Die bevorzugten Koordinationszahlen reichen von zwei (linear) bis vier (tetraedrisch), wobei das Optimum zwischen drei (trigonal-planar) und vier liegt (Vogler *et al.*, 1989). Die reine Dreifachkoordination wird jedoch bei Cu(I)-Verbindungen oft durch zusätzliche schwache axial gebundene Liganden erweitert, hierfür sind vor allem die Typ 1-Kupferzentren ein

Beispiel. Die Oxidationsstufe +I des Kupfers kann mit weichen Donoratom-Liganden stabilisiert werden.

Im Vergleich zu Cu(I)-Ionen besitzt das kleinere Cu(II)-Ion eine höhere Hydratationsenergie und ist daher in wässriger Lösung stabiler. Cu(II)-Ionen bevorzugen harte Donorfunktionen (meist Stickstoff). Dies spiegelt sich in der Komplexstabilität und auch der oftmals inerten N-Cu(II)-Bindung wider. Die d^9 -Elektronenkonfiguration des Cu(II)-Ions enthält 9 Elektronen in 5 degenerierten d -Orbitalen im freien Ion. Wenn es in eine oktaedrische Umgebung von Chloridliganden gebracht wird, erhöht sich die Energie der d -Orbitalen und sie spalten auf in t_{2g} - und e_g -Sätze. Das entspricht einem 2E_g -Grundzustand, der Orbitalmäßig degeneriert ist und zugänglich ist für eine Jahn-Teller-Verzerrung. In den Jahn-Teller-verzerrten oktaedrischen Cu(II)-Komplexen sind die axialen Liganden schwächer gebunden als die äquatorialen und weisen demnach einen größeren Bindungsabstand auf. Diese Verlängerung der Bindung kann bis zum Verlust der axialen Liganden gehen und resultiert in einer quadratisch-planaren Koordination.

2.2.2. Klassifizierung der Kupferproteine:

In der Biologie auftretende Kupferzentren wurden ursprünglich hinsichtlich ihrer strukturellen und spektroskopischen Eigenschaften in verschiedene Typen unterteilt (siehe Abbildung 4), welche zum Teil nebeneinander in einem Protein vorliegen können. Man unterscheidet das blaue Kupferzentrum (Typ 1), das normale „nichtblaue“ Kupferzentrum (Typ 2) und das zweikernige, meist verbrückte Kupferzentrum (Typ 3). Einige Kupferproteine lassen sich keinem der drei Typen zuordnen. So weist die zu den blauen Oxidasen gehörenden Ascorbat-Oxidase [(erstes nachgewiesenes trinukleares Kupferzentrum (Messerschmidt *et al.*, 1989)] ein dreikerniges Kupferzentrum auf, welches aus der Kombination von Typ 2 und Typ 3 beschrieben werden kann (siehe Abbildung 4e). Ebenso lässt sich das in Cytochrom-c-Oxidase und N_2O -Reduktase gefundene Cu_4 -Zentrum keinem der drei Typen zuordnen.

Typ 1-Kupferzentren sind nicht nur in den kleinen blauen Kupferproteinen sondern auch in den blauen Multikupfer-Oxidasen und außerdem in der Kupfer-haltigen Nitrit-Reduktase (Messerschmidt, 1993) anwesend. Das Typ1-Kupferzentrum befindet sich nahe an der

Oberfläche des Proteins. Das Kupferatom in dieser Gruppe hat in der Regel vier Proteinseitenketten als Liganden und in manchen Fällen (z.B. bei Azurin) einen schwachen Hauptketten-Carbonylsauerstoff als fünften Ligand. Die vier kanonischen Kupferliganden in dieser Gruppe sind His, Cys, His, und Met, angeordnet in dieser Reihenfolge auf der Polypeptidkette (siehe Abbildung 4a).

Typ 2-Kupferzentren kommen vor in Kupfer-haltigen Oxidasen (mit Ausnahme der blauen Oxidasen und Cytochrom-c-Oxidase), Oxygenasen, der Nitrit-Reduktase und der Cu, Zn-Superoxid-Dismutase. Diese Kupferzentren bevorzugen quadratisch-planare oder tetragonal-pyramidale Koordinationen. Die Typen von Liganden sind unterschiedlich. Trotzdem ist ein gewöhnliches Merkmal die Tatsache, dass in der aktiven Form des Enzyms eine der Koordinationsstellen des Kupfers frei für die Bindung von Sauerstoff ist. Typ 2-Kupferzentren haben Histidin, Tyrosin (oft modifiziert), Methionin und Cystein als Liganden. Das aktive Zentrum der Galactose-Oxidase (siehe Abbildung 4b) zeigt, dass das Kupferion mit zwei Histidin-Resten, einem einfachen Tyrosinat und einem kovalenten modifizierten Tyrosin koordiniert ist. Das Tyrosin ist zusätzlich mit einem Cysteinyl-Rest verbunden, um eine neue dimerische Aminosäure zu bilden (Cysteinyltyrosin).

Typ 3-Kupferzentren sind zweikernige Zentren, deren Kupferionen antiferromagnetisch im oxidierten Zustand gekoppelt sind (Solomon *et al.*, 1976; Himmelwright *et al.*, 1980). Als Beispiele in dieser Gruppe haben wir den Sauerstofftransporter Hämocyanin und die Monooxygenase Tyrosinase. Die Geometrie des Kupferzentrums vom Arthropoden-Hämocyanin ist in Abbildung 4c gezeigt. Jedes Kupferion wird von jeweils drei Histidin-Liganden gebunden und laut Röntgenstrukturanalyse weisen sie eine trigonal-planare Koordinationsgeometrie auf.

Trinukleare Kupferzentren können spektroskopisch als gekoppelte Typ2/Typ3-Kupferzentren beschrieben werden (Allendorf *et al.*, 1985). Die atomare Struktur des trinuklearen Kupferzentrums für die oxidierte Ascorbat-Oxidase, wie abgeleitet aus der Röntgenkristallographie (Messerschmidt *et al.*, 1992), ist in Abbildung 4e gezeigt. Der trinukleare Cluster hat acht Histidin-Liganden, symmetrisch abhängig von den N- und C-terminalen Domänen. Er

kann in ein Paar von Kupferatomen mit sechs Histidin-Liganden aufgeteilt werden, deren koordinierende N-Atome trigonal-prismatisch angeordnet sind, im Gegensatz zu Hämocyanin, wo die N-Atome eine trigonal-antiprismatische Anordnung bilden. Dieses Paar ist das mutmaßliche Typ 3-Kupferzentrum. Das übrige Kupferatom hat zwei Histidin-Liganden und ist das mutmaßliche spektroskopische Typ 2-Kupferzentrum. Zwei Sauerstoffatome sind am trinuklearen Kern gebunden: als OH^- oder O^{2-} , welches das Typ 3-Kupferpaar verbindet, und als OH^- oder H_2O , welches zu dem mutmaßlichen Typ 2 Kupferzentrum, *trans* zu dem Kupferpaar, gebunden wird. Ein Sauerstoff-Ligand im Zentrum des Kupferions konnte nicht entdeckt werden. Der mittlere Kupfer-zu-Kupfer-Abstand im trinuklearen Kupferzentrum von Ascorbat-Oxidase ist 3,74 Å.

Cu_A -, Cu_B - und Cu_Z -Kupferzentren

Die Cytochrom-Oxidase ist ein sowohl Eisen als Kupfer enthaltendes komplexes Protein der Atmungskette, das je nach Organismus aus bis zu 13 Untereinheiten aufgebaut ist. Allen Cytochrom-c-Oxidase ist gemeinsam, dass sie in der Untereinheit I ein sechsfach koordiniertes Häm und ein heterodinukleares Zentrum aus einem high-spin Häm (Fe_{a3}) und einem Kupferatom (Cu_B) binden. In der Untereinheit II haben die Cytochrom-c-Oxidase ein homodinukleares Kupfer-Zentrum (Cu_A) gemeinsam (Iwata *et al.*, 1995; Kroneck *et al.*, 1990). Aktuelle Strukturmodelle für Cu_A beinhalten mindestens zwei durch Cystein-Schwefel gebildete Brücken und zwei an jeweils einem Kupferatom terminal koordinierende Histidin-Stickstoffe (Gurbiel *et al.*, 1993). Außerdem werden ein schwach koordinierender Methionin-Schwefel sowie ein Hauptkette-Sauerstoff eines Glutamates oder ein Aspartat als weitere Koordinationspartner für die Kupferatome des Zentrums diskutiert [siehe Abbildung 4e, Lappalainen und Saraste, 1994; Kelly *et al.*, 1993; Steffens *et al.*, 1993)].

Ein weiteres Beispiel für ein Cu_A -Zentrum ist die N_2O -Reduktase. Sie ist die terminale Oxidoreduktase in der N_2O -reduzierenden Atmungskette denitrifizierender Bakterien. Sie ist ein purpurnes Enzym mit einem gemischt-valenten, homodinuklearen Kupferzentrum (Cu_A), das dem der Cytochrom-c-Oxidase nahe verwandt ist. Aufgabe des Cu_A -Zentrums ist der Elektronentransfer zum katalytisch aktiven Zentrum (Cu_Z -Zentrum), an welchem die Reduktion von N_2O zu N_2 stattfindet. Dieses zweite Zentrum umfasst vier Kupferionen,

welche in einen „butterfly“ Cluster angeordnet sind (siehe Abbildung 4f). Die Protein-Liganden bestehen ausschließlich aus Histidin-Resten. Drei von den Kupferionen sind durch zwei Histidin-Liganden koordiniert, während ein viertes nur ein Histidin besitzt (Rasmussen *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002)]

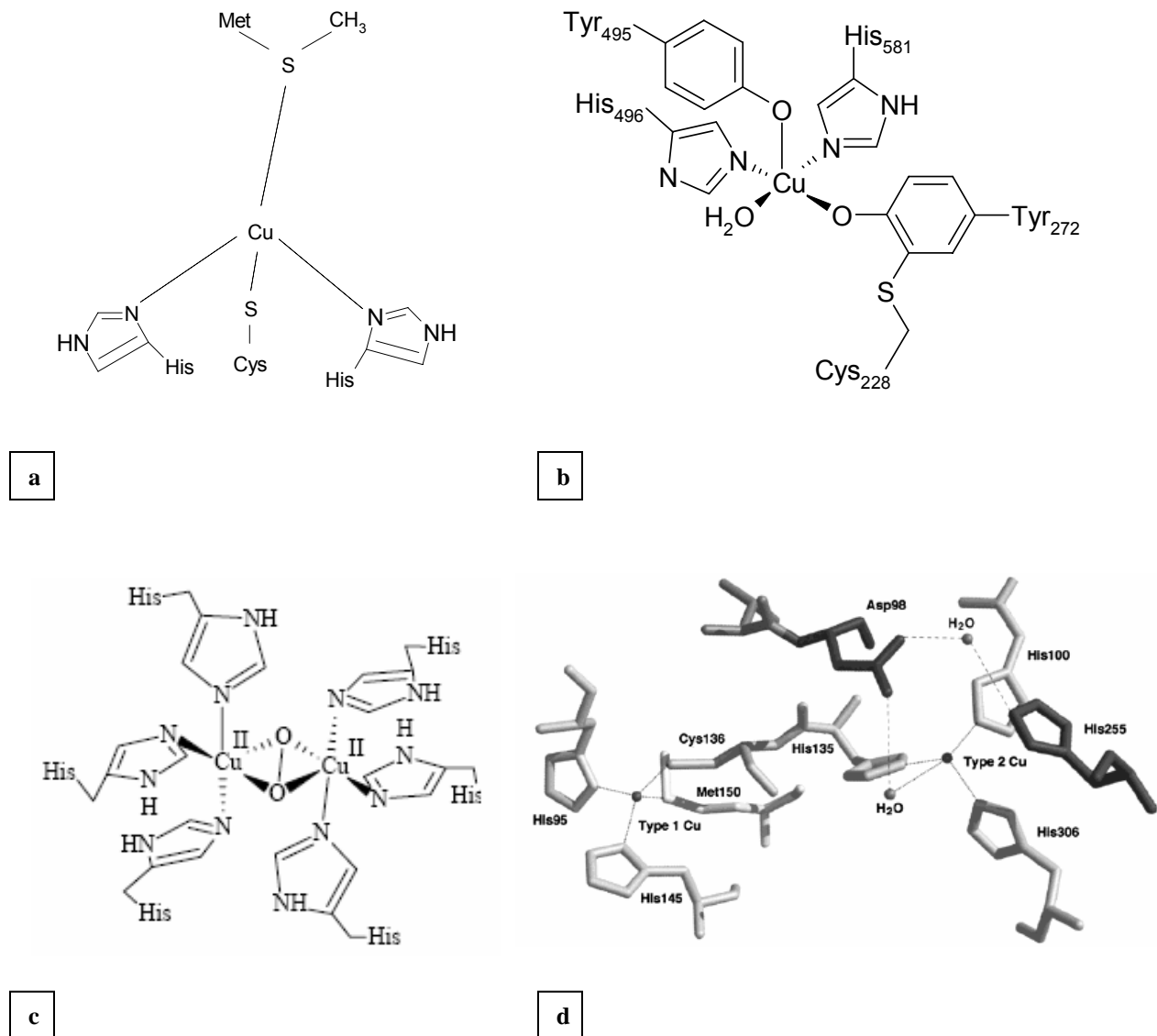
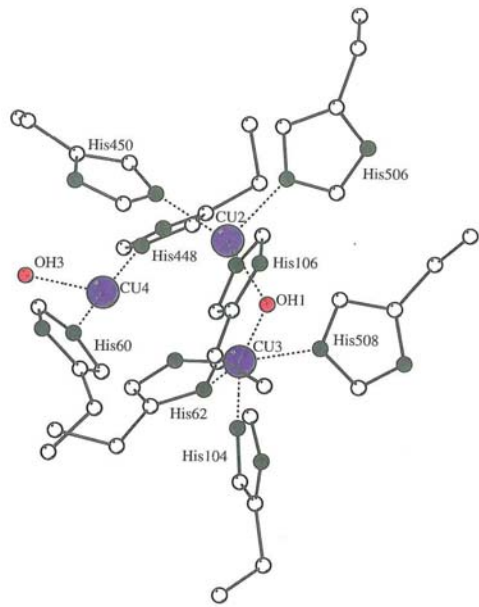
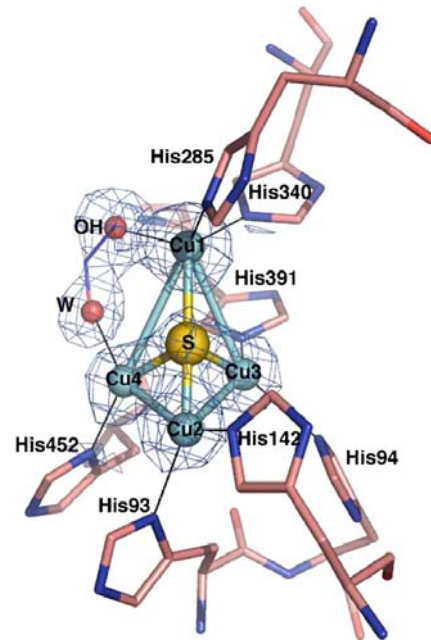


Abb. 4: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Typen von Kupferzentren.

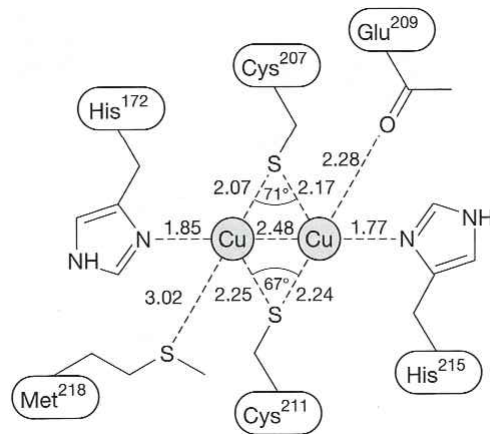
a: Typisches Kupferzentrum, wie es bei Kupferproteinen des Typ 1 (Pseudoazurin, Azurin, Plastocyanin) vorkommt (Inoue *et al.*, 1999). **b:** Typ 2 Kupferprotein am Beispiel der Galaktose-Oxidase (Ito *et al.*, 1991). **c:** Das zweikerniges Oxyhämocyanin [an den Kupferionen koordinieren jeweils drei Histidinreste, die am Proteingerüst verankert sind (Magnus *et al.*, 1994)]. **d:** Typ 1 und 2-Kupferzentren in der oxidierte Form von der Nitrit-Reduktase aus *Alcaligenes xylosoxidans* (entnommen aus Suzuki *et al.*, 2000).



e



f



g

e: Darstellung des trinuklearen Kupferzentrums aus der Ascorbat-Oxidase (entnommen aus Messerschmidt A., Robert H., Wieghardt K., Poulos T. in Handbook of Metalloproteins). Die gezeigten Bindungsabstände sind von der Untereinheit A. **f:** Cu₂-Cluster von der native Struktur aus der N₂O-Reduktase von *Achromobacter cycloclastes* (entnommen aus Paraskevopoulos *et al.*, 2006). Die Kupfer 1 und Kupfer 2-Atome des Cu₂-Cluster sind mit einer OH-Gruppe und Wasser verbunden. **g:** Schematische Darstellung des zweikernigen Cu₂-Zentrum in Cyto c A (entnommen aus Williams *et al.*, 1995).

Da in dieser Arbeit mit der mutierten Form des Proteins Pseudoazurin (welches, zu den Typ 1-Kupferproteinen gehört) gearbeitet wurde, wird aus diesem Grund nur auf die Typ 1-Kupferproteine näher eingegangen

2.2.3. Typ 1 „Blaue“ Kupferproteine

Blaue Kupferproteine sind lösliche Elektronen-Transferproteine mit kleiner molekularer Masse (10-15 kDa), welche in Bakterien und Pflanzen gefunden werden. Auffällig bei diesen Proteinen ist die starke blaue Farbe assoziiert mit einer sehr hohen Absorption bei 600 und 450 nm im oxidierten Zustand (siehe Abbildung 5), welche aufgrund des Ladungstransfers zwischen dem Schwefelatom aus dem Cysteinrest (einer von vier Kupferliganden) und dem Kupfer(II) entsteht [(Cys) $S^{\gamma}\pi \rightarrow CuII(d_x^2-y^2)$]; (Gewirth und Solomon, 1988; Han *et al.*, 1991). Bei diesem Ladungstransfer [*Ligand to Metal Charge Transfer*: (LMCT)] kann der Schwefel des Cystein-Restes bei geringerer Energiezufuhr ein Elektron abgeben, welches am Kupferatom bereitwillig aufgenommen wird. Dadurch wird die Ladung vom Liganden auf das Kupfer verschoben.

Nicht alle Typ 1-Kupferzentren sind jedoch blau. Einige Nitrit-Reduktasen sind grün, weil sie eine zweite starke Absorption bei ~ 460 nm zeigen (Kukimoto *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1986). Auch das ist zurückzuführen auf einen LMCT vom Cystein zu dem Cu(II) nämlich von den (Cys) $S^{\gamma}\pi$ Pseudo-Sigma-Orbitalen [(Cys) $S^{\gamma}\rho\sigma \rightarrow CuII(d_x^2-y^2)$]; (LaCroix *et al.*, 1996; Pierloot *et al.*, 1998].

Proteine dieser Gruppe zeigen außerdem eine außergewöhnlich kleine Kupfer-Hyperfeinaufspaltung (A_{II} -Werte von 0.0035-0.0063 cm^{-1} im EPR-Spektrum) sowie ein höheres Redoxpotential (ein Bereich von 184 bis 680 mV) im Vergleich zum Cu(II)/Cu(I)-Paar in wässriger Lösung. Die invariable biologische Funktion dieser Proteine ist die Elektronenübertragung. Der unsymmetrische Koordinationsbereich des Typ 1-Kupferzentrums ist gut konserviert, wie anhand entsprechender sequentieller und struktureller Daten zu sehen ist (Huber, 1989). Kristallstrukturanalysen haben ergeben, dass das Metallzentrum eine sehr stark verzerrte „tetraedrische“ Umgebung aufweist. Die 3+1-Koordination wird von dem umgebenden Proteingerüst vorgegeben und ähnelt in erster Näherung einer optimalen Koordinationsgeometrie (trigonal-planar) für Kupfer(I)-Zentren mit zwei fest koordinierten Histidin(N^{δ})- und einem Cystein(S^{γ})-Rest. Hinzu kommt ein schwach axial gebundener Methionin-Rest

(im Fall von Stellacyanin ein Glutaminrest) (Guss und Freeman, 1983; Farver und Pecht, 1988; Hart *et al.*, 1996). Diese Verzerrung stellt einen Kompromiss [entatischer Zustand (Malmström, 1994)] zwischen einerseits Cu(I): d^{10} die eine tetraedrische Koordination durch weiche Liganden und andererseits Cu(II): d^9 die eine quadratisch planare Koordination durch

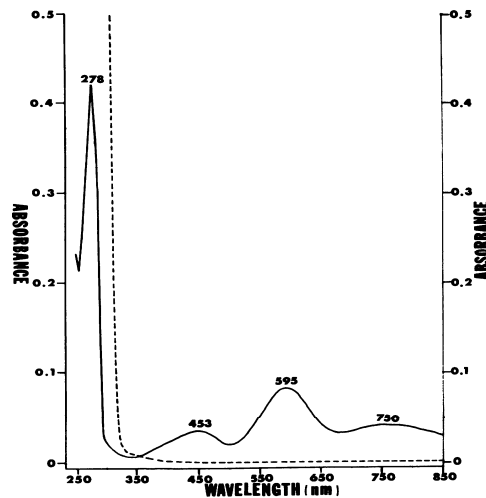


Abb. 5: UV/Vis-Spektrum vom blauen Kupferprotein aus *Achromobacter cycloclastes* (Typ 1)
 — : oxidierte Form, ----- : reduzierte Form (mit Dithionite). Spektroskopische Verhältnisse:
 A_{278}/A_{453} oxidiert $\cong 12$; A_{278}/A_{595} oxidiert $\cong 5$ (entnommen aus Liu *et al.*, 1986)

härtere Liganden bevorzugt, dar. Durch diese ungewöhnliche Koordinationsgeometrie wird die Reaktivität des Metallzentrums beim Elektronentransfer gesteigert. Außer den Kupferliganden sind auch die dreidimensionalen Strukturen der Proteinkerne oder der Proteindomänen, die ein Typ 1-Kupferzentrum enthalten, konserviert. Der konservierte Kern besteht aus acht β -Strängen, welche zwei β -Faltblätter bilden und zusammen mit den β -Strängen zu einem Greek-Key-Motiv angeordnet sind. In der Mitte dieser zwei β -Faltblätter tragen die hydrophoben Resten zur Stabilität und Festigkeit des Proteins (Domäne) durch Bildung einer hydrophoben Tasche bei.

2.2.4. Histidin-Protonierung

Die Reduktion einiger Typ 1-Kupferzentren (wie die von Amicyanin, Plastocyanin und Pseudoazurin) wird von einer pH-abhängigen Konformationsänderung begleitet, bei welcher das N^δ des C-terminalen koordinierenden Histidins protoniert wird, und infolgedessen seine Bindung mit dem Kupferion verlorenght (Guss *et al.*, 1986; Lommen *et al.*, 1991; Vakoufari *et al.*, 1994). Dieses Histidin ist auf der Oberfläche exponiert und nach der Protonierung ‚klappt‘ sein Imidazol-Ring um, welches heißt, dass er sich um 180° um seine C^β-C^γ-Bindung dreht. Außer diesem Umklappen bewegt sich der Imidazol-Ring leicht nach außen, wodurch der Abstand zu dem Kupferion zunimmt. Kristallstrukturen und EXAFS (*extended X-ray absorption fine structure*)-Studien haben auch gezeigt, dass nach der Protonierung des

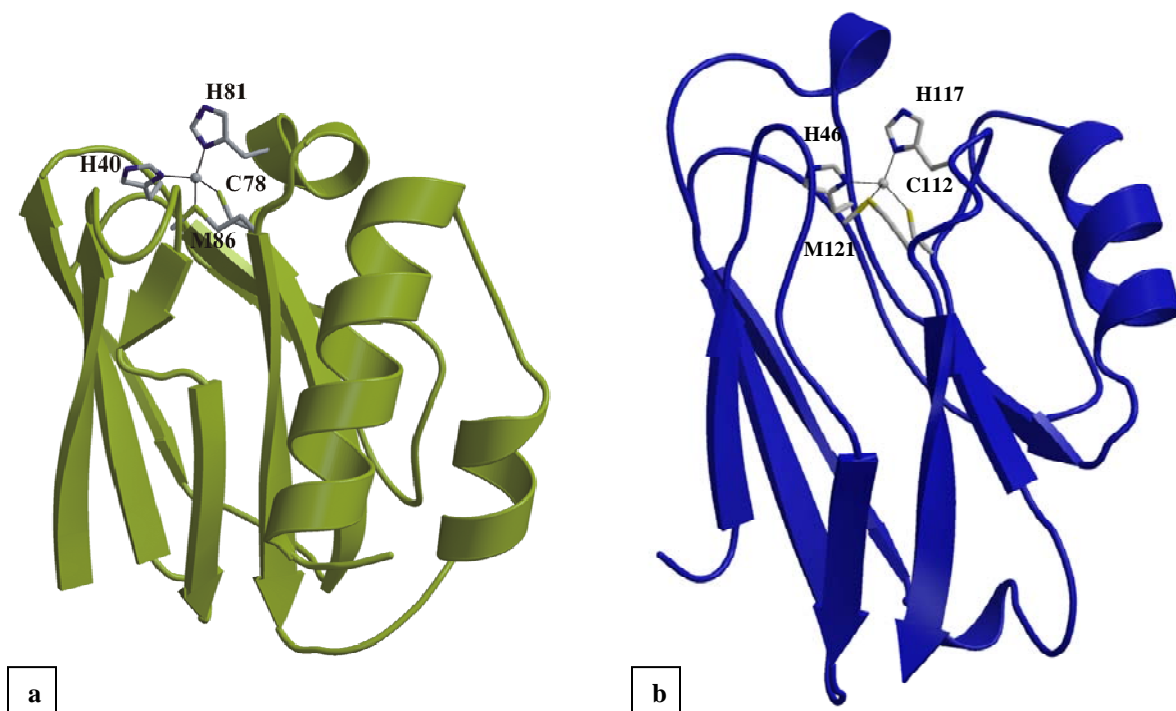


Abb. 6: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Strukturen von zwei Proteinen, welche ein Typ 1-Kupferzentrum enthalten

Zu sehen sind die zwei gegenüberliegenden β -Faltblätter, welche den ‚ β -sandwich‘ in jedem Molekül bilden, mit einer Lücke für den hydrophoben Kern in der Mitte. Auf der rechten Seite jeder Abbildung sind zusätzlich auch noch die α -Helices dargestellt. **a:** Pseudoazurin aus *Achromobacter cycloclastes* (Inoue *et al.*, 1999; PDB: 1BQK). **b:** Azurin aus *Pseudomonas aeruginosa* (Nar *et al.*, 1991; PDB: 4AZU).

Histidins, das Kupferion sich in Richtung zur Ebene der restlichen Liganden [$S^{\gamma}(\text{Cys})$, $N^{\delta}(\text{His})$ und $S^{\delta}(\text{Met})$] bewegt, was zu einer trigonal-planar-Koordination führt. Diese Wegbewegung erhöht den Abstand zwischen dem Kupferion und dem Imidazol-Ring sogar um mehr als 3 Å.

Nach der Protonierung wird sowohl eine Erhöhung des Reduktionspotentials als auch eine Erniedrigung der Redoxaktivität bei den blauen Kupferproteinen beobachtet (Di Bilio *et al.*, 1998; Lommen und Canters, 1990; Sykes, 1985).

2.2.5. Elektronentransfer

Typ 1-Kupferzentren scheinen für den schnellen Elektronentransfer optimiert zu sein. Schneller Elektron-*self-exchange* ($\Delta G^{\circ}=0$) wurde bei mehreren blauen Kupferproteinen mit Raten im Bereich von 10^4 - $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ gemessen [(Dennison *et al.*, 1996; Groeneveld *et al.*, 1985; Kyritsis *et al.*, 1995; Lommen *et al.*, 1988)]. Kinetische Elektrontransferreaktionen ohne Wärmeaustausch werden allgemein durch die Marcus-Theorie beschrieben (Marcus und Sutin, 1985). Der Donor und Akzeptor kommen zusammen und reorganisieren sich, um den Elektronentransfer zu ermöglichen. Ein Beispiel für diese Interaktion zwischen Donor und Akzeptor stellen die Nitritreduktase und Pseudoazurin von *Achromobacter cycloclastes* dar. Das fakultativ anaerobe Bakterium *A. cycloclastes* führt die vollständige Denitrifikation von NO_3^- zu N_2 durch. Um das zu bewältigen, braucht es mehrere Proteine unter denen die Nitratreduktase, Interaktionspartner von Pseudoazurin, eine wichtige Rolle spielt. Die grüne Kupfer-Nitritreduktase aus *A. cycloclastes* nimmt ein Elektron aus dem verwandten Pseudoazurin auf, das als Elektronendonator fungiert, um NO_2^- zu reduzieren. Der Effekt der Lysin-Reste auf den Elektronentransport von Pseudoazurin zu der Nitritreduktase ist gut untersucht worden, indem Mutationen sowohl an Pseudoazurin als auch an der Nitritreduktase aus *A. faecalis* S-6 durchgeführt wurden (Kukimoto *et al.*, 1994; Kukimoto *et al.*, 1995).

2.2.6. Mutagenese

2.2.6.1. Ortspezifische Mutagenese

Ortspezifische Mutagenese hat gezeigt, dass sie eine sehr hilfreiche Technik ist, um ein breites Spektrum von Eigenschaften der Typ 1-Kupferzentren zu untersuchen. Die durch-

geführten Mutationen an Pseudoazurin und dessen Interaktionspartner der Nitritreduktase dienen als ein gutes Beispiel. Dabei ging es um Mutationen, welche die Regionen betrafen, wo vermutlich der Elektronentransfer stattfindet. Es wurde herausgefunden, dass das Ersetzen von basischen Lysin-Resten nahe dem Kupferzentrum im Pseudoazurin durch Aminosäuren mit neutralen/sauren (Alanin/Aspartat) Seitenketten zu einer Erniedrigung der Affinität dieses Protein für die Nitritreduktase führt. Das deutet darauf hin, dass Pseudoazurin über seine hydrophobe Region mit dessen Bindungspartner interagiert (Kukimoto *et al.*, 1995).

Auch die Rolle von Trp144 und Tyr233 nahe des Typ 1-Kupferzentrums der Nitrit-Reduktase (enthält 2 unterschiedliche Typen von Kupferzentren: Typ 1 nimmt ein Elektron aus einem externen Elektronen-*carrier* auf, während Typ 2 das reduzierte Elektron aus Typ 1 übernimmt und gleichzeitig das Reduktionszentrum für NO_2^- ist) von *A. cycloclastes* wurden mittels Mutationen untersucht. Einzelne Mutationen an diesen Resten durch Ersetzen mit Leucin hat eine Abnahme der Geschwindigkeitskonstante des intermolekularen Elektronentransfers von seinem Redoxpartner Pseudoazurin zur Folge (Yamaguchi *et al.*, 2005). Die hydrophobe Region der Nitritreduktase ist von vielen negativ geladenen Resten umgeben (Glu, Asp), welche elektrostatisch mit den positiv geladenen Lysin-Resten von Pseudoazurin interagieren.

2.2.6.2. Loop-gerichtete Mutagenese

Loop-gerichtete Mutagenese wurde auch für Untersuchungen an den Typ 1-Kupferzentren verwendet. Viele Metallzentren in Proteinen sind aus Loop-Regionen zusammengesetzt wie im Fall von Typ 1-Kupferzentren, deren Architektur einerseits drei Liganden auf einem Loop, welcher die β -Stränge 7 und 8 verbindet, involviert (siehe Abbildung 7 und Tabelle 1) und andererseits den vierten koordinierenden Rest auf dem Loop, welcher die β -Stränge 3 und 4 verbindet.

In einigen Fällen können biologische Metallzentren modelliert werden, indem Loops allein benutzt werden (Gibney *et al.*, 1996; Mulholland *et al.*, 1998), aber das ist in vielen Fällen einschließlich der Cupredoxine nicht möglich (Daugherty *et al.*, 2002). Der Loop muss gewöhnlich in eine stabile Struktur eingepflanzt werden.

Protein	Sequenz der C-terminalen Kupferbindungsloops										
AMI	Cys	Thr		Pro		His	Pro			Phe	Met
PC	Cys	Ser		Pro		His	Gln	Gly	Ala	Gly	Met
PAZ	Cys	Thr		Pro		His	Tyr	Gly	Met	Gly	Met
AZU	Cys	Thr	Phe	Pro	Gly	His	Ser		Ala	Leu	Met
RST	Cys	Gln	Ile	Pro	Gly	His	Ala	Ala	Thr	Gly	Met

Tabelle 1: Alignment der Aminosäuresequenzen von C-terminalen Kupferbindungsloops einiger Cupredoxinen mit den koordinierenden Resten fett gedrückt.

Loop-gerichtete Mutagenese kann benutzt werden, aktive Zentren in Proteingerüste einzupflanzen (Lu *et al.*, 2001). Die Cupredoxine besitzen eine rigide β -Barrel-Struktur, welche ein ideales Gerüst für *Protein-engineering*-Studien ist. Loop-Verlängerungs-Mutagenese wurde benutzt, um das Typ 1-Kupferzentrum (Dennison *et al.*, 1996; Buning *et al.*, 2000; Remenyi *et al.*, 2001) zu modifizieren und ein zweikerniges Cu_A -Zentrum einzufügen (Dennison *et al.*, 1995; Hay *et al.*, 1996).

Im Gegensatz dazu konnten Loop-Verkürzungs-Mutagenesen auch durchgeführt werden. Die Loops von Pseudoazurin (PAZ), Plastocyanin (PC) und Azurin (AZ) wurden durch die kurze Sequenz von Amicyanin (AMI) (siehe Abbildung.7) ersetzt (Yanagisawa und Dennison 2003; Yanagisawa und Dennison 2004). In allen diesen Fällen haben diese Mutationen einen begrenzten Effekt auf die spektroskopischen Eigenschaften (siehe Abbildung 22) und es wurde daraus geschlossen, dass ihr Einfluss auf die Geometrie der Kupferzentren dieser Loop-Varianten gering ist. Phe114, dessen Hauptketten-NH die zweite Wasserstoffbrückenbindung mit dem Thiolat des Schwefelligandes von Cys112 in AZ bildet, wird durch Pro114 in AZAMI ersetzt und so geht diese Interaktion verloren (wie auch in AMI, PAZ und PC).

Die Änderungen (Yanagisawa und Dennison 2004) im UV/Vis-Spektrum (siehe Abbildung 22) und EPR-Spektrum von Cu(II)-AZAMI verglichen mit AZ können der fehlenden Wasserstoffbrückenbindung zugeschrieben werden (Adman, 1991). Die Anwesenheit von nur einer einzelnen Wasserstoffbrückenbindung zu dem Cystein erhöht die Elektronendichte auf dem Schwefel des Thiolats und führt zu einer zunehmenden Spin-Dichte auf dem axialen Methionin-Liganden.

Loop-Verkürzungen führen immer zu einer Abnahme des E_m [*midpoint oxidation-reduction potential* (bei neutralem pH-Wert)] und das Ausmaß von diesem Effekt dehnt sich von ~ 30

mV im AZAMI bis ~60 mV in PCAMI (Yanagisawa und Dennison, 2004) aus. AMI hat den niedrigsten E_m von allen benutzten Wildtyp-Cupredoxinen und deshalb führt das Einführen seines C-terminalen Loops, welcher das aktive Zentrum umfasst, in PAZ, PC und AZ zu einem E_m , welcher ähnlicher zu dem von AMI ist.

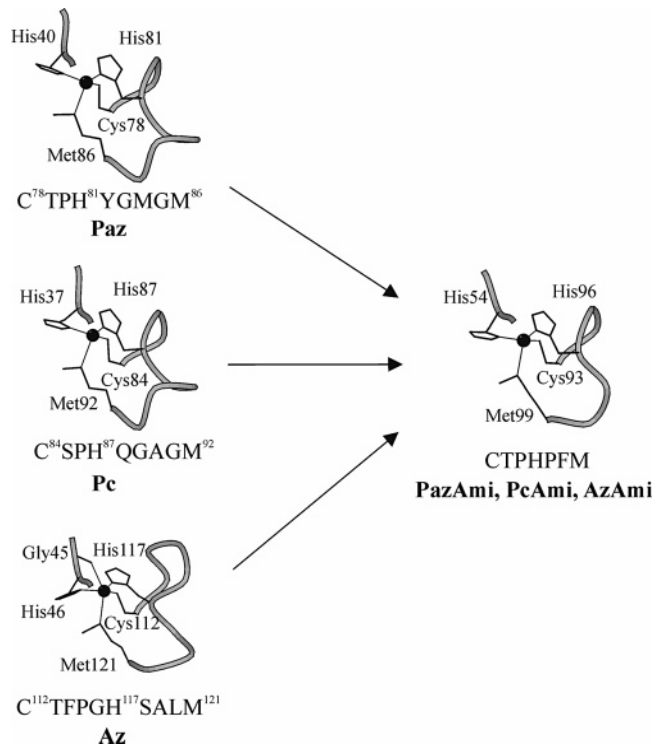


Abb. 7: Die aktiven Strukturzentren von *A. cycloclastes* PAZ (Inoue *et al.*, 1999), Spinat PC (Xue *et al.*, 1998), *P. aeruginosa* AZ (Nar *et al.*, 1991; Crane *et al.*, 2001) und *P. versutus* AMI (Romero *et al.*, 1994). Die Sequenzen der C-terminalen Loops der aktiven Zentren sind gezeigt und zeigen die Loop-Verkürzungen-Mutationen, welche an PAZ, PC und AZ gemacht wurden, um PAZAMI, PCAMI und AZAMI zu erzeugen (entnommen aus Dennison 2005).

2.2.7. Ziel der Arbeit

Metallbindende Zentren in Proteinen sind gewöhnlich aus Loop-Regionen zusammengesetzt. Durch Benutzung Loop-gerichteter Mutagenese (*loop directed mutagenesis*) können aktive Zentren in ein spezielles Proteingerüst eingefügt werden. Cupredoxine besitzen eine rigide β -Barrel-Struktur, welche ein ideales Gerüst für technische Proteinstudien ist. Diese Proteine bieten daher ein passendes System, um die Bedeutung der Loop-Länge und Loop-Struktur bei der Integrität des aktiven Zentrums eines Metalloproteins, zu untersuchen.

Die Folgen des Einführens des kürzesten C-terminalen Typ 1-Kupferbindungsloop [der mit der Sequenz CTPHPFM von Amicyanin (AMI)] in die β -Barrel-Gerüste von Pseudoazurin (PAZ), mit längeren natürlichen vorkommenden aktiven Zentrum-Loop wird kristallographisch untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Riedel-Haen (Seelze), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Aldrich (Steinheim) und Callbiochem bezogen und besaßen den Reinheitsgrad „zur Analyse“.

3.1.2. Laborgeräte

PCR-Thermocycler	Stratagene (La Jolla, CA USA), Robocycler Gradient 96
Äkta Explorer	Amersham Biosciences (Freiburg)
Äkta Purifier	Amersham Biosciences (Freiburg)
Autoklav	Tuttnauer Systec (Wettenberg), 5075 ELV Tuttnauer Systec (Wettenberg), 2540 EL
Blot-Apparatur	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Brutschrank	Heraeus (Hanau), B5042
Elektroporator	Stratagene (Heidelberg), Elektroporator 1000
Feinwaage	Satorius (Göttingen), BP 211D
FPLC-Chromatographie-Säulen	Amersham Pharmacia (Freiburg)
FPLC-Systeme	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Homogenisator	IKA-Werke (Staufen), Ultra-Turray T25 basic
Magnetrührer	IKA-Werke (Staufen), RET
pH-Meter	Mettler Toledo (Giessen), MP220 mit Elektrode In Lab 410
Schlauchpumpe	Amersham Pharmacia (Freiburg), LKB T-1
Schüttelinkubator	Braun (Melsungen), HAT
SMART-System	Amersham Pharmacia (Freiburg)

Sonifier	Branson Ultrasonics (Danbury, USA), W250
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg), compact Eppendorf (Hamburg), comfort
UV/VIS-Spektrometer	Beckmann (München), DU-7500 Perkin Elmer (Wellesley, USA), PE Lambda 17
Zentrifugen	Eppendorf (Hamburg), 5415R Eppendorf (Hamburg), 5804R Beckmann (München), J-6M/E Beckmann (München), Avanti TM
Waage	Mettler Toledo (Giessen), PE3600
UV-Transilluminator	Stratagene (La Jolla, CA USA), Eagle eye II

3.1.3. Kristallographie

Drehanodengenerator	Rigaku (Kemsing Sevenoaks, Großbritannien), RU200
Detektor	Mar Research (Hamburg), Mar345mm Mar Research (Hamburg), MarCCD
Kristallisationsplatten	Charles Supper Company (Natick, MA USA), CrysChem Greiner Bioone (Frickenhausen), 96-Well VDX Greased Plates (Hampton Research), 24-Well
Cryoanlage	Oxford Cryosystems Ltd. (Oxford, Großbritannien)
Kristallisationsroboter	Beckmann (München), Biomek 1000 Zinsser Analytic GmbH (Frankfurt), Cartesian
Lichtmikroskop	Leica (Wetzlar), MZ12 _s Leica (Wetzlar), MZ12
Goniometerkopf	Huber Diffractionstechnik (Rimsting)

Verwendete kommerzielle Kristallisations-Screens stammten von den Firmen Hampton Research (Laguna Hills, USA), Emerald BioStructures (Bainbridge Island, USA), Nextal (Montreal, Kanada), Jena Biosciences (Jena), und Sigma Aldrich (München).

3.1.4. Chromatographiematerialien

Alle verwendeten Chromatographiematerialien stammten von der Firma Amersham Biosciences (Little Chalford, USA)

GST-Sepharose	Zur Aufreinigung von an Gluthation-S-Transferase gekoppelten Proteinen
Q-Sepharose-Fast-Flow	starke Anionenaustauscher
CM-Sepharose	schwache Kationenaustauscher
Superdex™ 200	Gelfiltration
Superdex 75	Gelfiltration

3.1.5. Bakterienstämme, Plasmide und DNA-Oligonukleotide

Bakterienstämme

Sämtliche molekularbiologischen Arbeiten sowie die heterologe Expression rekombinanter Proteine wurden in folgenden Derivaten des *E. coli* Stammes K12 durchgeführt:

<i>E. coli</i> DH5 α	(Invitrogen, GmbH Karlsruhe)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)RP	(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA)
<i>E. coli</i> Rosetta™ DE3	(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA)
<i>E. coli</i> BL21Star(DE3)StarpLysS	(Invitrogen, GmbH Karlsruhe)

Plasmide

Das Plasmid pCMV-SPORT6 mit der MyD88-Gensequenz aus humanem Pankreasgewebe wurde vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) erworben. Dieses Plasmid diente als Ausgangsplasmid für weitere Klonierungen.

Die humane MyD88-cDNA wurde über *Bam* HI und *Sall* Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences) kloniert. Dadurch wird die MyD88-DNA an die DNA-Sequenz der Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelt, die bereits auf dem Vektor vorhanden ist. Diese kodiert für ein 26 kDa großes Protein aus *Schistosoma japonicum*,

welches mit dem zu exprimierenden Protein N-terminal fusioniert wird. Bei der Expression kommt es somit zur Bildung eines Fusionsproteins aus MyD88 (33,2 kDa) und GST, welches mit einer TEV(*tobacco etch virus*)-Protease nach der Proteinexpression gespalten werden kann. Die TEV-Erkennungssequenz wurde mittels PCR vor der MyD88-Gensequenz eingefügt.

Das Plasmid pTrcPAZAMI abgeleitet aus dem pTrc99A-Vektor wurde freundlicherweise von Dr. Christian Dennison (University of Newcastle upon Tyne) zur Verfügung gestellt. Dieses Plasmid enthält das Gen von Pseudoazurin aus *Achromobacter cycloclastes* in einer mutierten Form und wurde deswegen in PAZAMI umbenannt.

Der Loop, welcher die Aminosäuren His81 bis Met86 in Pseudoazurin aus *Achromobacter cycloclastes* umfasst, wurde durch die Sequenz His-Pro-Phe-Met, welche in Amicyanin von *Paracoccus versutus* gefunden wird, durch Benutzung des QuickChange-Mutagenesis-Kits (Stratagene) ersetzt. Die Mutation wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

DNA-Oligonukleotide

Sämtliche DNA-Oligomere wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Medigenomix (Martinsried) durchgeführt.

Tabelle 2: Liste der verwendeten DNA-Oligomere

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
MyD-fwd-PG	TAATGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCA TGGCTGCAGGAGGTCCC	Klonierung von MyD88
MyD-rev-PG	TAATGTCGACTCAGGGCAGGGACAAGGCCTTG	Klonierung von MyD88
pGEX4-fwd	GGC AAG CCA CGT TTG GTG	Sequenzierung des MyD88-Gens
pGEX4-rev	GAG CTG CAT GTG TCA GAG G	Sequenzierung des MyD88-Gens

- BamHI Restriktionsschnittstelle
- TEV-Protease-Erkennungsstelle
- Sall-Restriktionsschnittstelle
- Humane MyD88-Gensequenz

3.2. Molekularbiologische Methoden

Für sämtliche molekularbiologischen und proteinchemischen Arbeiten wurden autoklavierte bzw. steril filtrierte (Porendurchmesser der Membran: 0,22 µm) Medien und Lösungen sowie autoklavierte Pipettenspitzen verwendet. Puffer wurden im Wasserstrahlvakuum entgast. Laborhandschuhe wurden stets getragen.

3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in einem Thermocycler der Firma Stratagene durchgeführt. Mit Hilfe der PCR lässt sich ein DNA-Abschnitt vervielfältigen, der von bekannten DNA-Sequenzen begrenzt wird (Mullis *et al.*, 1986, Saiki *et al.*, 1988). Diese bekannten DNA-Sequenzen sind Oligonukleotidprimer, die gegenläufig an komplementären DNA-Strängen gebunden sind. Die Reaktion basiert auf einer zyklischen Wiederholung von drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation.

Tabelle 3: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes

Zugabe	Volumen	Konzentration (Stocklösung)
10x high fidelity buffer	2,5 µl	10x mit 25 mM Mg ²⁺
forward primer	2,0 µl	50 pmol/µl
reverse primer	2,0 µl	50 pmol/µl
dNTP-Mix (von Bioline)	2,0 µl	2,5 mM/dNTP
H ₂ O (steril)	14,5 µl	
DNA Template	1,0 µl	100-150 ng/µl
Triple Master DNA-Polymerase	1,0 µl	5 U/µl

Tabelle 4: PCR-Bedingungen im Themocycler

	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
Denaturierung	180 s	94°C	1
Denaturierung	60 s	94°C	35
Annealing	45 s	70°C	
Elongation	180 s	72°C	
Abkühlung		4°C	

3.2.2. Präparation Plasmid-DNA

Die Isolierung qualitativ hochwertiger DNA aus Bakterienkulturen, die für Sequenzierungen eingesetzt werden kann, wurde nach dem Protokoll des „QIAprep[®] Spin Kit“ der Firma QIAGEN (Hilden) unter Verwendung der im Kit enthaltenen Puffer durchgeführt. Die Methode beinhaltet eine Lyse der Bakterien unter alkalischen Bedingungen (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) und die anschließende Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine aus Silika-Gel bestehende Säule. Die Plasmid-DNA wurde aus der Säule mit destilliertem H₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen für sie spezifische kurze DNA-Sequenzmotive von 4 bis ungefähr 10 bp (meist 6). Der DNA-Strang wird innerhalb des Erkennungsmotivs oder in einem Abstand von einigen bp hydrolytisch gespalten, wobei die Schnittstelle je nach Spezifität der Endonuklease glatt oder versetzt sein kann.

Der DNA-Verdau wurde nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs) durchgeführt. Für den Doppelverdau wurden in der Regel unter Verwendung des empfohlenen Puffers beide Enzyme zugleich eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug mindestens 2 h und sie wurde anschließend durch Auftrennung der Reaktionsprodukte auf einem Agarosegel gestoppt.

3.2.4. Agarosegelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte in Agarosegelen. Zur Herstellung eines Agarosegels können je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente unterschiedliche Prozente an Agarose verwendet werden (so eignen sich zum Beispiel 1% (w/v) Agarosegele für einen Deckungsbereich von 0,5 bis zu 10 kbp). In dieser Arbeit wurde 1% Agar in 0,5x TAE durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst und nach 2-3 min in die horizontale Gelkammer gegossen. Ethidiumbromid wurde dann zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugegeben und mit der Agaroselösung gemischt. Nach dem Erstarren und Entfernung des Kammes wurde das Gel mit 0,5x TAE

überschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 8V/cm durchgeführt.

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) detektiert und ihre Länge mit Hilfe von DNA-Längenstandards (1 kb DNA Ladder von Fermentas) ermittelt.

Tabelle 5: Verwendete Materialien für die DNA-Analyse

0,5x TAE		6x Probenpuffer	
Tris/ HCl	20 mM	Glycerin	30% v/v
Essigssäure	10 mM	Bromphenolblau	25% w/v
EDTA	0,5 mM	destilliertes H ₂ O	45% v/v
	pH 8,0		

3.2.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen und DNA Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Isolierung wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in ein steriles Eppendorf-Gefäß gegeben und mit dem QIAquick Gel Extraktions-Kit von Qiagen gereinigt. Die Quantifizierung der DNA erfolgte photometrisch, wobei man sich die Absorption (A) der Purin- und Pyrimidin-Basen im Bereich von 260 nm zunutze machte. Es wurde angenommen, dass $A_{260\text{nm}} = 1$ einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ entspricht. Der Quotient $A_{260/280}$ sollte bei reiner DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2.6. Ligation von DNA Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Fragmente nach Spaltung durch Restriktionsenzyme erfordert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden durch die T4-DNA-Ligase. Dabei werden sowohl kohäsive als auch glatte Enden miteinander verknüpft.

In einem Ligationsansatz wurden geschnittener Vektor und die Insert-DNA in einem Verhältnis 1:4 gemischt und über Nacht bei 4°C mit der T4-DNA-Ligase inkubiert.

Zur Transformation elektrokompetenter Bakterien wurden 5-8 μl des Ligationsansatzes verwendet.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Ligationsansatzes

150-300 ng Vektor DNA
x g <i>insert</i> DNA
2 µl 10x Ligationspuffer (NEB)
1 µl T4 DNA-Ligase (NEB)
ad 20 µl ddH ₂ O

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1. Herstellung von Nährmedien

Als Wachstumsmedium für die Bakterien wurde LB (Luria Broth) verwendet. Vor Benutzung wurde es bei 121°C, 20 min bei 1 bar Druck autoklaviert. Hitzelabile Antibiotika-Stocklösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur Verbrauch bei -20° aufbewahrt. Waschpuffer wurden autoklaviert und bei 4°C gestellt.

Tabelle 7: Verwendete Lösungen für das Bakterienwachstum

LB-Medium	SOB-Medium	Waschpuffer
10 g NaCl	0,584 g NaCl	10% Glycerol (v/v)
10 g Bacto-Trypton	20 g Bacto-Trypton	90% H ₂ O (v/v)
5 g Hefeextrakt	5 g Hefeextrakt	
ad 1 Liter dest. H ₂ O	0,186 g KCl	
	ad 1 Liter dest. H ₂ O	

Tabelle 8: Konzentrationen der verwendeten Antibiotika und anderer Medienzusätze

Substanz	Lösungsmittel	Stocklösung Konzentration (mg/ml)
Ampicillin	H ₂ O	100
Kanamycin	H ₂ O	25
Chloramphenicol	Ethanol	34
IPTG	H ₂ O	239
Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	H ₂ O	187

3.3.2. Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die Herstellung von elektrokompenten Zellen wurden zunächst *E. coli*-Kulturen auf LB-Agar-Platten (gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt) ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurden 50 ml SOB-Medium mit einer einzelnen *E.coli*-Kolonie am Abend angeimpft (180 U/min, 37°C). Am nächsten Tag nach Abzentrifugation der gewachsenen Zellen (10 min, 5000 U/min) wurde das Pellet mit frischem SOB-Medium resuspendiert und aus zwei Erlenmeyerkolben mit frischem SOB-Medium (jeweils 1L) eine Hauptkultur hergestellt. Man ließ die Zellen bis zu einer $OD_{550} = 0,8$ wachsen, um sie anschließend durch Zentrifugation zu ernten (4°C, 5000 U/min, 20 min). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen mit jeweils 2L kaltem Waschpuffer in mehreren Zentrifugationsschritten zur Entfernung von Kulturmediengeresten und Salz gewaschen. Nach Aliquotierung und Schockfrieren in flüssigem Stickstoff wurden sie bei -80°C gelagert.

3.3.3. Transformation mittels Elektroporation

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode zum Transfer von DNA in Bakterienzellen. Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass kurze Hochspannungspulse „Löcher“ in der Zellhülle verursachen, durch welche dann exogene DNA in die Zelle aufgenommen werden kann. Dazu wurde ein Aliquot elektrokompenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 µl der entsprechenden Plasmidlösung gemischt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1650V. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen, eine Stunde bei 37°C inkubiert, auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.3.4. Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

3.3.4.1. Expression von humanem MyD88-GST-Fusionsprotein

Bevor mit großen Proteinexpressionen gestartet wurde, suchte man zuerst nach den idealen Bedingungen für eine große Proteinausbeute. Die Expression wurde zunächst im kleinen Maßstab (100 ml LB-Medium) optimiert, wobei folgende Parameter variiert wurden: *E. coli*-Stamm, IPTG-Konzentration (0,05 – 1 mM), Induktionszeitpunkt ($OD_{600} = 0,6 - 1,5$), Temperatur (16°C - 37°C), Schüttelintensität (Sauerstoffversorgung) und Wachstumsdauer. Nach einer großen Expression wurden die Zellen abzentrifugiert, in wenig Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zur Proteinreinigung gelagert.

3.3.4.2 Expression von PAZAMI

Für die Expression von PAZAMI wurde dem Wachstumsmedium gleich nach der Induktion $Cu(NO_3)_2$ zu einer Endkonzentration von 500 μM zugegeben (es wurde beobachtet, dass bei Zugabe von Kupfer mehr Proteinausbeute erzielt wurde). Die Induktion erfolgte mit 0,1 mM IPTG und erstreckte sich über 5 Stunden bei 37°C. Das Protein wurde periplasmatisch exprimiert, da es eine Signalsequenz enthält, welche seine Sekretion ins Periplasma bewirkt, wo es im Gegensatz zum Zytoplasma oxidierende Bedingungen herrschen.

3.4. Proteinanalytische Methoden

3.4.1. SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe des Detergenz SDS werden Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen zerstört und diesen entsprechend ihrer Peptidkettenlänge eine äquivalente negative Ladung angelagert. Diese negative Ladung ermöglicht die Auftrennung von Proteinen annähernd entsprechend ihrer molekularen Masse im Polyacrylamidgel. In der vorliegenden Arbeit wurden 10 und 15%ige Polyacrylamidgele mit 6% Sammelgel benutzt. Die Proben wurden durch Mischen mit 2x Auftragspuffer und Erhitzen auf 95°C (5 min) denaturiert und zusammen mit 8 µl *Low- bzw. High-molecular-weight-Sigma marker* auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 30 mA. Zur Färbung wurden die Gele in Färbelösung gelegt (siehe Tabelle 9), kurz in der Mikrowelle erhitzt und 30 min geschüttelt. Mit der Entfärberlösung (siehe Tabelle 9) wurde das nicht an Proteine gebundene Coomassie entfernt. Es wurde so lange entfärbt, bis der Hintergrund des Gels farblos war. Anschließend wurde das gefärbte Gel dokumentiert.

Tabelle 9: Materialien für die Herstellung und die Durchführung der SDS-PAGE

Trenngel (10 ml)			Sammelgel (5 ml)	
	<i>10%</i>	<i>15%</i>		<i>6%</i>
H ₂ O	4,0 ml	2,3 ml	H ₂ O	3,7 ml
30% Acrylamid	3,3 ml	5,0 ml	30% Acrylamid	1,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 M Tris (pH 6,8)	0,25 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	10% SDS	0,05 ml
10% APS	0,1 ml	0,1 ml	10% APS	0,05 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	TEMED	0,02 ml
			Pyronin G	
10x SDS-Laufpuffer			Auftragspuffer 2x	
SDS	10 g		1,5 M Tris (pH 6,8)	10 ml
Tris	30,3 g		20% SDS	6,0 ml
Glycin	144,1 g		Glycerin	30 ml
	ad 1 Liter dest. H ₂ O		β-Mercaptoethanol	15 ml
			Bromphenolblau	1,8 mg
				ad 100 ml dest. H ₂ O

Tabelle 10: Lösungen für das Hantieren mit SDS-Gelen

Coomassie Färbelösung		Entfärberlösung	
Coomassie Brilliant Blue G-250	2,5 g	Ethanol	450 ml
Ethanol	450 ml	Essigsäure	100 ml
Essigsäure	100 ml	H ₂ O	400 ml
	ad 1 Liter H ₂ O		ad 1 Liter H ₂ O

3.4.2. Western blot und Edman-Sequenzierung

Für die N-terminale Aminosäuresequenzierung von Proteinen wurden die aufgetrennten Proteine nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in einer *Semi Dry Blot*-Apparatur auf eine PVDF-Membran (0,45 µm Porendurchmesser, Millipore, Eschborn) übertragen. Dazu wurden Gel und Membran luftfrei zwischen Whatman-Filterpapier (3MM, Whatman, Maidstone, England), das zuvor in Transferpuffer (20% v/v Methanol, 80% v/v 1x SDS) getränkt worden waren, gelegt und in der Blotting-Apparatur über 1,5 h bei einem Stromfluss von 10V auf die Membran übertragen. Die Membran wurde kurz in Membranfärbelösung (50% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Coomassie Brillant Blue G-250) gefärbt und dann 5 min in Membranentfärberlösung (30% Methanol, 7% Essigsäure) entfärbt.

Nach der Methode des EDMAN-Abbaus (Edman und Henschen, 1975) wurde die N-terminale Aminosäure mit Phenylisothiocyanat umgesetzt. Durch schwach saure Bedingungen wurde die N-terminale Aminosäure abgespalten, die sich schließlich in eine Phenylthiohydantoin-Aminosäure umlagerte. Nach einer HPLC-Auftrennung wurde die Aminosäure durch Vergleich mit einem getrennten Standard-Aminosäuregemisch identifiziert. Die Proteinsequenzierungen wurden freundlicherweise von Herrn Reinhard Mentele (Abteilung Proteinanalytik) am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt

3.4.3. MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Das MALDI-Prinzip zeichnet sich durch den Einbau von Probenmolekülen in Kristalle einer Matrixsubstanz mit hohem UV-Absorptionsvermögen aus. Mit einem gepulsten Laserstrahl wird das Proben-Matrix-Gemisch gezielt beschossen. Es folgt ein positives Aufladen der Probenmoleküle (Ionisierung) durch die Protonenübertragung von der sauren UV-absorbierenden Matrixsubstanz auf die Probenmoleküle. Die geladenen Ionen bzw. Proben-

moleküle liegen nachfolgend in der Gasphase des Hochvakuums des Massenanalysators vor. Nach der Beschleunigung der Ionen in einem elektrischen Feld durchfliegen diese eine feldfreie Driftstrecke bis zum Detektor, wo ihr Auftreffen registriert wird. Die für die Flugstrecke erforderliche Zeit ist dabei abhängig von der Masse und Ladung der entsprechenden Ionen. Durch Eichung des Geräts mit Molekülen bekannter Masse kann die Masse der Probenmoleküle dann über ihre Flugzeit mittels eines Flugzeitanalysators (TOF: *time of flight*) sehr genau bestimmt werden.

Die Ermittlung des Molekulargewichts von gereinigtem Protein wurde freundlicherweise von Frau Elisabeth Weyher-Stingl (Abteilung Bioorganische Chemie) am Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt.

3.4.4. Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Unter CD versteht man die unterschiedliche Absorption von rechts und links circular polarisiertem Licht durch eine Probe. CD wird bei der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit chiralen Molekülen beobachtet (H.-J.Galla, 1988). Die hauptsächliche Ursache von Chiralität ist das Vorhandensein eines asymmetrischen Zentrums im Molekül (z.B. eines asymmetrischen also mit vier von einander verschiedenen Resten, substituierten, Kohlenstoffatoms). Der CD von Proteinen wird von den asymmetrischen Elementen im Bereich des Peptidrückgrats und von den aromatischen Aminosäuren hervorgerufen. Bei allen Aminosäuren mit Ausnahme von Glycin ist das der Peptidgruppe benachbarte C α -Atom asymmetrisch substituiert. Das führt zur Asymmetrie in der Elektronenkonfiguration der Peptidbindung und damit zur unterschiedlichen Absorption von rechts und links circular polarisiertem Licht durch diesen Chromophor. Die konkrete Elektronenkonfiguration der Peptidbindungen wird weiterhin ganz entscheidend von den Sekundärstrukturen bestimmt, die das Peptidrückgrat ausbilden. Das führt letztlich zu den spezifischen und im Wesentlichen von der Konformation der Proteine bestimmten CD-Spektren im Peptidbereich. Im CD-Spektrometer wird die Probenküvette mit zirkular polarisiertem Licht durchstrahlt, das mit einer Frequenz im kHz-Bereich die Polarisationsrichtung von rechts und links zirkular polarisiertem Licht ändert, wobei die Absorption der Probe mit einem Photomultiplier gemessen wird. Bei der CD-Spektroskopie von Proteinen lassen sich verschiedene Sekundärstrukturelemente durch charakteristische Spektren unterscheiden. Im Fern-UV-

Bereich absorbieren die π -Elektronen der Amidgruppen des Proteins (Johnson, 1990). In diesem Wellenlängenbereich können Unterschiede im Proteinrückgrat und somit in den Sekundärstrukturelementen detektiert werden. Aus den Spektren lässt sich näherungsweise durch Dekonvolutionsprogramme der Sekundärstrukturgehalt der gemessenen Proben berechnen.

Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-715 Spektropolarimeter aufgenommen. Bei Fern-UV-Spektren (260-200 nm) betrug die Proteinkonzentration 0,75 mg/ml in 30 mM NaCl/ 50 mM Tris-HCl, pH 7,5. Die Spektren wurden in einer Quarzküvette mit 0,1 cm Durchmesser bei Raumtemperatur aufgenommen.

3.4.5. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Absorption von Proteinen bei $\lambda = 280$ nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, in geringerem Maß auch Phenylalanin. Die Proteinkonzentration kann gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz: $A = \varepsilon \times c \times d$ (A = Absorption bei λ_{280} nm, ε = Extinktionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$], c = Proteinkonzentration [mg/ml], d = Schichtdicke der Küvette [cm]) berechnet werden. Die Extinktionskoeffizienten wurden mit dem Programm *ProtParam* berechnet (Wilkins *et al.*, 1999).

3.4.6. Analytische Gelfiltration

Mittels der analytischen Gelfiltration können das apparente Molekulargewicht und bei Kenntnis des theoretischen Molekulargewichts auch der Oligomerisierungszustand von Proteinen bestimmt werden. Dabei wird ausgenutzt, dass bei globulären Proteinen ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem Elutionsvolumen besteht. Bei einem Protein unbekanntem Molekulargewichts oder Oligomerisierungszustands kann daher durch Vergleich des Elutionsvolumens mit dem Elutionsvolumen von Standardproteinen das apparente Molekulargewicht ermittelt werden. Für humanes MyD88 erfolgten die analytischen Messungen mit einer Superdex 200 PC 3.2 Säule auf einem SMARTTM FPLC-System (Pharmacia) bei Raumtemperatur. Das Protein befand sich in einem 1x PBS-Puffer und lief mit einer Flussrate von 80 μ l/min.

In Gegensatz zu MyD88 wurde PAZAMI in einem Äkta-Explorer-System analysiert. Die Gelfiltration wurde mit einer SuperdexTM200 durchgeführt. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min mit 50 mM Tris/HCl, 30 mM NaCl, pH 7,5 als Laufpuffer.

3.4.7. Konzentrierungen von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mittels Ultrafiltration. Dazu wurden spezielle Einweggefäße mit einer integrierten Ultrafiltrationsmembran aus regenerierter Cellulose mit niedriger Bindungsfähigkeit der Firma Millipore, Schwalbach (Centricon, Centriprep, Amicon Ultra und Amicon Ultrafree-MC) sowie Konzentratoren mit einer Polyethersulfon Membran der Firma Vivascience, Hannover (Vivaspin 500) verwendet.

3.5. Proteinreinigung

3.5.1. Zellaufschluss für die Reinigung von MyD88-GST

Die gefrorenen *E. coli*-Zellen eines 15L-Ansatzes, welche sich in 150 ml 1x PBS befanden, wurden mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und im lauwarmen Wasserbad langsam aufgetaut. Zur Vermeidung proteolytischer Degradation wurden der Zellsuspension *Complete Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche Diagnostics, Mannheim), 2 mM EDTA und 1% Triton X-100 zugegeben. Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese in ein Rosettengefäß überführt und in Eiswasser durch Sonifizierung (5 x 3 min) mit der Ultraschallsonde (*Macrotip, output control: 10, puls: 80%*) aufgeschlossen. Die Abtrennung der Zelltrümmer und der nicht-aufgeschlossenen Zellen erfolgte durch Zentrifugation (25000 U/min, 45 min, 4°C).

3.5.2. Periplasmatischer Aufschluss der *E. coli*-Zellen mit PAZAMI

Die Zellen eines 15L-Ansatzes wurden nach der Proteinexpression durch Zentrifugation (4°C 5000 U/min, 10 min) pelletiert, vom Überstand getrennt und mit eiskaltem Aufschlusspuffer (siehe Tabelle 11) 1h unter Rotation bei 4°C resuspendiert. Da PAZAMI in den periplasmatischen Raum der *E. coli*-Zellen sezerniert wurde, wurden die Zellen nicht vollständig aufgeschlossen. Lediglich die Außenmembran der Zellen wurde aufgebrochen, um eine

Kontamination von PAZAMI mit zytoplasmatischen *E. coli*-Proteinen zu vermeiden. Das EDTA des Aufschlusspuffers (siehe Tabelle 10) komplexiert dabei die Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen der Zellwand, so dass sie labil und permeabel wird. Die entstandenen Sphäroblasten welche durch höhere Saccharose-Konzentrationen vor dem osmotisch bedingten Platzen geschützt sind, wurden durch Zentrifugation abgetrennt (5000 U/min, 4°C, 10 min). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt konnte der Überstand zur Reinigung verwendet werden (15000 U/min, 4°C, 20 min).

Tabelle 11: Verwendete Aufschlusspuffer

Periplasma- Aufschlusspuffer:		Aufschlusspuffer 1x PBS:	
Saccharose	20% v/v	NaCl	140 mM
Tris/ HCl	30 mM	KCl	2,7 mM
EDTA	1 mM	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	pH 8,0	KH ₂ PO ₄	
			pH 7,3

3.5.3. Reinigung von humanem MyD88-GST mittels Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie nutzt im Gegensatz zu anderen chromatographischen Verfahren der Proteinreinigung die spezifische und hochaffine Wechselwirkung zwischen Biomolekülen. Grundlage der Selektivität affinitätschromatographischer Trennungen ist die natürliche Spezifität immobilisierter Liganden, komplementäre Molekülstrukturen reversibel zu binden. Der Ligand, welcher an das chromatographische Trägermaterial gekoppelt ist, hat die Eigenschaft, das gesuchte Protein aus einem komplexen Gemisch heraus selektiv zu binden. Nach dem Herauswaschen von nichtbindenden Proteinen mit Pufferlösung kann das gebundene Protein kompetitiv durch Zugabe des Liganden in löslicher Form eluiert werden. In dieser Arbeit wurde für die Reinigung von MyD88-GST eine Affinitätschromatographie unter Verwendung von GST-Sepharose (Amersham Biosciences Uppsala, Schweden) durchgeführt. Dieses Material ist in der Lage, mit einem GST-tag fusionierte Proteine unter Ausbildung eines Komplexes an die Matrix (Sepharose) zu binden.

Die Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das zentrifugierte Zelllysate wurde auf die in PBS äquilibrierte Glutathion-Säule aufgetragen (Flussrate 1 ml/min, 20 ml Glutathion Sepharose 4 Fast Flow, Säulenkörper XK 26). Nach dem Beladen wurde die Säule dreimal mit 90 ml PBS gewaschen. Die Elution von den an der Sepharose gebundenen Fusionsproteinen erfolgte mit 20 ml Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8,0). Die gesammelten proteinhaltigen Fraktionen wurden nach einer Reinheitsprüfung durch ein 10%-SDS-Gel, vereint, aufkonzentriert und umgepuffert.

3.5.4. Reinigung von PAZAMI

Nach dem Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand einer Dialyse unterzogen. Diese wurde bei 4°C in einem Zeitraum von über 15 Stunden unter Rühren durchgeführt. Die Dialysemembran Spectra/Por (Spectrum Laboratories Inc Dominguez CA USA) wurde vor Benutzung mit bidestilliertem Wasser gewaschen. PAZAMI wurde gegen ein 50 faches Volumen an Dialysepuffer dialysiert [5 mM Tris/HCl, 500 µM Cu(NO₃)₂, pH 6,5]. Dann wurde das Dialysat bis zu einem Volumen von 50 ml mit Hilfe eines Amicon-Konzentrators eingengt. Dabei wurde PAZAMI teilweise präzipitiert, aber dies konnte vernachlässigt werden, da auch Schmutzproteine von *E. coli* mit ausgefallen waren.

PAZAMI wurde mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Hier werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrostatischen Wechselwirkungen mit einer entgegengesetzt geladenen Matrix voneinander getrennt. Die Stärke der Bindung des Proteins an einen Ionenaustauscher hängt von mehreren Faktoren ab, wie zum Beispiel dem isoelektrischen Punkt des Proteins, dem pH-Wert und der Ionenstärke des Puffers, der Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche und der Art des Ionenaustauschmaterials. Aufgrund der Anwesenheit von Kupfer im PAZAMI-Protein wurde ein schwacher Kationenaustauscher [CM(carboxymethyl)-Sepharose, 40 ml] für die Reinigung ausgewählt. Die Elution der an der Matrix gebundenen PAZAMI-Proteine erfolgte entweder durch eine Änderung des pH-Wertes oder durch eine Erhöhung der Ionenstärke der mobilen Phase.

3.5.5. Verdau von humanem MyD88-GST-Protein

Zur Abspaltung des GST aus MyD88 wurde das Fusionsprotein mit rekombinanter TEV-Protease inkubiert, die mit einer His₆-Markierung versehen war. 1,0 ml der MyD88-GST Elution [10 mg/ml] wurde mit 100 µl AcTEV-Protease (Invitrogen) versetzt. Die Spaltung wurde in der Regel bei 4°C mit 100 Einheiten (100U)/ mg Fusionsprotein durchgeführt, aber Versuche bei Raumtemperatur wurden auch unternommen.

3.6. Kristallographische Methoden

3.6.1. Kristallisationsgrundlage

Ein Kristall ist eine regelmäßige, diskontinuierliche Anordnung von Materie. Regelmäßig heißt hier, dass Materie sich in einer der 230 möglichen Raumgruppen zusammenfindet, die den mathematischen definierten Regeln von Gruppen gehorchen, diskontinuierlich, dass die Materie aus Atomen bzw. Molekülen aufgebaut ist, die zu einer definierten, nicht stetigen Verteilung von Elektronendichte im Kristall führen. Jede Messung diskreter Bragg-Reflexe setzt voraus, dass die zu untersuchende Substanz als Kristall ausreichender Größe und Qualität vorliegt. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Kristalle wurden ausnahmslos mit Gasdiffusionsmethoden erhalten. Es gibt aber auch andere verbreitete Verfahren zur Herstellung von Einkristallen. Eine erfolgreiche Kristallisation hängt im wesentlichen von drei Faktoren ab:

- der Homogenität der Probe
- der vorhandenen Gesamtmenge an Substanz
- der reproduzierbaren Zusammensetzung unterschiedlicher Aliquots

Die Erfahrung lehrt, dass Stoffe umso bereitwilliger kristallisieren, je reiner sie sind. Eine größere Substanzmenge ermöglicht es, viele optionale Kristallisationsbedingungen zu testen. Es zeigt sich, dass auch Stoffe, die nur in Spuren zugegen sind, für den Kristallisationsprozess im Besonderen bei der Kristallkeimbildung bedeutsam sein können.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit immer auf eine reproduzierbare Zusammensetzung der verwendeten Lösungen geachtet. Es kamen nur Chemikalien zur Anwendung, die auch für chemische Analysen geeignet sind (p.a.). Als Lösungsmittel wurde ausschließlich zweifach destilliertes Wasser verwendet.

3.6.2. Gasdiffusion (Ducruix *et al.*, 1992; Mikol *et al.*, 1990)

In einem geschlossenen System befinden sich zwei flüssige Phasen, die durch eine Gasphase voneinander getrennt sind. Die beiden flüssigen Phasen sind in der Regel wässrige Lösungen, die unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Stoffe enthalten, die Gasphase ist

üblicherweise Luft. Weisen die beiden flüssigen Phasen verschiedene chemische Potentiale auf, so ist ihr Dampfdruck unterschiedlich. Dies führt solange zum Transport flüchtiger Stoffe über die Gasphase, bis der Dampfdruck beider flüssiger Phasen gleich ist; das System ist äquilibriumiert. Wichtig für die Kristallisation von biologischen Makromolekülen ist die Überwindung der sogenannten Keimbildungsbarriere. Allgemein können sich Kristallisationskeime nur in übersättigten Lösungen bilden (Abb. 8). Dieser Bereich ist jedoch für das Wachstum des Kristalls sehr ungünstig, da hier bevorzugt viele kleine Kristalle entstehen. Für die Züchtung von großen Kristallen sollte die Lösung daher im metastabilen Bereich gehalten werden. Nur werden dort eben keine Kristallisationskeime gebildet. Zur Überwindung dieses Problems bedient man sich der Dampfdiffusionsmethode (*sitting-* oder *hanging drop*). Hierbei wird die Proteinlösung mit einer Mutterlösung, bestehend aus einem Fällungsmittel und diversen anderen Zusätzen, gemischt und in einem versiegelten Raum einem sehr viel größeren Reservoir derselben Mutterlösung gegenübergestellt. Aufgrund der geringeren Fällungsmittelkonzentration im Proteintröpfchen tritt ein Transport von Wassermolekülen in Richtung Reservoir ein. Die Fällungsmittelkonzentration im Tröpfchen nimmt zu und irgendwann wird die Keimbildungsbarriere überschritten. Es kommt nun zur Bildung von Kristallisationskeimen. Als Konsequenz daraus verringert sich die Proteinkonzentration im Tröpfchen und im Idealfall nähert sie sich dem metastabilen Bereich. In diesem Bereich entstehen keine neuen Kristalle mehr und die vorhandenen Kristallisationskeime können langsam weiterwachsen. Es entstehen wenige große Kristalle.

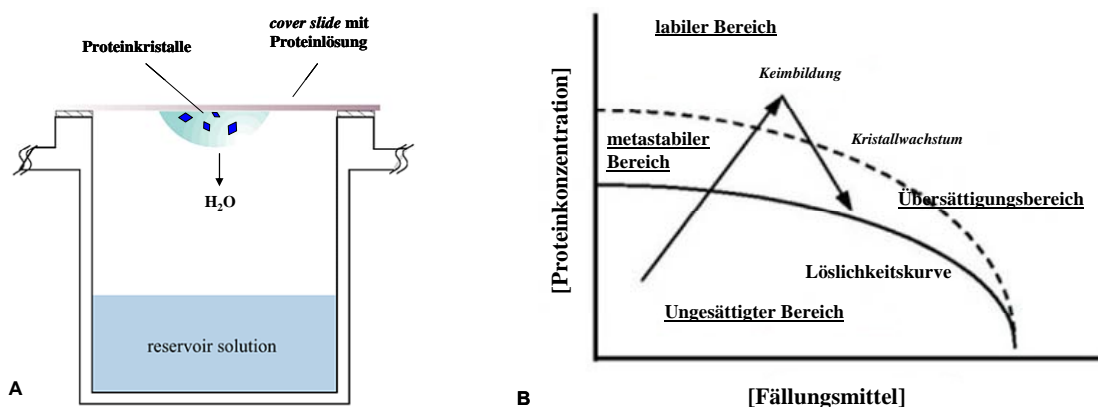


Abb. 8: (A) Schematische Darstellung der Hängetropfen-Methode. (B) Schematische Darstellung der Löslichkeitskurve eines Proteins

3.6.3. Kristallisationsarbeiten

In dieser Arbeit erfolgte die Anfertigung der Kristallisationsansätze nach der Dampfdiffusionsmethode in *hanging drop* unter Verwendung von 24-Kammer Kunststoffplatten (VDX) die mit Glasplättchen (*cover slides*, 22 mm) abgedichtet wurden.

Bei den Ansätzen betrug das Volumen der Reservoirlösung 300-400 μl , das der Tropfen 1-2 μl . Zum Auffinden initialer Kristallisationsbedingungen wurden nach dem Prinzip des *sparse matrix sampling* (Jancarik und Kim, 1991; Carter und Carter, 1979) eine Vielzahl unterschiedlicher Bedingungen getestet, die eine möglichst weit gestreute Variation von Puffer-substanzen, pH-Werten, Salzen und Präzipitantien umfasst. Der Kristallisationsverlauf wurde über mehrere Wochen hinweg bei 20°C verfolgt.

Die eingesetzte Proteinlösung bestand aus dem hoch konzentrierten Protein (25 mg/ml) und einem möglichst niedrig molaren Puffer, um die durch die Kristallisationsbedingung gegebene Zusammensetzung des Tropfens möglichst wenig zu beeinflussen.

3.6.4. Erzeugung von Röntgenstrahlung

Als Röntgenstrahlung werden elektromagnetische Wellen im Bereich von 10 bis 0,1 Å (1-120 keV) bezeichnet. Mit einer Glühkathode erzeugte Elektronen werden durch Hochspannung beschleunigt und treffen auf ein als Anode geschaltetes, hochreines Metall wie Kupfer. Um die Abnutzung der Anode zu minimieren, wird diese in Rotation versetzt. Beim Eintritt in das Anodenmaterial werden die Elektronen an den Elektronenhüllen des Metallgitters gebremst und ihre kinetische Energie geht in Gitterschwingung über. Von dieser Photonenenergie wird ein Teil als sogenannte Bremsstrahlung emittiert. Haben die freien Elektronen eine ausreichende Energie, um Elektronen eines Metallatoms zu promovieren, so treten im Spektrum der austretenden Röntgenstrahlung zusätzlich neben der kontinuierlichen Bremsstrahlung diskrete Strahlungsbereiche auf, deren Energien den beteiligten Elektronenübergängen entsprechen. Ein monochromatischer Teil dieser Strahlung (CuK α -Strahlung; $\lambda = 1,5418$ Å) kann mittels Beugung an Graphit-Einkristallen erhalten werden. Sie wird dann über einen Kollimator direkt auf den zu untersuchenden Proteinkristall gelenkt.

Die Tatsache, dass beschleunigte Elektronen Strahlung emittieren, kann auch in Synchrotronen (Teilchenbeschleunigern) ausgenutzt werden, wo eine Bremsstrahlung von deutlich höherer Intensität erzeugt werden kann.

In evakuierten Röhren werden Elektronen, aus technischen Gründen Positronen, auf einer Kreisbahn beschleunigt. Es können Geschwindigkeitsbeträge nahe der Lichtgeschwindigkeit erreicht werden. Hierbei werden die Teilchen mittels starker Magneten auf ihrer Bahn gehalten. Mit dieser Versuchsanordnung lassen sich Röntgenstrahlen wesentlich höherer Intensität und Brillanz erzeugen. Die Wellenlänge der Röntgenstrahlung ist hier eine Funktion der Beschleunigung und kann anders als in obigen Röntgengeneratoren relativ frei gewählt werden. Zusätzlich zu der Beschleunigung auf der Kreisbahn des Synchrotrons sind sogenannten *wiggler-* und *undulator beamlines* vorhanden. Hierbei passiert der Positronenstrahl eine Reihe abwechselnd als Nord- und Südpol geschalteter, starker Magneten. Dies führt zu weiterer Beschleunigung in Richtung der Magneten.

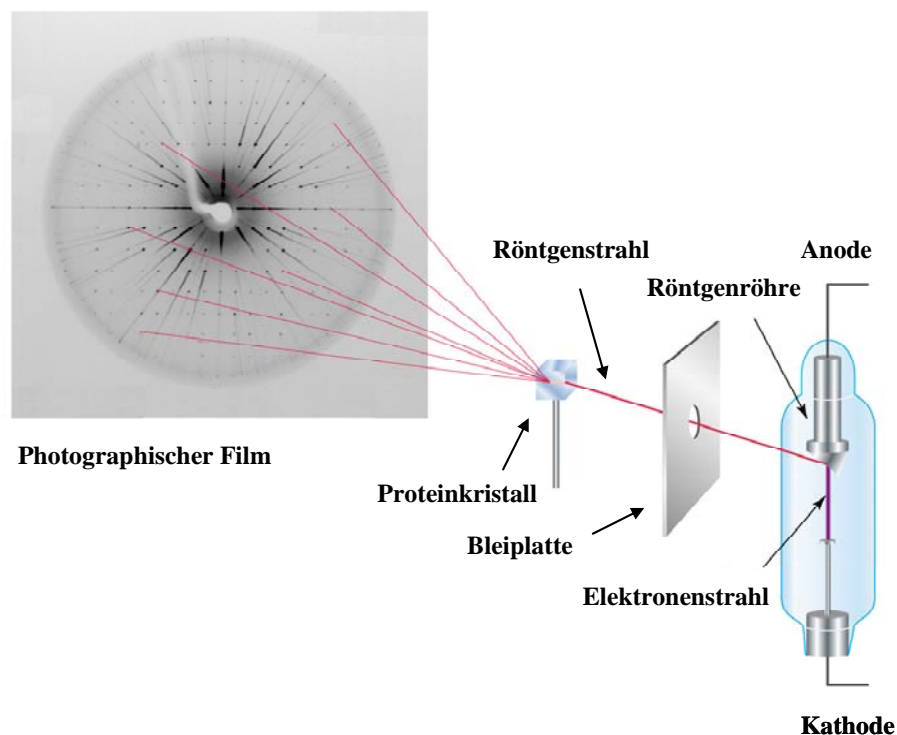


Abb. 9: Schematischer Aufbau einer Röntgenanlage.

Es ist der Strahlengang des Röntgenlichts von Röntgenröhre bis zum Detektor dargestellt.

3.6.5. Beugung von Röntgenstrahlen an Einkristallen

Röntgenstrahlen, die auf ein Kristallgitter aus Atomen bzw. Molekülen treffen, regen die Elektronen der im Gitter angeordneten Atome zu Schwingungen mit der Frequenz der einfallenden elektromagnetischen Welle an. Diese Elektronen senden dann ihrerseits elektromagnetische Strahlen derselben Frequenz aus. Die beobachtete Strahlung ist die Summe aller einzelnen von den Elektronen ausgesandten Wellen. In den meisten Richtungen summieren sich diese Wellen zu null. Nur in ausgezeichneten Richtungen kommt es zur positiven Interferenz, d.h., es entsteht eine von null verschiedene Streustrahlung. Solange die Energie der einfallenden Röntgenstrahlung nicht mit diskreten energetischen Übergängen innerhalb der Atome bzw. Moleküle übereinstimmt, was für die leichten Atome, wie Kohlenstoff, Stickstoff oder Sauerstoff immer gilt, kann man die beobachteten Streueffekte als Beugung an freien Elektronen behandeln.

Es gibt viele Wege, diesen Sachverhalt mathematisch zu beschreiben. In Analogie zur Beugung von sichtbarem Licht lässt sich die Bragg'sche Gleichung wie folgt formulieren:

$$2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} = n\lambda$$

Ihr liegt die Vorstellung der Spiegelung von Röntgenstrahlungen mit der Wellenlänge λ an Gitterebenen mit dem Abstand d unter dem Glanzwinkel θ zugrunde. Jeder Kristall enthält viele solche Gitterebenen, die mit den Miller'schen Indizes hkl bezeichnet werden. Hierbei schneidet die Ebene hkl die x-Achse in a/h , die y-Achse in b/k und die z-Achse in c/l . Index 0 heißt, dass die entsprechende Achse nicht geschnitten wird, d.h. die Gitterebene läuft parallel zur Achse. Positive Interferenz nur tritt dann auf, wenn der Gangunterschied ($2d \sin \theta$) ein Vielfaches der Wellenlänge ist. Aufgrund der sonst vernachlässigbaren Intensität werden im Folgenden nur die Interferenzen erster Ordnung ($n = 1$) betrachtet. Unter Berücksichtigung eines feststehenden Eingangstrahles und eines sich drehenden Kristalls, lassen sich die Richtungen der beobachtbaren gestreuten Strahlen ermitteln, wobei bei einer gegebenen Kristallorientierung sowohl d als auch θ von der Wahl der Gitterebene anhängen.

Eine wesentlich praktischere Methode zur Konstruktion der gestreuten Strahlen stellt die Anwendung des reziproken Gitters und der Ewald Kugel dar. Das reziproke Gitter ist ein

Gedankenkonzept, dass mit dem realen Kristallgitter wie folgt verbunden ist: Jedem Reflex hkl ist ein Punkt im reziproken Gitter mit den Indizes hkl zugeordnet. Jeder dieser Punkte bildet den Endpunkt des Vektors S , der senkrecht auf der Gitterebene hkl steht und die Länge $1/d_{hkl}$ hat. Es lässt sich entsprechend eine reziproke Zelle definieren. Sie besteht aus den Achsen a^* , b^* und c^* . Jede dieser reziproken Achsen (z.B. a^*) steht senkrecht auf der Ebene, die aus den beiden anderen realen Achsen (z.B. b und c) aufgespannt wird und hat als Länge den Reziprokwert der entsprechenden realen Achse (z.B. $1/a$). Die Punkte des reziproken Gitters lassen sich somit in Vektorschreibweise auch als $S = h a^* + k b^* + l c^*$ beschreiben.

Es lässt sich zeigen, dass in einer Konstruktion entsprechend Abb. 10 die oben beschriebene Bedingung zur konstruktiven Interferenz immer dann erfüllt ist, wenn ein Punkt des Reziproken Gitters die Ewald Kugel schneidet. Während sich das reziproke Gitter zusammen mit dem Kristall dreht, kommen die verschiedenen Punkte des reziproken Gitters in Streuposition. Der gestreute Strahl zeigt dann in Richtung des Vektors MP .

Diese Betrachtung zeigt eine weitere wichtige Charakteristik der Kristallographie. Die Punkte des reziproken Gitters und somit das Streubild eines Kristalls hängen nur von der Einheitszelle, aber nicht vom Inhalt der Zelle ab. Die Information über den Zelleninhalt, d.h. über das Protein, ist in den Intensitäten und Phasen der verschiedenen Reflexe enthalten.

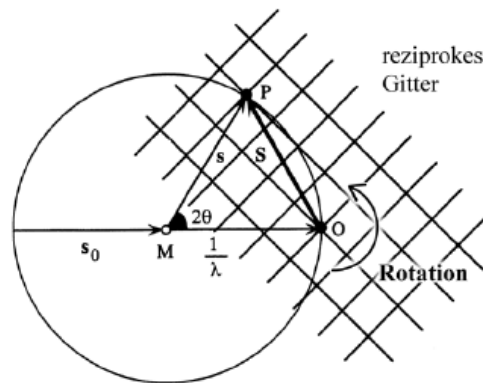


Abb. 10: Die Ewald Kugel zur Konstruktion des gestreuten Röntgenstrahles.

Der Radius der Kugel um den Mittelpunkt M beträgt $1/\lambda$ und das Zentrum des reziproken Gitters liegt auf der Kugeloberfläche bei O. Das reziproke Gitter dreht sich mit dem Kristall (dem realen Gitter) um den Punkt O. Der eintretende Strahl S_0 wird im Winkel von 2θ als Strahl s gestreut.

Das reale Gitter, sprich der Kristall mit dem darin enthaltenen Protein, und das reziproke Gitter sind über eine Fouriertransformation eindeutig miteinander verknüpft. Dies ist letztendlich die Voraussetzung, um die räumliche Struktur der Proteine mit Hilfe der Kristallographie aufklären zu können. Die wichtigsten Gleichungen, die diesen Zusammenhang widerspiegeln, sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Ein Strukturfaktor F_{hkl} ist eine Kombination von N Wellen in der Richtung hkl , die von den N Atomen in der Elementarzelle bei einem Beugungsexperiment ausgehen. Jede dieser Wellen hat die Amplitude f_i (atomarer Streufaktor) und die Phase α_i , die ein Ausdruck der räumlichen Position des Atoms i in der Elementarzelle ist. Jeder Strukturfaktor F_{hkl} besteht somit ebenfalls aus Amplitude und Phase und lässt sich als komplexe Zahl wie folgt beschreiben:

$$F_{hkl} = A_{hkl} + iB_{hkl}$$

wobei:

$$A_{hkl} = \sum_N f_i \cos 2\pi(hx_i + ky_i + lz_i)$$

$$B_{hkl} = \sum_N f_i \sin 2\pi(hx_i + ky_i + lz_i)$$

Der atomare Streufaktor f_i hängt von der Auflösung ($2\sin\theta/\lambda$) ab, da die Elektronenwolke um ein Atom eine räumliche Ausdehnung besitzt. Mit zunehmendem Streuwinkel nimmt der Gangunterschied zwischen den an verschiedenen räumlichen Positionen innerhalb des Atoms gestreuten Röntgenstrahlen zu. Da diese inneratomaren Distanzen deutlich kleiner sind, als die bisher betrachteten Abstände zwischen den einzelnen Gitterebenen d_{hkl} und somit der Gangunterschied nur Bruchteile der Wellenlänge ausmacht, führt dies nicht zu den weiter oben beschriebenen kompletten Auslöschungen. Die Intensität des gestreuten Strahles nimmt jedoch mit zunehmender Auflösung ab. Berücksichtigt man außer der statischen Ausdehnung noch die dynamische Beweglichkeit der Atome, das heißt die Möglichkeit thermischer Bewegung um eine Gleichgewichtsposition, so muss im einfachsten Fall der isotropen Bewegung noch der Temperaturfaktor B eingeführt werden:

$$f_{i,dynamisch} = f_{i,statisch} \exp\left(-B_i \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right)$$

Man kann zeigen, dass B mit der mittleren quadratischen Auslenkung u^2 des Atoms, wie folgt, zusammenhängt:

$$\overline{u^2} = \frac{B}{8\pi^2}$$

Die im Beugungsexperiment bestimmbare Strukturfaktoramplitude ist dann durch

$$|F_{hkl}| = \sqrt{A_{hkl}^2 + B_{hkl}^2}$$

gegeben und die Phase α des jeweiligen Reflexes durch

$$\alpha_{hkl} = \arctan \frac{B_{hkl}}{A_{hkl}}$$

In umgekehrter Richtung wird die Elektronendichteverteilung in einem Kristall am Ort (x,y,z) durch folgende Fouriersumme berechnet:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{hkl}]$$

Die Elektronendichteverteilung ist die primäre Information über den Kristallinhalt, die mit den Methoden der Kristallographie zugänglich ist. In ihr steckt natürlich auch die Information über die Lage der einzelnen Atome, da die beugenden Elektronen zu den Atomen gehören.

3.6.6. Datensammlung und Datenreduktion

Nach einer Verbesserung der Kristallisationsbedingungen von PAZAMI konnten Kristalle besserer Qualität erhalten werden, die an institutseigenen Messgeräten bis zu einer Auflösung von ca. 1,9 Å beugten. Diese ersten Testmessungen und Datensätze wurden mit Hilfe eines Mar345 *Image Plate*-Detektors an dem Cu K α -Drehanodengenerator RU 200 ($\lambda = 1,5418$ Å, 50 kV, 100 mA) mit Graphit-Monochromator aufgenommen. Zuvor wurde in Tieftemperaturexperimenten (100 K) nach Lösungen gesucht, bei denen ein Einkristall ohne Schaden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert werden konnte. Es ist bekannt, dass es beim Bestrahlen von Kristallen mit intensiver Röntgenstrahlung bei geeigneter Wellenlänge der Strahlung und Energie der Bindung zur homolytischen Bindungsspaltung kommen kann. Man spricht von Strahlenschäden (Weik *et al.*, 2000). PAZAMI-Kristalle konnten mit Hilfe von Glycerol als Kryoprotektand vor Röntgenshäden geschützt werden, indem sie vor der Messung kurz in Kryopuffer eingetaucht wurden (25% Glycerol + 75% Mutterlösung). Hochaufgelöste Datensätze von PAZAMI wurden an der *wiggler beamline* BW6 (MarCCD165 Detektor) am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) aufgenommen, wobei die Proteinkristalle bis 1,3 Å beugten. Für die Indizierung der Diffraktionsdaten wurde DENZO (Otwinoski und Minor, 1997) verwendet, für die Datenreduktion und Skalierung SCALEPACK. Die weitere Analyse der Daten wurde mit den Programmen des CCP4 *program package* (COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT NUMBER, Version 6.0.0) oder des HKL2000-Programm-pakets durchgeführt.

3.6.7. Das Phasenproblem

Um eine Elektronendichte (Verteilung der Elektronenwolken im Kristall) mittels Fourier-Transformation berechnen zu können, benötigt man zwei Informationen: Intensität (oder Amplitude) und Phase. Wie alle elektromagnetischen Wellen besitzen Röntgenstrahlen diese beiden Informationen, die Phaseninformation geht allerdings bei der Messung verloren und daher können die Ortskoordinaten der Atome nicht errechnet werden. Das wird in der Kristallographie als Phasenproblem bezeichnet.

Es gibt drei grundlegende Methoden um Phasen auf anderen Wege zu ermitteln:

- Molekularer Ersatz (*molecular replacement*, MR)

- Multipler Isomorpher Ersatz (*multiple isomorphous replacement*, MIR)
- Multiple Anomale Streuung (*multiple anomalous dispersion*, MAD)

3.6.8. *Molecular Replacement*

Zur Lösung des Phasenproblems wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Methode des Molekularen Ersatzes verwendet. Als Modell dienten die Atomkoordinaten des Protein Pseudoazurin aus *Achromobacter cycloclastes* (PDB: 1BQK).

Beim Molekularen Ersatz werden die Phasen durch ein entsprechend des nativen Proteindatensatzes korrekt positioniertes Proteinmodell mit hinreichender Ähnlichkeit zur aktuellen Struktur bestimmt. Unter Verwendung der vom Suchmodell berechneten Phasen und der gemessenen Strukturfaktoramplituden wird dann eine Elektronendichteverteilung berechnet, die bei einem hinreichend ähnlichen Suchmodell das Lösen der neuen Struktur ermöglicht. Ob diese Ähnlichkeit ausreichend ist, muss im Einzelfall ausprobiert werden.

Ein Erfahrungswert besagt, dass die Standardabweichung der C α -Atome nicht mehr als 1 Å betragen sollte. Diese strukturelle Ähnlichkeit wird bei Protein-Inhibitor-Komplexen im Vergleich zum freien Protein oder bei Proteinen mit einer hohen Identität der Primärstruktur (>20-30%) oft erfüllt. Mit der rasanten Zunahme an bekannten Proteinstrukturen steigt die Chance, eine ausreichend ähnliche, bereits gelöste Struktur zu finden.

Nachdem ein aussichtsreiches Suchmodell vorliegt, besteht die weitere Aufgabe in der korrekten Positionierung dieses Modells innerhalb der Einheitszelle. Im allgemeinen ergeben sich 3 Rotations- und 3 Translations-, also insgesamt 6 Freiheitsgrade. Eine solche Suche im 6-dimensionalen Raum ist zwar im Prinzip möglich, erfordert aber meist einen nicht realisierbaren Rechenaufwand. Die Benutzung der Pattersonfunktion (Patterson, 1934), ermöglicht es die Rotations- und Translationsfreiheitsgrade getrennt abzusuchen, was in zwei dreidimensionalen Suchen resultiert, deren rechnerischer Aufwand realisierbar wird. Die zu dieser Methode führenden Schritte sind in Hoppe, 1957; Rossmann und Blow, 1962; Huber, 1965 und in vielen kristallographischen Lehrbüchern beschrieben.

Die Pattersonfunktion $P(u)$ ist die Selbstfaltung der Elektronendichteverteilung $\rho(r)$ in der Elementarzelle. Sie enthält die Information über sämtliche Vektoren $u = (u, v, w)$ die einen interatomaren Abstand von einem Atom an Position $r = (x, y, z)$ zu einem Atom an Position $r + u$ beschreiben und lässt sich ohne Phaseninformation berechnen. Wichtig ist hierbei, dass die intramolekularen Vektoren sowohl die Orientierung, als auch die Lage der Moleküle in der Einheitszelle (Rotations- und Translationsfreiheitsgrade) eingehen.

$$P(u) = \int_r \rho(r)\rho(r+u)dr$$

$$P(u) = P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw)$$

Das Prinzip der Pattersonsuche beruht darauf, dass das Suchmodell in einer dreidimensionalen Suche jeweils um gewisse Inkremente gedreht wird und von jeder der resultierenden Orientierungen, Strukturfaktoren (F_{calc}) und daraus eine Patterson-Dichte berechnet wird. Diese wird mit der Patterson-Dichte des gemessenen Protein-Datensatzes ($|F_{obs}|$) verglichen und die Übereinstimmung mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten $C(|F_{obs}|^2, |F_{calc}|^2)$ quantisiert.

$$C(P_{obs}, P_{calc}) = \int_u P(|F_{obs}|^2, u) \times P(|F_{calc}|^2, u) du$$

Stimmt die aktuelle Orientierung des Suchmodells mit der Orientierung des Proteins in der zum gemessenen Datensatz gehörigen Einheitszelle überein, so erhält man einen Peak für den Korrelationskoeffizienten. Im zweiten Schritt wird das so orientierte Suchmodell wieder in Inkrementen in einer dreidimensionalen Suche durch die Einheitszelle geschoben. Die Bewertung der korrekten Lage kann hier sowohl über den Kristallographischen R-Faktor als auch über den Korrelationskoeffizienten erfolgen. Dieses grundsätzliche Prinzip wird in verschiedenen Programmen rechnerisch unterschiedlich umgesetzt, was in verschiedenen

Rotations- und Translationsfunktionen resultiert. Dabei wird nicht immer, wie oben beschrieben, das Suchmodell selbst bewegt.

Es sei noch angefügt, dass die hier beschriebene Aufteilung des eigentlich 6-dimensionalen Suchproblems in zwei 3-dimensionale Suchen zu einer Verringerung des Kontrastes bei der Patterson Rotationssuche führt. Manchmal können durch Symmetrieüberlegungen die Freiheitsgrade der Suche soweit eingeschränkt werden, dass eine Suche über alle verbleibenden Dimensionen rechnerisch möglich wird. In der resultierenden Direktraum-Suche können dann unter Verwendung des kristallographischen R-Faktors als Bewertungskriterium oft Suchmodelle noch gefunden werden, die mit Hilfe der Patterson Methode nicht platziert werden konnten.

Der R-Faktor (*reliability factor*) bestimmt die mittlere Abweichung zwischen beobachteten (F_o) und aus dem Modell berechneten Struktur Faktoren (F_c). Veränderungen im R-Wert zeigen an, ob sich das Modell verbessert (R-Faktor wird kleiner) oder verschlechtert.

$$R = \frac{\sum_{hkl} \|F_o - F_c\|}{\sum_{hkl} |F_o|}$$

4. Ergebnisse – humanes MyD88-Protein

4.1. Klonierung und Expression

Humane MyD88-DNA aus Pankreasgewebe wurde vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) erworben.

Für die Klonierung wurde die durch PCR vervielfältigte Insert-DNA und der Vektor pGEX-4T-1 mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Sal* I geschnitten und im Kühlraum über Nacht ligiert (siehe Methodenteil). Anschließend wurden positive Klone über eine Transformation in den *E.coli*-Stamm *DH5 α* und Kultivierung auf Ampicillinplatten selektiert. Die isolierte DNA wurde über qualitativen Restriktionsverdau überprüft und schließlich sequenziert. Die Kontrolle der Sequenz mit dem Programm *Sequenz Manipulation Suite* (Stothard, 2000) ergab, dass die DNA fehlerfrei in den Vektor inkloniert wurde und auch keine Mutationen innerhalb des Inserts vorkamen.

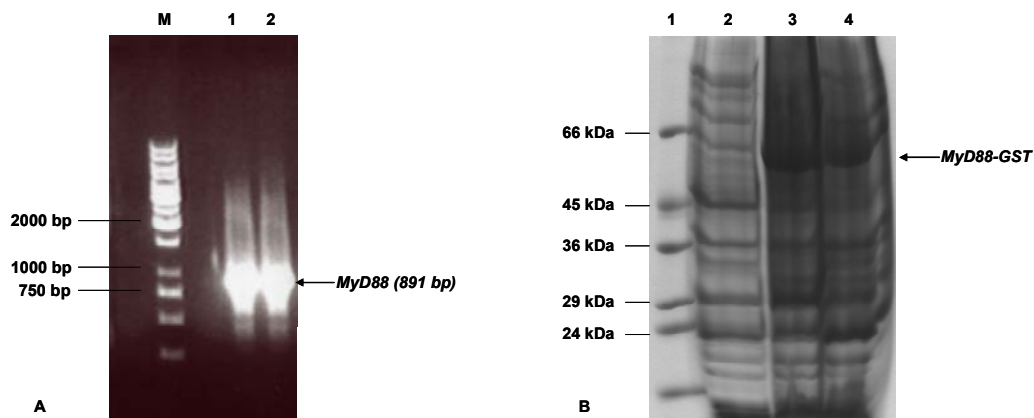


Abb. 11: (A) Amplifikation von MyD88

1%iges Agarosegel gefärbt mit EthBr. Aufgetragen wurden 10 μ l eines PCR-Ansatzes (1,2) und DNA-Standard (M). Die Länge einiger Standard-Fragmente ist angegeben, das MyD88-Produkt ist gekennzeichnet

(B) Expression von MyD88-GST

10% SDS Gel gleicher Zellmengen an Expressionskultur von MyD88-GST vor (2), 3h, (3) und 6h (4) nach der Induktion mit 1 mM IPTG. Die Größe der Markerbanden (1) ist links angegeben. MyD88-GST ist markiert.

Als Nächstes wurden Expressionstests in verschiedenen *E.coli* Expressionsstämmen durchgeführt. Dabei wurde durch Variation der Temperaturen und IPTG-Konzentrationen nach

dem Expressionsoptimum von MyD88-GST gesucht. Eine optimale Expression des Fusionsproteins wurde bei der Expression des MyD88-GST in BL21Star(DE3)pLys beobachtet.

4.2. Reinigung

Nach der Expression wurden die *E. coli* BL21Star(DE3)pLys-Zellen geerntet und durch Sonifizierung lysiert. MyD88-GST wurde aus dem löslichen Zelllysate nach Zentrifugation durch Affinitätschromatographie an GST-Sepharose gereinigt.

Mithilfe von Glutathion, welches an einer Sepharose-Matrix immobilisiert war, gereinigt. Das fertige Fusionsprotein wird nach der Expression im *E. coli* Zytoplasma akkumuliert, wobei sich am N-Terminus das GST und am C-Terminus das MyD88-Protein befindet. Bei der Aufbringung auf das Affinitätsmedium bindet MyD88 an Glutathion zusammen mit anderen Verunreinigungen, welche durch Waschen mit dem Bindungspuffer (1x PBS) beseitigt werden. MyD88-GST wird dann aus Sepharose unter milden, nicht denaturierenden

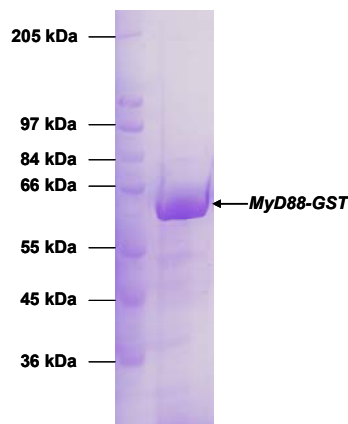


Abb. 12: Affinitätsreinigung von MyD88-GST

SDS-Gel des MyD88-GST Fusionsproteins nach Bindung und Waschen des Zellextrakts an GST-Sepharose

Bedingungen eluiert (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 8.0). Wie auf dem SDS-Gel in der Abbildung 12 sichtbar, war das Fusionsprotein nach diesem Schritt schon nahezu rein und fähig zur Abspaltung mit der AcTEV-Protease. Nach der Elution wurde das isolierte Fusionsprotein mit NAP-Säulen in Verdauungspuffer (50 mM Tris/HCl, 0,5 mM EDTA,

1 mM DTT, pH 8.0) umgepuffert, aufkonzentriert und anschließend mit der AcTEV-Protease gespalten (4h/ 25°C).

4.3. Abspaltung des MyD88-Proteins vom GST-Fusionspartner

Die TEV-Protease (TEV: Tobacco Etch Virus; 27 kDa) erkennt eine sogenannte TEV-*site* bestehend aus der Aminosäuresequenz Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly, welche sie zwischen den Aminosäure Gln und Gly spaltet. Wie man in der Abbildung 13 sehen kann, hat die AcTEV-Protease keinen vollständigen Verdau bei 25°C durchgeführt.

Ein großer Nachteil dieser AcTEV-Protease ist, dass sie sich selbst an einer spezifischen Stelle verdaut. Als Ergebnis haben wir eine verkürzte Form mit einer verminderten Aktivität. Um diesen Nachteil entgegenzuwirken, wurde dem Verdauansatz nach zwei Stunden noch mehr frische AcTEV-Protease hinzugefügt, aber man beobachtete nur eine minimale Verbesserung der Resultate. Es wurden auch Verdauversuche bei 4°C über Nacht durchgeführt mit gleichen Ergebnissen.

Ein Verdacht auf eine nicht richtige Faltung des Proteins veranlasste mich, eine genauere Analyse des Fusionsproteins mittels Gelfiltration durchzuführen.

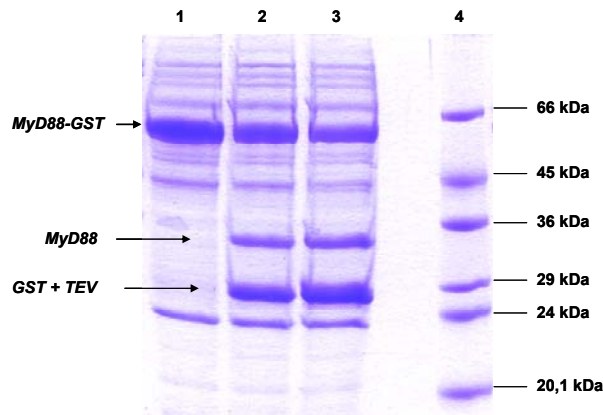


Abb. 13: Verdau von MyD88-GST-Fusionsprotein bei 25°C
1: vor Verdau mit AcTEV, **2:** Verdau nach 2h Inkubation, **3:** Verdau nach 4h Inkubation. Die Größe der Markerbanden (**4**) ist rechts angegeben.

4.4. Analyse der Oligomerisierung des MyD88-GST-Fusionsproteins

Die analytische Gelfiltration mit Hilfe des SMART-Systems und einer Superdex 200 PC3.2 Gelfiltrationssäule ergab eine sehr schnelle Elution von MyD88-GST, was auf eine Aggregation des Fusionsproteins hindeutet. Das Molekulargewicht von MyD88 plus GST liegt auf der durch verschiedene Standardproteine geeichten Säule bei ungefähr 670 kDa. Dies entspricht dem zehnfachen bis elffachen Molekulargewicht, welches durch SDS-PAGE bestimmt werden konnte. Damit ist klar, dass MyD88 im aggregierten Zustand vorliegt.

Eine Sequenzanalyse der einzelnen Bande aus der GST-Reinigung (Abbildung 12) ergab die Anwesenheit von zwei Proteinen: MyD88-GST-Fusionsprotein und Hsp60-Chaperon aus *E.coli*. Das stimmt mit Beobachtungen aus der Gelpermeationschromatographie durchgeführt an MyD88-GST überein. Dort wurden auf einem 12% SDS-Gel zwei Banden gesichtet, welche auf der gleichen Höhe liefen (Abbildung 14). Man dachte zunächst an einen partiellen Verdau nach der Reinigung, was aber nicht der Fall war.

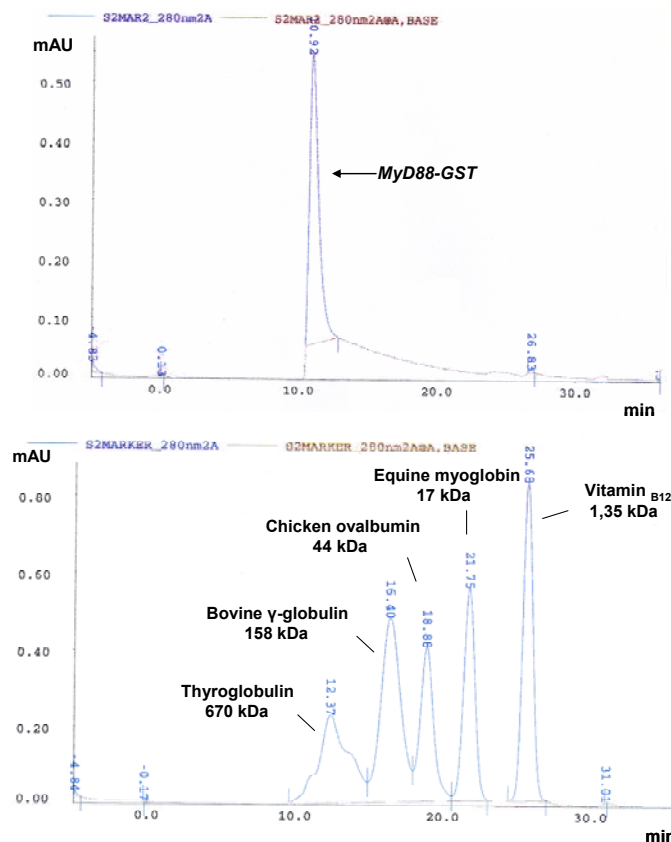


Abb. 14: Analytische Gelfiltration von MyD88-GST-Fusionsprotein mit Hilfe einer Superdex 200 PC3.2-Säule. *Oben*: MyD88-GST-Probe. *Unten*: Molekulargewichtsstandard

4.5. Gelfiltration von MyD88-GST

Bei der Gelfiltration wird ausgenutzt dass die Partikel der Säulenmatrix Poren definierten Durchmessers haben. Somit können größere Moleküle nicht in die Poren eindringen und werden ausgeschlossen. Kleine Moleküle jedoch diffundieren in die Poren hinein. Sie brauchen für den Durchlauf der Säule wesentlich länger. So können die Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Im Fall von MyD88-GST-Fusionsprotein ist es schwer aber ausreichend zu sehen, dass sich doch zwei Proteine überlappen. Während bei der Affinitätschromatographie beide Proteine übereinander gelagert sind, werden bei der Gelfiltration diese aufgetrennt. Ein wichtiger Punkt ist, dass beide Proteine fast gleich groß sind. Darum die Überdeckung: MyD88-GST (61 kDa), Hsp60 (60 kDa).

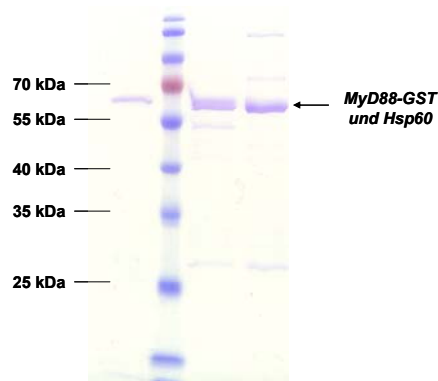


Abb. 15: SDS-Gel aus der MyD88-GST-Gelfiltration

SDS-Gel der Superdex12-Reinigung von MyD88-GST. Aufgetragen wurden jeweils 20 μ l der einzelnen Fraktionen. Die Größe der Markerbanden ist links angegeben. MyD88-GST und Hsp60 sind markiert. Spur 1: MyD88 allein. Spur 2: Markerprotein. Spuren 3/4: MyD88-GST+Hsp60

5. Ergebnisse – PAZAMI

5.1. Klonierung und Expression

Die Klonierung von PAZAMI wurde in der Gruppe von Christopher Dennison (University of Newcastle upon Tyne) durchgeführt und das Plasmid für die Proteinexpression zur Verfügung gestellt. Da das Plasmid pTrcPAZAMI (abgeleitet aus dem pTrc99A-Vektor) einen regulierbaren Promotor unter der Kontrolle des Lactose-Operons enthält, der durch Zugabe von Beta-Galactosiden aktiviert werden kann, wurde IPTG als Induktor zur bakteriellen Proteinproduktion eingesetzt. Außerdem wurde die Erkenntnis genutzt, dass durch die Zugabe von $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ die Proteinausbeute erhöht wird. Über ein Signalpeptid wird eine Sekretion der Proteine in den periplasmatischen Raum von *E. coli* bewirkt.

Nach Induktion mit 0,1 M IPTG in Ansätzen von jeweils 1500 ml über 4 Stunden bei 37°C wurden die Bakterien pelletiert, in kaltem Aufschlusspuffer unter Rühren resuspendiert und nach 1 Stunde im Kühlraum die Sphäroblasten abzentrifugiert, wobei ungefähr 200 ml periplasmatischer Extrakt gewonnen wurde (siehe Methodenteil).

5.2. Reinigung

PAZAMI wurde mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Hierzu wurde zunächst das eingeeengte dialysierte Lysat (siehe Methodenteil) abzentrifugiert (25000 U/min/ 30 min/ 4°C) und die Säule (CM-Sepharose, 40 ml) mit Auftragspuffer (10 mM Kaliumphosphat, pH 6,5) äquilibriert. Das abzentrifugierte Lysat wurde dann mittels eines 50-ml-Loops bei geringerer Flussrate (1 ml/ min) auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde so lange mit Auftragspuffer gewaschen, bis die Absorption bei OD_{280} nm einen konstanten Wert annahm. Aufgrund der Anwesenheit von Kupfer im katalytischen Zentrum von PAZAMI, wurde nur ein schwacher Kationenaustauscher benötigt, um es isolieren zu können. Man konnte sogar die ganze Reinigung mitverfolgen, da PAZAMI aufgrund der besetzten Kupferbindungsstelle eine starke blaue Farbe aufwies, was an der Äkta-Chromatographieanlage bei einer Wellenlänge von 595 nm sichtbar wurde.

Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-2 M NaCl (Volumen 60 ml, Flußrate

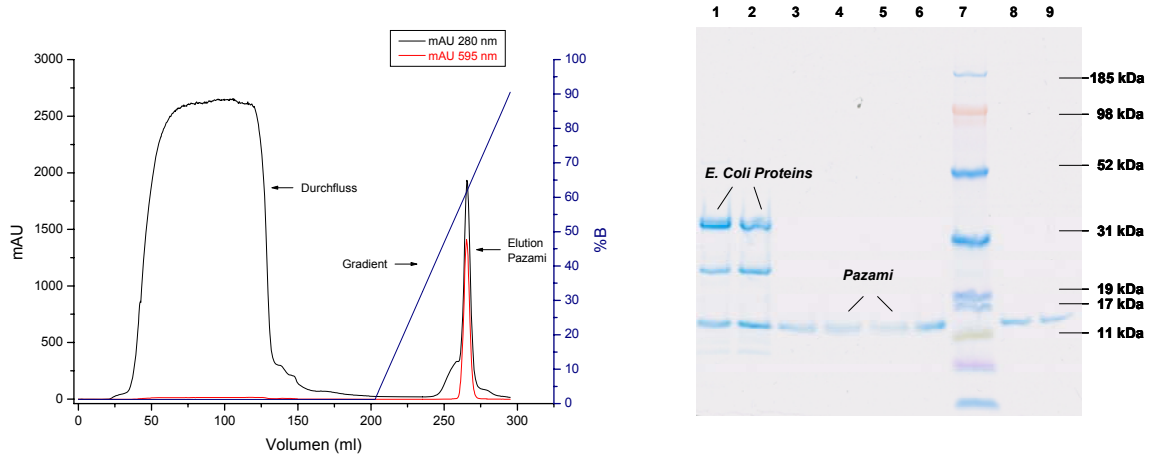


Abb. 16: Kationenaustauschchromatographie von PAZAMI an CM-Sepharose
 Aufgetragen wurden jeweils 20 μ l der einzelnen Elutionsfraktionen auf einem 15% SDS-Gel. Die Größe der Markerbanden ist unter Reihe 7 angegeben. PAZAMI (Reihe 3-9) sowie *E. coli*-Kontaminationsproteine (Reihe 1-2) sind markiert.

0,5 ml/min). Fraktionen mit reinem PAZAMI (Fraktionen 3-9, siehe Abbildung 16) wurden vereinigt, über eine Ultrafiltrationseinheit mit einem *cutoff* von 5 kDa aufkonzentriert und durch Gelpermeationschromatographie auf einer SuperdexTM200-Säule (Pharmacia) weiter gereinigt (Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl; 30 mM NaCl, pH 7,5; Flussrate 0,5 ml/min).

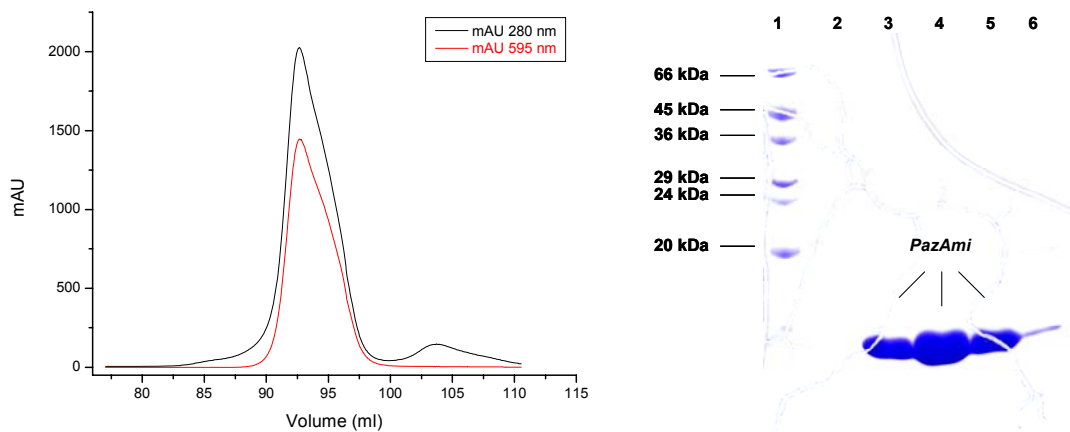


Abb. 17: Chromatogramm (links) und zugehöriges 15%-SDS-Gel (rechts) der Gelpermeationschromatographie von PAZAMI auf einer SuperdexTM200-Säule.
 Das Auftragsvolumen betrug 2 ml, die Chromatographie wurde bei einer Flussrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Die Größe der Markerbanden ist links angegeben. Die Fraktionen 3 bis 6 enthalten reines PAZAMI.

5.3. Analyse der Oligomerisierung von PAZAMI

Die analytische Gelfiltration von PAZAMI wurde mit Hilfe eines Äkta-Explorer-Geräts und einer Superdex™200 Gelfiltrationsäule bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Elutionsprofil zeigt, dass PAZAMI als Monomer vorliegt. Wie im Chromatogramm zu sehen ist, eluiert PAZAMI fast in der gleichen Zeit wie der Proteinmarker Ribonuklease A.

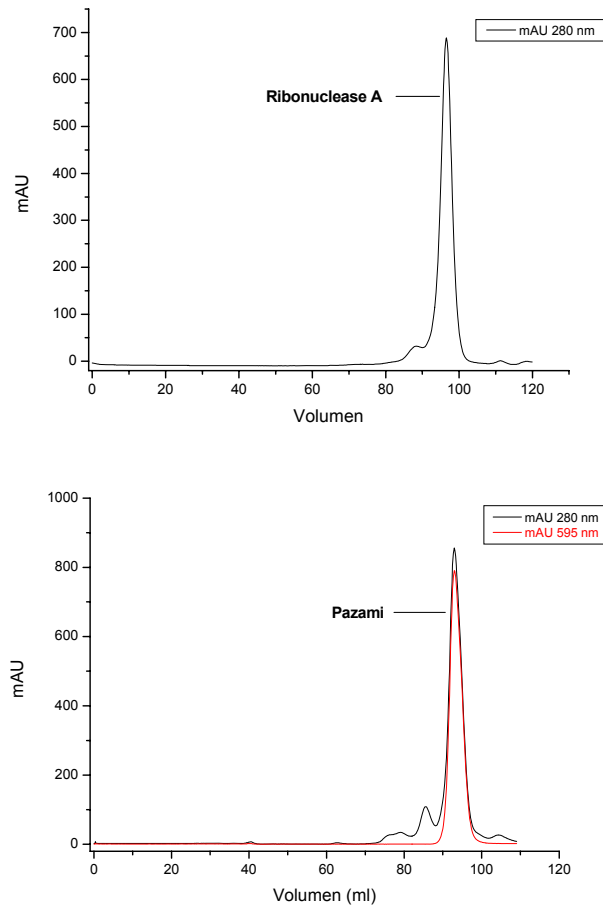


Abb. 18: Analytische Gelfiltration von PAZAMI

Oben: Markerprotein Ribonuklease A mit einem Molekulargewicht von 13,7 kDa. Es eluiert nach etwa 90 ml Puffer.

Unten: PAZAMI-Protein (12,85 kDa) und dessen Elution auch nach etwa 90 ml Puffer.

Verwendete Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl, 30 mM NaCl, pH 7,5. Laufgeschwindigkeit: 0,5 ml/min

5.4. CD-Spektrum von PAZAMI

CD-Spektren im Fern-UV-Bereich (170 - 250 nm) geben Auskunft über die Sekundärstruktur von Proteinen, da hier die π -Elektronen der Peptidbindungen des Rückgrates des Proteins als Chromophor wirken, wohingegen bei CD-Spektren im Nah-UV-Bereich (250 - 300 nm) die aromatischen Seitenketten von Tyrosinen und Tryptophanen als Chromophor dienen. Deshalb werden hier die Aussagen über die Tertiärstruktur eines Proteins möglich.

Die Proben wurden mit einem CD-Spektrometer (Modell J-715, Jasco Labor- und Datentechnik) bei Temperaturen zwischen 10° und 90°C vermessen. Für die Aufnahme im fernen UV-Bereich wurden 0,75 mg/ml Protein in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 30 mM NaCl, in einer Quarzküvette von 0,1 cm Weglänge verwendet. Die Spektren wurden mit einer Bandweite von 1 nm und einer Aufnahmezeit von 16 Sekunden aufgenommen.

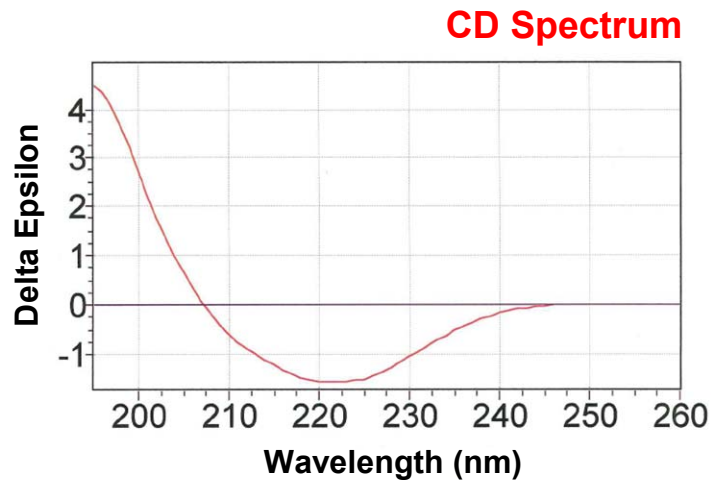


Abb. 19: Fern-UV-CD-Spektrum von PAZAMI

Zu sehen ein vorwiegend typisches antiparalleles β -Faltblatt-Muster, sichtbar an dem Maximum bei 195 nm und dem Minimum bei 220 nm. Unten: basierend auf dem CD-Spektrum die berechneten Sekundärstrukturelemente für PAZAMI.

	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Helix	15,8%	14,1%	10,2%	9,7%
Antiparallel	34,1%	31,2%	32,2%	30,7%
Parallel	7,3%	6,4%	5,7%	5,5%
Beta-Turn	15,0%	15,1%	16,3%	19,1%
Rndm. Coil	30,9%	33,2%	34,9%	34,9%
Total	103,0%	100,1%	99,3%	99,9%

5.5. Denaturierungsexperiment mit PAZAMI

Neben der Bestimmung der Sekundärstrukturelemente erlaubt die CD-Spektroskopie auch die Untersuchung der thermischen Stabilität des Proteins in Lösung. Da hierbei auch kleine Volumina mit geringeren Mengen an Protein eingesetzt werden können, ließ sich die Temperatursensitivität von PAZAMI gut mit dieser spektroskopischen Methode verfolgen. Der Schmelzpunkt (T_m) von PAZAMI liegt bei ungefähr 58,33°C. Schmelzpunkte wurden durch Messungen des Circular dichroismus bei 208 nm im Bereich zwischen 4° und 90°C (0,5 °C/min) ermittelt.

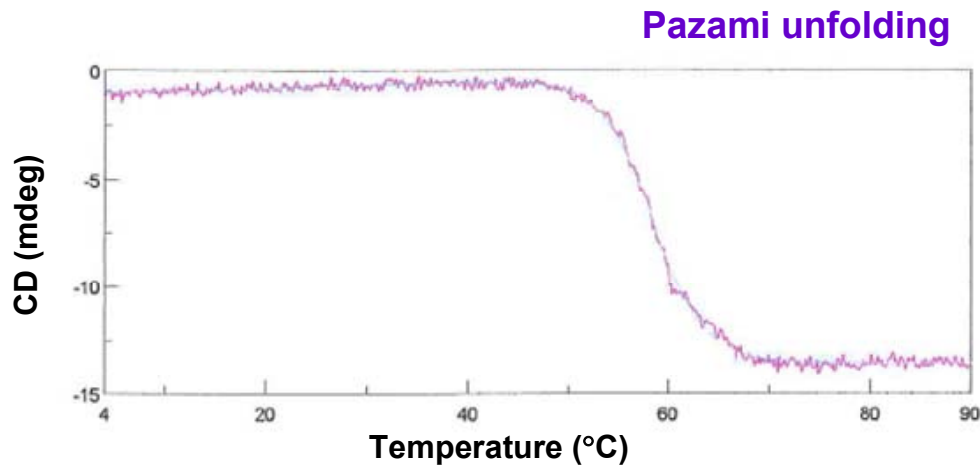


Abb. 20: Temperatur-Induzierte Entfaltungskurve von PAZAMI, aufgenommen am CD-Spektrometer J-715 mit ansteigender Temperatur

5.6. MALDI-TOF-Massenspektrometrie von PAZAMI

Die Analyse von PAZAMI mittels Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie ergab ein Molekulargewicht von 12,85 kDa. Dies entspricht fast dem Molekulargewicht des Wildtyp-Proteins Pseudoazurin, welches ein Molekulargewicht von 13,02 kDa aufweist. PAZAMI (122 AS) hat im Gegensatz zu Pseudoazurin (124 AS) zwei Aminosäuren weniger, was als Folge der Loop-Verkürzung resultierte.

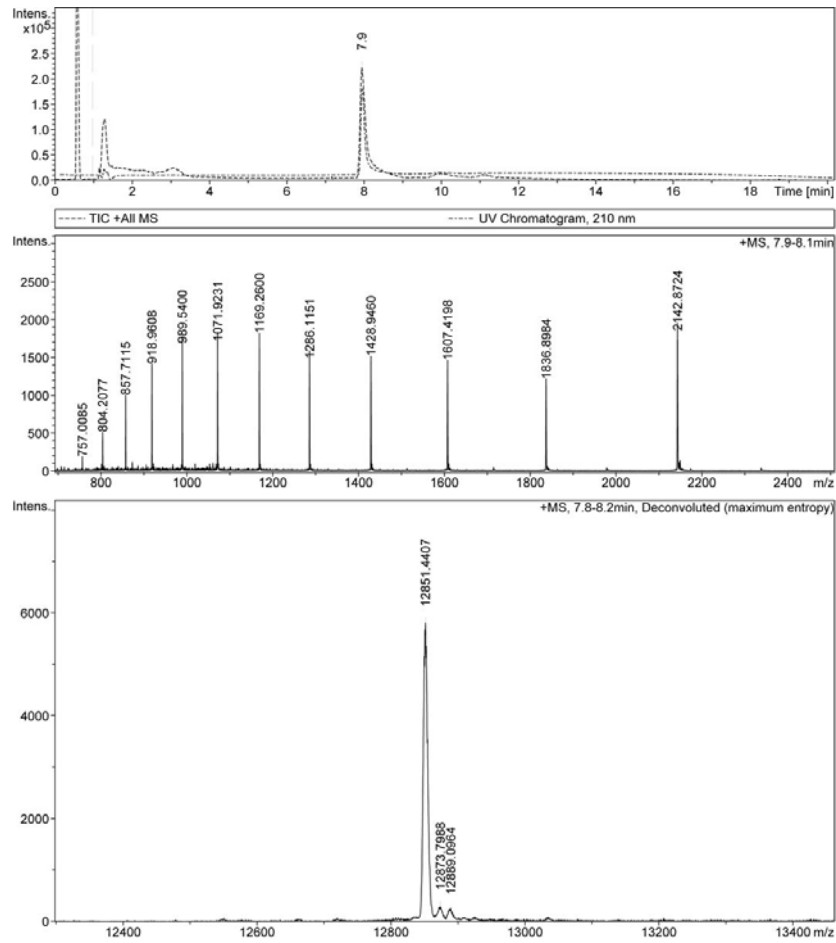


Abb. 21: Ergebnis aus der Massenspektrometrie durchgeführt an PAZAMI

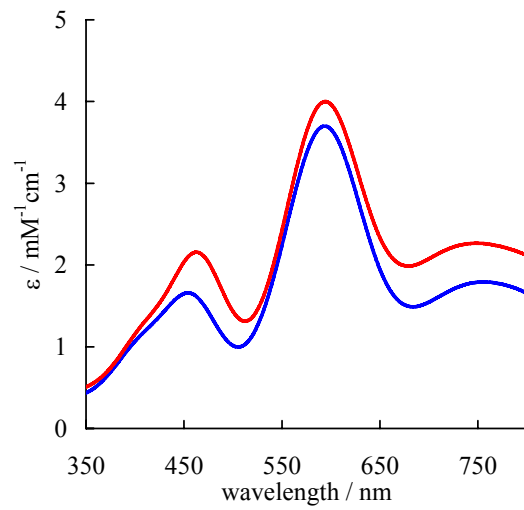


Abb. 22: UV/Vis-Spektrum von PAZ (blau) und PAZAMI (rot) bei 25°C in 10 mM Phosphatpuffer, pH 8,0

5.7. Kristallisation, Datensammlung und Strukturbestimmung

In einigen Kupferproteinen wurde beobachtet, dass eine Reduktion dieser, sowie eine Änderung des pH-Wertes, zu einer Konformationsänderung ihrer Kupferzentren führt (siehe Histidin Protonierung unter Einleitung). Um dieses Verhalten im PAZAMI zu untersuchen, wurde das in drei verschiedenen pH-Werten kristallisierte PAZAMI (siehe Tabelle 12) analysiert. Gleichzeitig wurde der jeweilige Proteinkristall mit Mercaptoethanol reduziert und kristallographisch analysiert. Es wurde aber lediglich bei zwei unterschiedlichen pH-Werten die Kristallstruktur untersucht, da bei dem Dritten (pH 4,0), die Proteinkristalle für Röntgenuntersuchungen nicht optimal waren.

Für die Kristallisation von PAZAMI wurde ausschließlich die *hanging drop*-Methode benutzt. Eine initiale Kristallisationsbedingung [2 M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, 2M NaCl] wurde in einem *screening* verschiedener potentieller Bedingungen (AmSO₄ Suite, Nextal) gefunden und anschließend verfeinert.

Kristalle kamen innerhalb von 2 bis 3 Tagen bei einer Proteinkonzentration von 25 mg/ml und 20°C. Das Protein befand sich in einem Puffer von 50 mM Tris/HCl, 30 mM NaCl, pH 7,5 (im Fall von Kristallisation bei diesem pH-Wert). 1 μl Proteinlösung wurde mit 1 μl Kristallisationslösung gemischt und gegen 400 μl Mutterlauge äquilibriert. Blaue oxidierte Kristalle von PAZAMI wurden durch Zugabe von 50 mM Mercaptoethanol in die Reservoirlösung reduziert. Nach etwa drei Stunden waren die blauen Kristalle in vollständig reduzierter Form und daher farblos. Datensätze der Röntgenstrahlbeugung wurden am DESY an der *beamline* BW6 bei 100 K nach Übertragung der Kristalle in eine Lösung mit Kryoprotektand (Herstellung der Lösung durch Zugabe von 25% Glycerol zum Kristallisationspuffer) gemessen. Ein MarCCD165 Detektor (Mar Research, Norderstedt, Deutschland) wurde für die Datensammlung benutzt, wobei die Wellenlänge auf 1,05 Å eingestellt wurde. Es wurden zwei Datensätze desselben Kristalls von Cu(II)-PAZAMI, pH 7,5 gesammelt. Der erste bei einem Kristall-Detektor-Abstand, welcher eine Auswertung bis 1,35 Å erlaubte. Der zweite Datensatz konnte bis zur vollen Auflösung von 1,30 Å evaluiert werden. Beide Datensätze lieferten Datensammlungsstatistiken von gleicher Güte (Details für den Datensatz mit der niedrigen Auflösung sind nicht angeführt).

Die Raumgruppe wurde als R32 mit $a = 105,63 \text{ \AA}$, $b = 105,63 \text{ \AA}$, $c = 57,93 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ und $\gamma = 120^\circ$ bestimmt.

Der Kristall blieb blau während der Aufnahme beider Datensätze, was zeigt, dass keine Reduktion des Metallzentrums durch die Photonen der Röntgenstrahlung erfolgte. Datensätze von zwei unterschiedlichen reduzierten Kristallen wurden mit Auflösungen von $1,30 \text{ \AA}$ und $1,35 \text{ \AA}$ mit leicht geänderten Zellkonstanten von $a = 105,76 \text{ \AA}$, $b = 105,76 \text{ \AA}$, $c = 57,28 \text{ \AA}$ (Raumgruppe R32) erhalten. Diese zwei Datensätze von Cu(I)-PAZAMI wurden gesammelt, um die abgeschätzte Genauigkeit der Strukturen und besonders die der Geometrie der Kupferzentren, die in dieser Arbeit bestimmt wurden, zu überprüfen.

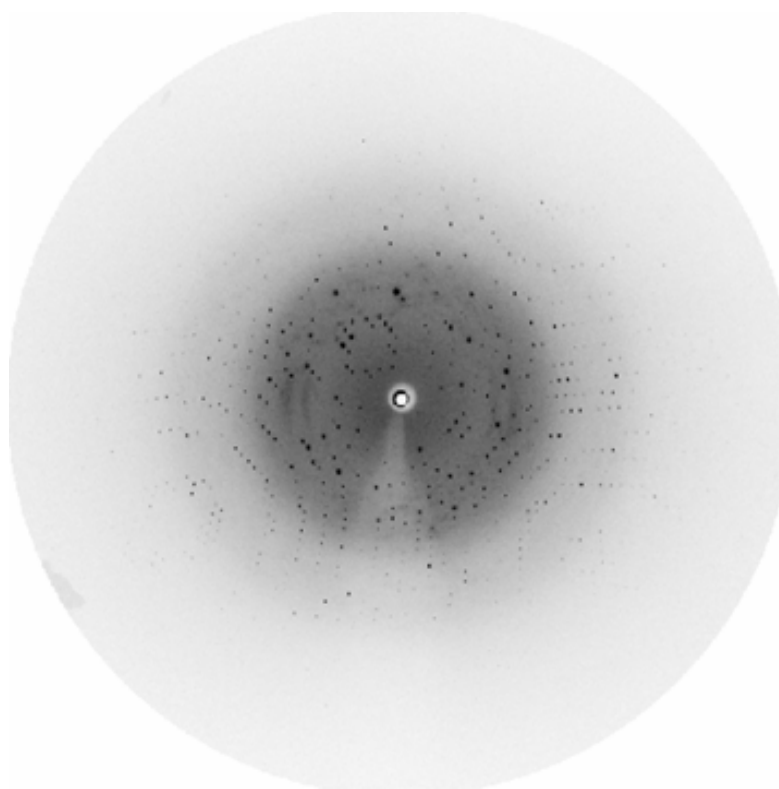


Abb. 23: Diffractionsbild von oxidiertem PAZAMI, pH 7,5 (maximale Auflösung $1,3 \text{ \AA}$)

Die Aufnahme wurde bei einer Temperatur von 100K mit einem Drehwinkel von 1° und einer Wellenlänge von $\lambda = 1,006 \text{ \AA}$ aufgenommen

Im Falle der Kristallisation von Cu(II)-PAZAMI bei pH 5,5 befand sich das Protein in einem anderen Puffer (100 mM MES, 30 mM NaCl, pH 5,5). 1 μ l Proteinlösung (25 mg/ml) wurde mit 1 μ l Kristallisationslösung gemischt und gegen 400 μ l Mutterlauge äquilibriert. Nach Kryoschutz des Proteinkristalls wurde ein Datensatz bei 100 K auf einem Mar345-*Image-Plate*-System (Mar Research, Norderstedt, Deutschland), welches auf einem Drehanodengenerator montiert war (MSC Rigaku, the Woodlands, TX), erhalten. Der Generator wurde mit 50 kV ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) betrieben. Der Proteinkristall war nach der Datensammlung immer noch blau und damit oxidiert. Die reduzierte Form wurde wie oben beschrieben vorbereitet und der Kristall, welcher nach drei Stunden vollständig farblos war, wurde einem Kryoschutz und einer Datensatz-Erfassung bei 100 K unterzogen. Die Datenauswertung für alle Intensitäten wurde mit dem Programm HKL2000 (Otwinoski und Minor, 1997) durchgeführt und ergab R_{merge} -Werte unter 0,1 mit Werten für die Vollständigkeit von besser als 94%. Ausführliche Statistiken der Datensammlung sind in Tabelle 13 gezeigt.

Tabelle 12: Kristallisationsbedingungen für PAZAMI bei verschiedenen pH-Werten und Puffern

Protein	Proteinpuffer (pH-Wert)	Kristallisationspuffer (pH-Wert)
PazAmi	50 mM NaAc/ 30 mM NaCl (pH 4,0)	2 M NaCl/ 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ (pH 4,0)
PazAmi	100 mM MES/ 30 mM NaCl (pH 5,5)	2 M NaCl/ 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ (pH 5,5)
PazAmi	50 mM Tris/ 30 mM NaCl (pH 7,5)	2 M NaCl/ 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ (pH 7,5)

Die Kristallstruktur von Cu(II)-PAZAMI (pH 7,5) wurde durch die Methode des Molekularen Ersatzes mit Hilfe des Programms MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997) gelöst, wobei die Struktur von Pseudoazurin aus *Achromobacter cycloclastes* [PDB-Code 1BQK (Inoue *et al.*, 1999)] als Suchmodell benutzt wurde. Lösungsmittelmoleküle, der Liganden-enthaltende Loop (Reste 78 bis 86) und das Kupferion wurden weggelassen, um den systematischen Einfluss des Modells zu vermeiden. MOLREP lieferte eine hervorragende Lösung, welche zuerst einer Runde kristallographischer Verfeinerung mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) unterworfen wurde. Die entsprechenden 2Fo-2Fc- und Fo-Fc-Karten zeigten eine klare Elektronendichte für den fehlenden Polypeptid-Loop und das Kupferion. Der Modellbau des Loops und alle weiteren Bauschritte wurden mit dem Programm 'O' (Jones *et al.*, 1991) durchgeführt.

Für die anderen Strukturen wurde das verfeinerte Modell des Cu(II)-PAZAMI bei pH 7,5 ohne das Kupferion und Lösungsmittelmoleküle benutzt, um eine initiale *rigid body*-Verfeinerung mit REFMAC5 durchzuführen. Wassermoleküle wurden mit dem automatisierten in REFMAC5 verfügbaren Arp/Warp-Verfahren generiert, gestartet von der CCP4i-Benutzeroberfläche (Potterton *et al.*, 2003). In allen untersuchten Strukturen wurden sowohl ein Glycerol-Molekül als auch ein Chlorid-Ion identifiziert. Alle weiteren kristallographischen Verfeinerungen wurden mit dem Programm REFMAC5 durchgeführt. Manche Reste zeigten zusätzliche Elektronendichte aufgrund von alternativen Konformationen der Haupt- oder Seitenketten, welche in die Verfeinerung eingefügt wurden. Wegen der hohen Auflösung aller Strukturen wurden die Geometrien der Kupferzentren ohne jegliche Restraints verfeinert. Die kristallographische Verfeinerung konvergierte in allen Fällen, was zu befriedigenden R-Werten führte. Die ausführlichen Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Die Stereochemie der Modelle wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) analysiert. Für die Überlagerung der Strukturen wurde das Programm LSQMAN (Kleywegt und Jones, 1994) benutzt.

Die Lösungsmittel-Zugänglichkeit der aktiven Zentren wurde mit dem Programm SurfRace unter Benutzung eines Testradius von 1,4 Å berechnet (Tsodikov, *et al.*, 2002). Abbildungen der Proteinstrukturen wurden mit dem Programm BOBSCRIPT (Esnouf, 1997) und Raster 3D (Merritt und Murphy, 1994) erstellt. Die Koordinaten und Strukturaktoren wurden bei der Protein-Data-Bank mit dem PDB ID-Codes 2ux6 [Cu(II) PAZAMI, pH 7,5], 2ux7 [Cu(I) PAZAMI, pH 7,5], 2uxf [Cu(II) PAZAMI, pH 5,5] und 2uxg [Cu(I) PAZAMI, pH 5,5] eingereicht.

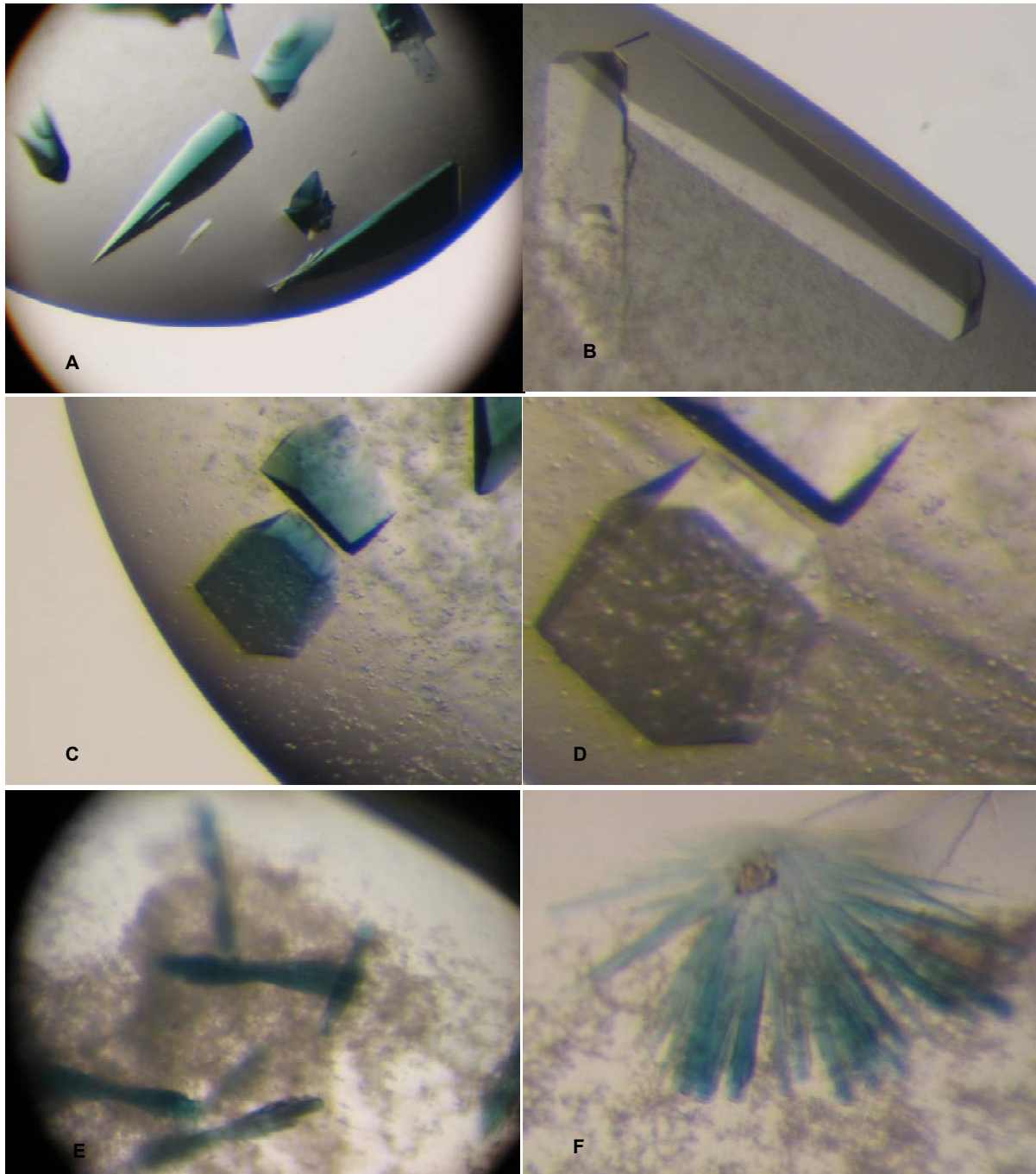


Abb. 24: Mikroskopische Aufnahmen von PAZAMI Kristallen

Bedingung: 2 M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, 2 M NaCl

(A) oxiderter Zustand pH 7,5, (B) reduzierter Zustand pH 7,5, (C) oxiderter Zustand pH 5,5, (D) reduzierter Zustand pH 5,5 und (E,F) oxiderter Zustand pH 4,0.

5.8. Strukturbeschreibung von PAZAMI bei verschiedenen pH-Werten

5.8.1. Gesamtstrukturen

Alle Strukturen von PAZAMI sind sehr ähnlich und bewahren die Gesamtfaltung des Proteingerüsts von PAZ (Pseudoazurin), welches aus einem achtsträngigen β -Barrel und einer C-terminalen Verlängerung (30 Reste) besteht. Diese Verlängerung bestehend aus zwei α -Helices stapelt sich auf der Oberfläche des β -Barrels (siehe Abbildung 25). Die erste Helix ist klein ($\sim 1,5$ Drehungen), während die weiter C-terminale Helix aus ungefähr vier Windungen besteht.

Die Konformation der Faltung der Hauptkette wurde mit einem Ramachandran-Plot (siehe Abbildung 26) überprüft, welcher mit dem Programm PROCHECK berechnet wurde. In allen Fällen liegen 91,9% der Reste in den meistbegünstigten Regionen und die übrigen 8,1% in zusätzlichen erlaubten Bereichen.

Die Strukturen von PAZAMI überlagern sich mit Standardabweichungen (rmsds: *root mean square deviation*) unter $0,15 \text{ \AA}$ für die $C\alpha$ -Atome der Reste 1 bis 9, 16 bis 50 und 53 bis 122 [die Loops zwischen den Resten 10 und 15 und 51 bis 52 wurden aus diesem Vergleich ausgelassen, da sie eine Fehlordnung in der Cu(II)-Struktur bei pH 7,5 zeigen, und mit zwei Hauptkettenkonformationen modelliert worden sind]. Einige Met- und Lysin-Reste zeigen eine Elektronendichte für alternierende Seitenkettenkonformationen, welche modelliert worden sind. Die rmsds für die Überlagerung der $C\alpha$ -Atome aus den Resten 1 bis 9, 16 bis 50, 53 bis 78 und 85 bis 122 von PAZAMI mit den dazugehörigen Aminosäuren von PAZ [PDB-Code: 1BQK, (Inoue *et al.*, 1999)] sind $0,94 \text{ \AA}$. Dieser relativ hohe Wert rührt zum Teil von der Bewegung der C-terminalen α -Helix (Reste 91 bis 122) her, welche aus der Positionierung des Phenyl-Rings von Phe83 in der Nähe des ersten Turns dieser Region (siehe Abbildung 25) hervorgerufen wird. Außerdem bindet ein Glycerol-Molekül in PAZAMI zwischen dem Phe68 zum Val73-Loop und dem Gly52 zur Phe56-Region über eine Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungskontakte.

Diese Interaktionen im Proteinrückgrat führen zu Veränderungen in diesen Regionen im Vergleich zu PAZ. Die Kristallpackung in der Struktur von PAZAMI ist zu derjenigen von

PAZ verschieden, was dazu führt, dass angrenzende Moleküle über die hydrophobe Region interagieren, welche den lösungsmittel-exponierten His81-Ligand umgibt, wie man es in

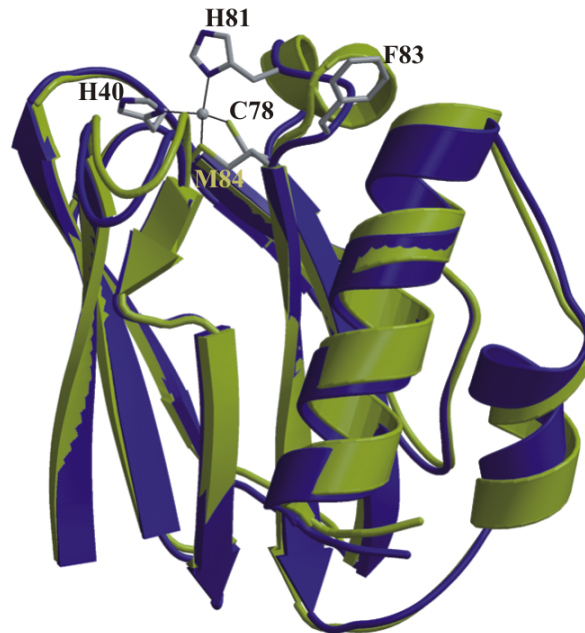


Abb. 25: Ribbon Darstellungen der Überlagerung der Strukturen von Cu(II)-PAZ [1BQK in grün, pH 6,0, (Inoue *et al.*, 1999)] und PAZAMI bei pH 7,5 (blau). Die Kupferliganden und die Seitenkette des Phe83 sind als Stäbchen dargestellt und markiert. Das Kupferion ist als eine graue Kugel für PAZAMI abgebildet.

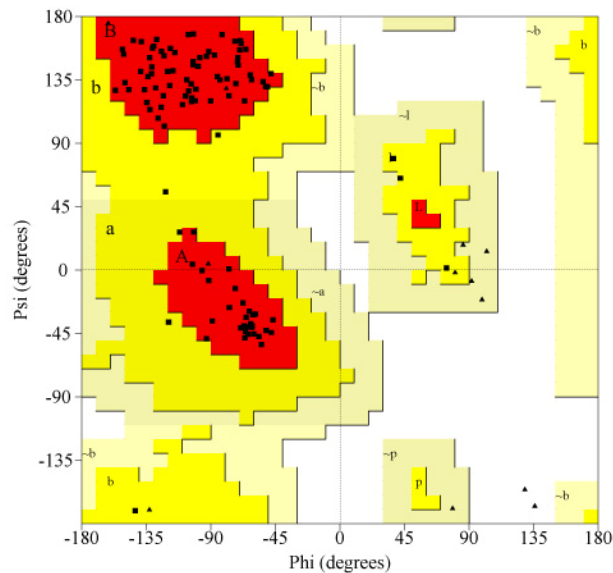


Abb. 26: Ramachandran-Plot von oxidiertem PAZAMI (pH 7,5) analysiert mit dem Programm PROCHECK. Glycine sind als Dreiecke dargestellt, alle anderen Aminosäuren werden durch Quadrate symbolisiert.

anderen Cupredoxinen und insbesondere in AZ [Azurin, (Baker, 1988; Nar *et al.*, 1991; Crane *et al.*, 2001)] beobachtet.

Diese Anordnung ist zuvor in keiner PAZ-Kristallstruktur beobachtet worden und ist auch leicht unterschiedlich zu derjenigen, die für AZ beobachtet wird [die zwei Moleküle im Dimer sind relativ zueinander gedreht mit dem Winkel zwischen den Achsen der Barrel und der Kupfer-zu-Kupfer-Abstand (12,3 Å) sowie der Winkel sind beide geringer als in AZ]. Die geänderte Packung von PAZAMI erzeugt eine andere Konformation des C-terminalen Asn122, welche schwache Wasserstoffbrückenbindungen mit dem N^ε von Lys101 über ein C-terminales Sauerstoffatom und zwischen seinem N^{δ2} und dem O^{ε1} von Gln89 bildet.

5.8.2. Strukturen der Kupferzentren. Allgemeine Bemerkungen

Die Geometrie eines Metallzentrums in einem bestimmten Protein wird durch eine Zahl von verschiedenen Faktoren bestimmt, und korreliert mit seinen spektroskopischen und funktionellen Eigenschaften. Bemerkenswerterweise können signifikante chemische Veränderungen am Metallzentrum manchmal nur zu feinen Unterschieden in der Geometrie führen, wie zum Beispiel die Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) in einem Cupredoxin, welche normalerweise den Bindungsabstand zwischen Metall und Ligand nur wenig bis 0,1 Å erhöht. Wenn man Metallzentren in Proteinen vergleicht, ist es wichtig die abgeschätzte Standardunsicherheit (ESU: *estimated standard uncertainty*) der Bindungsabstände und -winkel zu wissen.

Tabelle 13 zeigt 3 auf unterschiedliche Weise bestimmte ESUs für die vier in dieser Arbeit vorgelegten Strukturen. Die ESUs beziehen sich auf Koordinatenfehler und nicht auf Bindungsabstände und -winkel. Um die Werte für die Bindungsabstände zu erhalten, muss man zuerst die ESU mit $3^{1/2}$ multiplizieren, um die Positionsfehler eines einzelnen Atoms zu bekommen, und dann mit $2^{1/2}$, um die Fehlerfortpflanzung für den Bindungsabstand zu berücksichtigen. Die ESUs der Bindungsabstände zwischen Metall und Ligand, welche auf der Maximum-Likelihood (was gerechtfertigt ist, da sich das Metallzentrum an einer gut definierten Stelle der Proteinstruktur befindet) basieren, sind ~0,1 Å für die Struktur mit 1,30 Å Auflösung und ~0,3 Å für die mit 2,0 Å Auflösung.

Die ESUs der Bindungsabstände für die mit 1,30 Å aufgelösten Strukturen sind deshalb im Bereich der erwarteten Änderungen der aktiven Zentren nach Reduktion des Kupferions,

Tabelle 13: Kristallographische Datensammlung und Verfeinerungsstatistiken

	Cu(II)PAZAMI, pH 7,5	Cu(I)PAZAMI, pH 7,5	Cu(I)PAZAMI, pH 5,5	Cu(I)PAZAMI, pH 5,5
Datensammlung^a				
Wellenlänge (Å)	1,050	1,050	1,542	1,542
Raumgruppe	R32	R32	R32	R32
Auflösung (Å)	50,0 – 1,30 (1,35 – 1,30)	50,0 – 1,30 (1,35 – 1,30)	50,0 – 2,00 (2,07 – 2,00)	50,0 – 1,98 (2,05 – 1,98)
Zellkonstanten (Å)	$a = b = 105,63$, $c = 57,93$	$a = b = 105,76$, $c = 57,28$	$a = b = 105,57$, $c = 57,29$	$a = b = 105,36$, $c = 56,49$
Anzahl der einzelnen Reflexe	28824 (2149)	29429 (2780)	8274 (775)	8140 (541)
Redundanz	3,6 (3,2)	15,2 (11,7)	4,2 (3,5)	7,1 (3,8)
$I/\sigma(I)$	14,3 (3,1)	15,7 (3,6)	23,3 (6,3)	18,5 (2,8)
Completeness (%)	94,5 (71,4)	97,6 (94,0)	98,6 (94,4)	95,6 (64,3)
R_{merge}^b (%)	6,4 (29,0)	9,4 (39,1)	5,6 (18,6)	5,7 (22,0)
Verfeinerung^a				
Auflösung (Å)	20,0 – 1,30 (1,33 – 1,30)	30,0 – 1,30 (1,34 – 1,30)	30,0 – 2,00 (2,05 – 2,00)	30,0 – 1,99 (2,04 – 1,99)
R_{factor}^c (%)	19,5 (23,8)	19,2 (23,6)	16,6 (19,8)	16,3 (19,3)
R_{free}^c (%), test set 5%	22,6 (29,4)	20,1 (21,8)	20,4 (20,8)	23,0 (30,2)
rmsd Bindungslänge (Å)	0,010	0,008	0,017	0,016
Gesamtzahl von Atomen	1023	1026	991	1018
rmsd Bindungswinkel (°)	1,2	1,2	1,5	1,6
gemittelter B-Faktor (Protein, Å ²)	25,6	18,1	38,7	40,0
gemittelter B-Faktor (Wasser, Å ²)	30,9	30,0	40,0	43,8
B-Faktor (Kupfer, Å ²)	23,8	25,2	36,3	65,9
rmsd bonded B's ^d	1,4	1,4	1,8	2,0
ESU basiert auf R_{factor} (Å)	0,057	0,053	0,171	0,175
ESU basiert auf R_{free} (Å)	0,061	0,052	0,149	0,171
ESU basiert auf Maximum Likelihood (Å)	0,043	0,032	0,103	0,107

^a: Abbildungen in Klammern stellen Daten für die höchste Aufbenschale dar (wie gezeigt). ^b: $R_{\text{merge}} = \Sigma (I - \langle I \rangle) / \Sigma I$. ^c: $R_{\text{factor}} = \Sigma (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|) / \Sigma (|F_{\text{obs}}|)$. ^d: die Standardabweichung von gebundenen B-Faktoren ist ein Maß für die Glätte der B-Faktor-Verfeinerung

während die Genauigkeit der angegebenen Bindungsabstände in den mit 2,0 Å aufgelösten Strukturen dreifach niedriger ist.

Die Genauigkeit der Strukturbestimmung in dieser Arbeit ist weiter durch die Analyse von zwei Kristallen von Cu(I)-PAZAMI bei pH 7,5 abgeschätzt worden. Die Auflösung der Beugungsdaten für den zweiten Kristall (1,35 Å) war nur etwas schlechter als die vom angegebenen (1,30 Å) mit vergleichbaren ESU-Werten für Bindungslängen (Daten nicht gezeigt) zwischen Metall und Ligand. Die größte Abweichung zwischen den individuellen Metall-Ligand-Bindungen ist 0,07 Å, welche unterhalb des Genauigkeitsgrades für diese Strukturen ist. Diese Analyse beweist, dass zuverlässige Geometrien der Kupferzentren für Strukturen mit hoher Auflösung (1,30 Å) bestimmt worden sind.

5.8.3. Cu(II) PAZAMI bei pH 7,5

Das Modell des Kupferzentrums von oxidiertem PAZAMI bei pH 7,5 zusammen mit der 2Fo-2Fc-Elektronendichtekarte, konturiert bei 1,0 σ , ist in Abbildung 27 gezeigt.

Bei der Auflösung dieser Struktur (1,3 Å) gibt es Kontrahierungen in der Elektronendichte zwischen den individuellen Atomen und Lücken in den aromatischen Ringsystemen. Die Bindungsabstände und -winkel im verzerrten tetragonalen Kupferzentrum werden in der Tabelle 14 aufgelistet [die Geometrie des Kupferzentrums ist gleich in der Struktur von Cu(II)-PAZAMI bei diesem pH von 7,5 (Daten nicht angegeben), welches ein zusätzlicher Beweis für die Integrität des Cu(II)-Zentrums während der Datensammlung ist].

Die Überlagerung der aktiven Zentren, der Liganden enthaltenden Loops und deren Umgebung, von PAZAMI und PAZ sind in der Abbildung 28 gezeigt.

Die Wasserstoffbrückenbindung (siehe Tabelle 15) zwischen dem O^{δ1} von Asn9 und dem N^{ε2} von His40, welche die Position dieses Kupferliganden stabilisiert, wird in PAZAMI (der Imidazol-Ring von His40 ist leicht gedreht) beibehalten. Die Region zwischen Cystein- und Histidin-Ligand ist in beiden Proteinen sehr ähnlich, was aufgrund der Sequenzidentität nicht überraschend ist. Die Verkürzung des Abschnitts von Histidin bis Methionin und die Aminosäureaustausche in dieser Region haben einen beachtlichen Effekt auf die Struktur des aktiven Zentrums. Die Seitenketten der Cys78- und Met84-Liganden nehmen jedoch virtuell die gleichen Positionen wie in PAZ (Cys78 und Met86) ein. Der *tight turn* des eingefügten

AMI-Loops zwischen His81 und Met84 zusammen mit der Rigidität, erwirkt durch das eingefügte Pro82, führt zu einer leichten Rotation der Seitenkette von His81 in Richtung der Cystein- und Methionin-Liganden, welche das Kupferion weiter weg von der Ebene der drei äquatorialen Liganden (0,65 Å) als in PAZ (0,36 Å) in Richtung des axialen Methionin-Liganden schiebt. Das führt zu einer bedeutend kürzeren axialen Cu–S^δ(Met)-Bindung von 2,39 Å in PAZAMI verglichen mit denjenigen gefunden in PAZ (2,71 Å) (Inoue *et al.*, 1999), AMI (2,90 Å) (Cunane *et al.*, 1996), AZAMI (2,95 Å) (Li *et al.*, 2006), und allen anderen Cupredoxinen gefunden wird. Das einzige Typ 1-Kupferzentrum mit einer vergleichbaren kurzen Cu-(Met)-Bindung wird bei den Nitritreduktasen (2,45 – 2,49 Å) gefunden (Ellis *et al.*, 2003; Antonyuk *et al.*, 2005).

Eine zweite axiale Interaktion, welche den Hauptketten-Carbonylsauerstoff des Restes neben dem N-terminalen Histidin-Ligand einbezieht, wird beim aktiven Zentrum von AZ (Gly45,

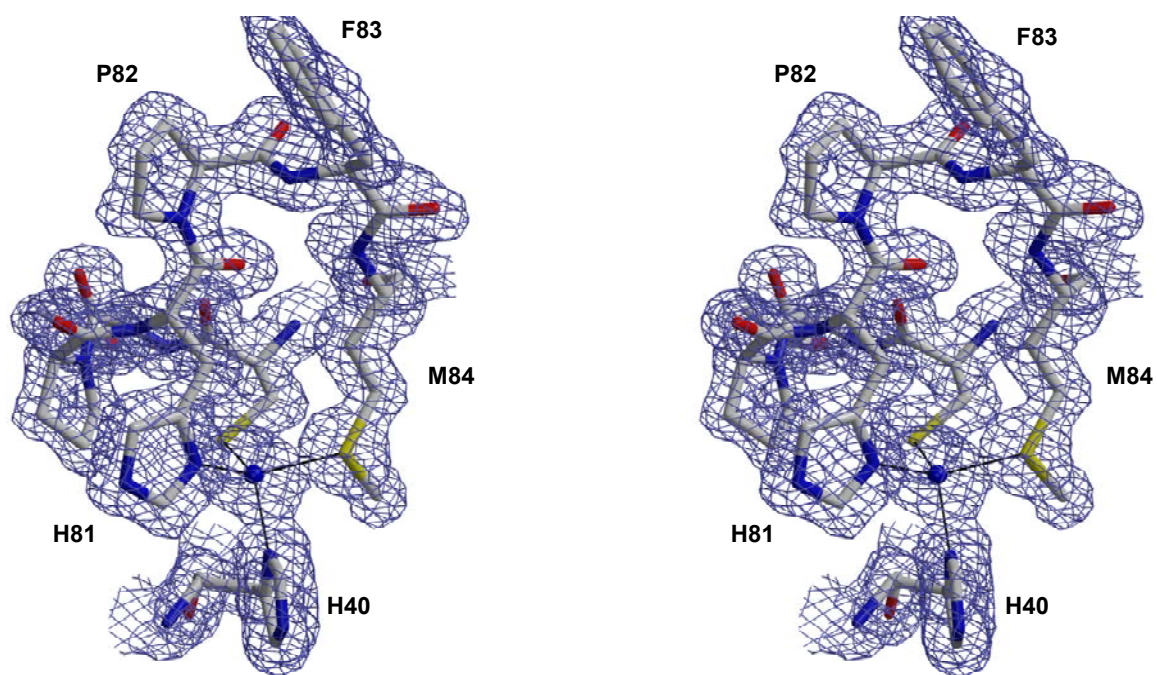


Abb. 27: Stereo-Darstellung, die ein Modell des Cu(II)-Zentrums und die Loop-Region von PAZAMI mit deren Liganden bei einem pH-Wert von 7,5 zeigt. Die 2Fo – Fc Elektronendichtekarte wurde bei 1,0 σ konturiert. Die Liganden und die mutierten Reste auf dem Loop sind markiert.

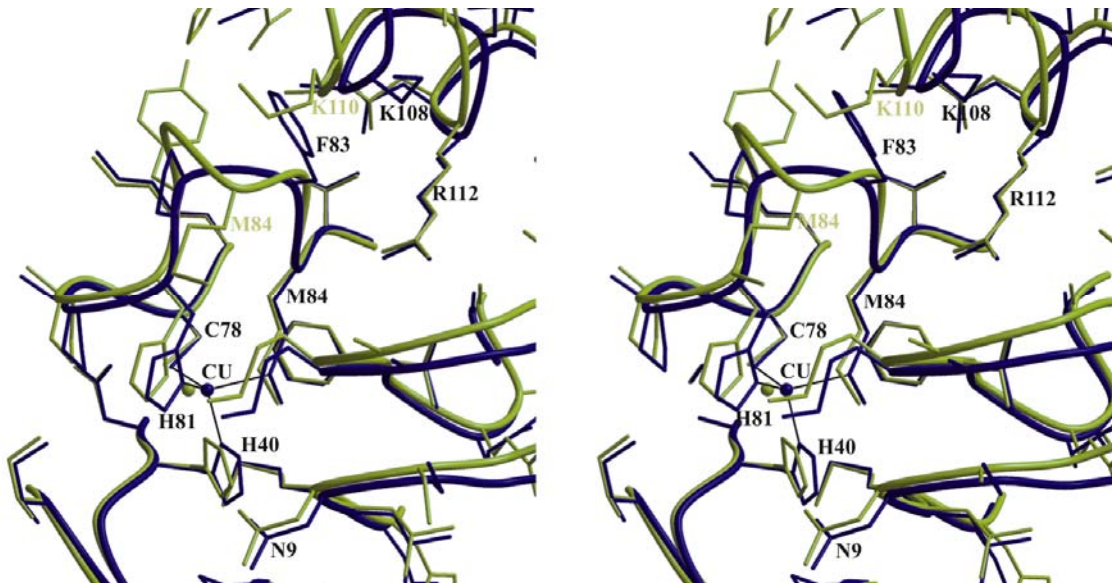


Abb. 28: Stereo-Darstellung, die eine Überlagerung der Cu(II)-Zentren, der C-terminalen Loops mit deren Liganden und die angrenzenden Regionen von PAZAMI bei pH 7,5 (blau) und Paz (1BQK, pH 6,0, gelb)(Inoue *et al.*, 1999) zeigt. Wichtige Aminosäuren sind markiert einschließlich der Reste, welche als Liganden fungieren und in PAZAMI die gleiche Nummerierung besitzen.

welches zu His46 benachbart ist) gefunden (Baker, 1988; Nar *et al.*, 1991; Crane *et al.*, 2001).

Der entsprechende Rest in PAZ ist Gly39, dessen Carbonyl-Gruppe der Hauptkette deutlich weiter vom Kupfer entfernt gelegen ist (3.94 Å) (Inoue *et al.*, 1999). Die Bewegung des Kupfers in PAZAMI schwächt diese Interaktion (4.41 Å) weiter ab.

Die Überlagerung der aktiven Zentren von PAZAMI und AMI (Cunane *et al.*, 1996) ist in der Abbildung 29 gezeigt. Die Struktur des Loops ist sehr verschieden in diesen beiden Proteinen (trotz gleicher Sequenz), und das ist besonders signifikant für den Histidin-Liganden und die folgenden Prolin- und Phenylreste. Die erste erhebliche Veränderung im Loop wird bei His81 gefunden mit den ϕ/ψ Dihedralwinkeln in der Hauptkette von $-122^\circ/-76^\circ$ für PAZAMI im Vergleich zu $-132^\circ/-108^\circ$ für AMI mit nachfolgenden Änderungen in der Konformation vom Pro82 (ψ beträgt 148° in PAZAMI und 169° in AMI). Beachtliche Unterschiede werden auch für Phe83 mit Dihedralwinkeln in der Hauptkette von $96^\circ/179^\circ$ in PAZAMI und $-70^\circ/166^\circ$ in AMI beobachtet.

Die χ_1/χ_2 Dihedralwinkel in der Seitenkette von Phe83 sind auch sehr verschieden in PAZAMI ($-53^\circ/26^\circ$; das ist nahe an den üblichen Werten für Phenylreste) von denen in AMI ($51^\circ/82^\circ$; dritthäufigste Konformation). Die Konformation der Hauptkette ist für den Methionin-Liganden ähnlich, aber für seine Seitenkette verschieden (siehe unten).

Die unterschiedliche Konformation und Position des Loops in PAZAMI und AMI scheint durch das Wasserstoffbrückenbindungsmuster um Arg112 und Arg99 herum, sowohl in PAZAMI als auch in AMI, verursacht zu sein. In PAZAMI bildet das $N^{\eta 1}$ -Atom von Arg112 eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Hauptketten-Carbonylsauerstoff von Phe83 und Met16, während das $N^{\eta 2}$ -Atom eine mit dem Hauptketten-Carbonylsauerstoff von Ala15 bildet (siehe Abbildung 29). Die erste Wechselwirkung verursacht die Drehung des Kupferbindenden Loops. Die anderen zwei sind für die Fixierung des Turns in der Region um den Rest 15 herum verantwortlich, sowohl in PAZAMI als auch in PAZ. In AMI, dem die C-terminale Verlängerung von PAZAMI fehlt, aus welcher Arg112 herrührt, bildet Arg99 zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen seinen N^ϵ und $N^{\eta 1}$ Atomen und dem Carbonylsauerstoff der Hauptkette von Pro96 (siehe Abbildung 29 und Tabelle 15), welches die Konformation des Loops fixiert. Die Unterschiede in den Hauptketten von PAZAMI und AMI sind zum Teil für die veränderten Konformationen der Seitenketten des Phenylrestes auf dem Loop verantwortlich. Zusätzlich ist der Loop, der in AMI Met28 enthält, ausreichend entfernt, um Phe97 zu erlauben, die beobachtete Konformation einzunehmen. In PAZAMI wird die Region, welche Ala15 und Met16 enthält, zum C-terminalen Ligandenloop verschoben. Dabei verhindert die Seitenkette von Met16, dass Phe83 die gleiche Konformation annimmt, wie Phe97 in AMI. Die Seitenkette des axialen Methionin-Liganden nimmt eine All-trans-Konformation bei $C^\alpha-C^\beta$ (Torsionswinkel χ_1) und $C^\gamma-S^\delta$ (χ_3) in PAZAMI an, hingegen in AMI (Cunane *et al.*, 1996) eine Gauche-Anordnung [die Anordnung in PAZAMI ist die gleiche, wie die, welche in PAZ (Inoue *et al.*, 1999); siehe Abbildungen 28 und 29 gefunden wird]. Die geänderte Methionin Konformation wird wahrscheinlich verursacht durch die Lage des Turns in der Region um den Rest 15 herum. Der Abstand zwischen dem C^β von Met84 und dem Carbonylsauerstoff der Hauptkette von Met16 würde nur 2,5 Å betragen, wenn die Seitenkette von Met84 eine Gauche-Konformation in PAZAMI annehmen würde (siehe Abbildung 29). Die Konformation des Metall-bindenden Loops in AMI bewegt die Cys92 und His95-Liganden weiter weg vom koordinierenden S^δ des axialen

Met98 und bildet dabei ein Typ 1-Kupferzentrum mit unterschiedlichen Bindungslängen der Kupfer-liganden (siehe Tabelle 14) (Cunane *et al.*, 1996).

Es gibt signifikant weniger Wasserstoffbrückenbindungen um das aktive Zentrum von PAZAMI herum als in PAZ (siehe Tabelle 15) mit einer ähnlichen Anzahl zu der, die in AMI gefunden wurde. Dies ist auch für AZAMI (Li *et al.*, 2006) und AZPC (Li *et al.*, 2007) Loop-Varianten der Fall, welche Muster von Wasserstoffbrückenbindungen in der Nachbarschaft des Loops des aktiven Zentrums besitzen, ähnlich zu denen bezüglich AMI und PC.

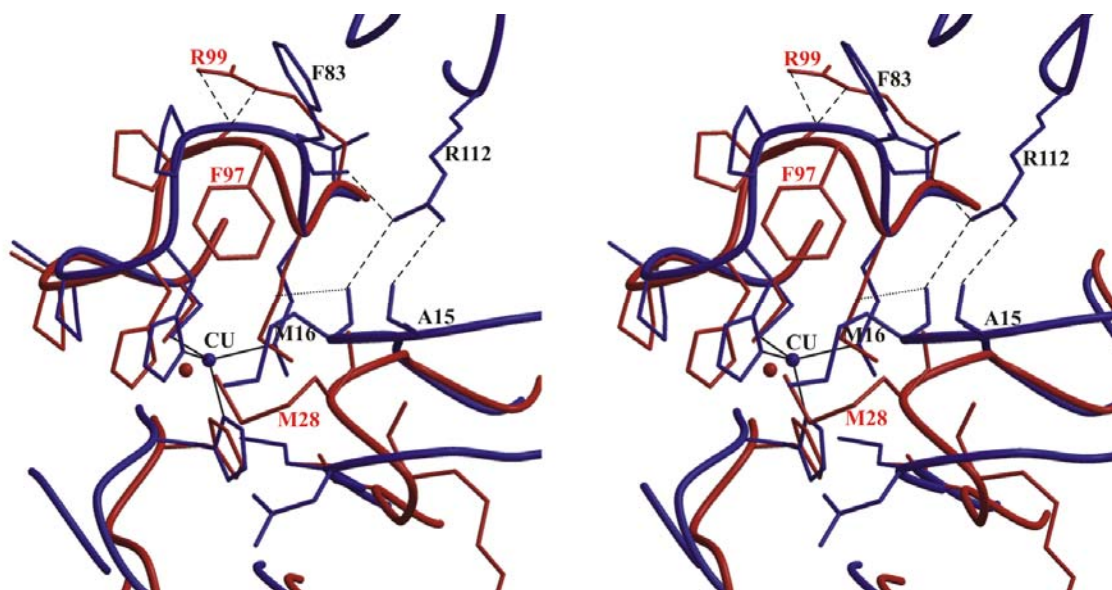


Abb. 29: Stereo-Darstellung, die eine Überlagerung der Cu(II)-Zentren, der C-terminalen Loops mit deren Liganden für Kupfer und die angrenzenden Regionen von PAZAMI bei pH 7,5 (blau) und AMI (1AAC, rot) (Cunane *et al.*, 1996) zeigt. Eine Anzahl wichtiger Aminosäuren in der Umgebung des aktiven Zentrums ist markiert und gewisse wichtige Wasserstoffbrückenbindungen werden als gestrichelte Linien dargestellt. Der vermutlich enge Kontakt zwischen dem Hauptketten-Carbonylsauerstoff von Met16 in PAZAMI und dem C γ von Met98 von AMI, welche entstehen würde, wenn die Seitenkette dieses Ligands eine Gauche-Anordnung in PAZAMI annimmt, ist als gepunktete Linie gezeigt.

Eine besonders wichtige Wasserstoffbrückenbindung ist diejenige, die zu dem koordinierenden Cystein von der Amid-Gruppe der Hauptkette vom Rest (gewöhnlich Asn) benachbart zu dem N-terminalen Histidin-Liganden geht. Diese ist sowohl in PAZAMI als auch in anderen Cupredoxinen vorhanden. Es scheint auch schwache Interaktionen zwischen dem koordinierenden Thiolat und der Amid-Gruppe der Hauptkette des Histidin-Liganden auf dem Loop zu geben (diese Wechselwirkung ist etwas schwächer in PAZAMI (siehe Tabelle 15).

Tabelle 14: Geometrie des aktiven Zentrums von Cu(II)- und Cu(I)PAZAMI sowie das von Cu(II)PAZ, -AMI, -AZ und -AZAMI

	Cu(II)PAZAMI pH 7,5 ^a	Cu(II)PAZAMI pH 5,5 ^a	Cu(I)PAZAMI pH 7,5 ^a	Cu(I)PAZAMI pH 5,5 ^a	Cu(I)PAZAMI pH 5,5 ^a	Cu(I)PAZ (1BQK) ^b	Cu(I)PAZ (1BQR) ^b	Cu(II)AMI (1AAC) ^c	Cu(II)AZAMI (2FTA) ^d	Cu(II)AZ (4AZU) ^e	Cu(II)AZ (1JZF) ^f
Kupfer-Ligand- Bindungsabstände											
Cu-N ^{δ1} (His40)	2,09	2,10	2,05	2,16	1,95	2,04	1,95	1,98	2,08	2,02	
Cu-S ^γ (Cys78)	2,22	2,27	2,10	2,14	2,13	2,19	2,11	2,14	2,24	2,21	
Cu-N ^{δ1} (His81)	2,09	2,24	2,50	2,64	1,92	2,11	2,03	2,09	2,01	2,08	
Cu-S ^δ (Met84)	2,39	2,38	2,37	2,43	2,71	2,85	2,90	3,29	3,15	3,32	
Cu zu O(Gly39)	4,41		4,50	4,62	3,94	4,04	3,92	3,19	2,97	2,60	
Cu zu N ^{δ1} ₂ S ^γ -Ebene	0,65	0,64	0,76	0,81	0,36	0,38	0,30	0,14	0,08	0,01	
ESU ^g	0,10	0,30	0,10	0,30							
Winkel (in Grad)											
His40-Cu-Cys78	129	134	130	129	135	132	136	134	132	132	
His40-Cu-His81	95	92	89	85	100	102	104	102	105	105	
His40-Cu-Met84	90	88	95	95	87	90	85	76	77	72	
Cys78-Cu-His81	108	107	101	104	114	116	113	123	123	123	
Cys78-Cu-Met84	116	116	123	124	107	107	111	112	110	110	
His81-Cu-Met84	118	118	117	115	107	104	100	92	87	85	
Gly45-Cu-His46								79	74	80	
Gly45-Cu-Cys112								97	99	97	
Gly45-Cu-His117								81	89	92	
Gly45-Cu-Met121								151	148	150	
Φ ^h	71	68			76		79	81	84	83	

^a: Daten für die Loop-Verkürzung-Variante von PAZAMI bestimmt in dieser Arbeit. Die aufgelisteten Liganden sind für PAZAMI. Gly39 ist zu weit vom Kupferion entfernt, um als einer der Liganden von PAZAMI betrachtet zu werden (und von PAZ und AMI), aber zu nah zum Metall in AZ und seinen Loop-Verkürzung-Varianten (AZAMI gezeigt hier). ^b: Wildtyp Cu(II)PAZ von *Achromobacter cycloclastes* bei pH 6,0, im welchem die Liganden die gleichen wie in PAZAMI sind, mit der Ausnahme, dass Met86 an der Stelle von Met84 gefunden wird. ^c: AMI von *Paracoccus denitrificans* bei pH 5-6, im welchem die Liganden His53, Cys92, His95 und Met98 sind. Pro52 wird an der Stelle von Gly39 gefunden. ^d: Die Loop-Verkürzung-Variante von AZAMI bei pH ~7 (Mittelwert für alle vier Ketten), in welcher die Liganden His46, Cys112, His115 und Met118 sind. Gly45 wird an der Stelle von Gly39 gefunden. ^e: Ru(II)(tpy)(phe)-modifiziertes AZ von *P. aeruginosa*. ^f: Abgeschätzte Standardunsicherheit der Bindungsabstände. ^g: Winkel zwischen N_{His}CuN_{His} und S_{Cys}CuS_{Met}-Ebenen

Die Lösungsmittelstruktur in der Nähe des aktiven Zentrums ist sehr ähnlich in PAZAMI und PAZ, und ziemlich unterschiedlich zu derjenigen, die in AMI beobachtet wird. Das Oberflächen-exponierte His81 und sein Symmetrie-verwandter Rest, bilden über ihre N^{ε2}-Atome Wasserstoffbrückenbindungen zu einem gut definierten Wassermolekül (W16) aus, welches auf der zweifachen kristallographischen Achse liegt. PAZ (Inoue *et al.*, 1999) und andere Cupredoxine, solche wie PC (Guss *et al.*, 1986) und AZ (Baker, 1988; Nar *et al.*, 1991; Crane *et al.*, 2001) zeigen ein ähnliches Wassermolekül in ihren oxidierten Formen, aber dieses ist gewöhnlich an zwei Symmetrie-verwandte C-terminale His-Liganden gebunden. Das Wassermolekül, welches mit dem Hauptketten-Carbonylsauerstoff von Gly39 Wasserstoffbrücken bildet, ist etwas weiter vom Kupfer in PAZAMI als in PAZ (jeweils 6,4 Å verglichen zu 6,0 Å) entfernt. Dies ist analog zur Wegbewegung des Metallions von diesem Rest. Zusätzlich ist ein Wassermolekül, welches zum Hauptketten-Carbonylsauerstoff von Pro80 eine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet, auch weiter entfernt vom Kupfer im PAZAMI als im Wildtyp-Protein.

5.8.4. Cu(II) PAZAMI bei pH 5,5

Die Geometrie des Cu(II)-Zentrums in PAZAMI bei pH 5,5 ändert sich sehr wenig im Vergleich zu der bei höherem pH-Wert (siehe Tabelle 14).

Der einzige wirkliche Unterschied ist die kleine Zunahme des Cu–N^{δ1}(His81)-Bindungsabstandes von 2,09 Å bei höherem pH-Wert zu 2,24 Å in der niedrigen pH-Form, welche von einer Zunahme des His40-Kupfer-Cy78-Bindungswinkels von 129° zu 134° begleitet wird. Die pH-Änderung generiert eine Abnahme der c-Zellkonstante von ungefähr 0,6 Å. Diese minimale Zunahme in der Dichte der Kristallpackung in diese Richtung sollte jedoch keinen Einfluss auf den Cu–N^{δ1}(His81)-Bindungsabstand haben, weil die Kristallkontakte dieses Oberflächen-exponierten Liganden über das Wassermolekül 16 zu His81 des Symmetrie-verwandten Nachbarmoleküls vermittelt wird. Das Protein hat kein Kupfer verloren, was durch einen B-Faktor im Bereich derjenigen der Proteinatome angezeigt wird (siehe Tabelle 13). Signifikante Änderungen des aktiven Zentrums in diesen pH-Bereich des Cu(II)-Proteins wurden nicht erwartet und die vorhandene Vergrößerung des Cu–N^{δ1}(His81)-Bindungsabstandes ist auf die geringere Genauigkeit dieser Struktur zurückzuführen.

5.8.5. Cu(I) PAZAMI bei pH 7,5

Das Modell des Kupferzentrums von reduziertem PAZAMI [Cu(I)] bei pH 7,5 zusammen mit der 2Fo-Fc Elektronendichtekarte konturiert bei $1,0 \sigma$ ist in Abbildung 30 gezeigt. Die Bindungsabstände und -winkel sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Es wäre zu erwarten, dass aufgrund des größeren ionischen Radius von Cu(I) im Vergleich zu Cu(II), die Reduktion leicht die Bindungsabstände zwischen Metall und Ligand erhöhen sollte. In PAZAMI nimmt die Cu-S^γ(Cys78)-Bindung nach der Reduktion um 0,12 Å ab, während der Abstand von Cu zu N^{δ1}(His81) von 2,09 Å auf 2,50 Å zunimmt. Eine sorgfältige Analyse der Elektronendichte zeigt, dass es eine restliche negative Differenzdichte am Kupferzentrum (siehe Abbildung 30) gibt, und dass die Dichte zwischen dem Kupferion und dem Imidazol-Ring von His81 unterbrochen ist. Das deutet darauf hin, dass die Struktur des Kupferzentrums als eine Mischung von zwei Formen besteht, eine mit His81 protoniert und vom Cu(I) dissoziiert und die zweite mit His81 als Ligand.

Die negative Differenzelektronendichte am Cu(I)-Kupfer-Zentrum zeigt einen Kupferverlust an, der höchstwahrscheinlich in der dissoziierten Form auftritt, weil das Kupfer in dieser Form nur an drei Liganden gebunden ist. Die Beobachtung der dissoziierten Form ist vereinbar mit dem pK_s-Wert von 6,7 für His81, welcher aus Studien in Lösung von Cu(I)-PAZAMI (Yanagisawa und Dennison 2003; Yanagisawa und Dennison 2004), bestimmt wurde, welcher nahe dem pH-Wert dieser Kristallform ist (Es ist schwierig den genauen pH-Wert in den Kristallen zu bestimmen). Ein flexiblerer Metall-bindender Loop bei der protonierten Form wurde durch eine weniger gut definierte Elektronendichte für die Seitenketten von Pro82 und Phe83 in Cu(I)-PAZAMI (siehe Abbildung 30) identifiziert. Ferner ist das Wasserstoffmolekül, das eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem N^{ε2}-Atom des His81 [W16 in Cu(II) PAZAMI bei pH 7,5] bildet, weniger gut definiert in Cu(I) PAZAMI (pH 7,5), was angezeigt wird durch die Zunahme seines B-Faktors von 17 Å² auf 34 Å². Das kann durch partielle Besetzung dieser Wasserposition erklärt werden, was durch den Anteil an Molekülen verursacht wird, in welchen der C-terminale His-Ligand protoniert ist. Das Wassermolekül, das am Hauptketten-Carbonylsauerstoff von Pro80 in der Cu(II)-Form durch Wasserstoffbrücken gebunden ist, wird in einer Position gefunden, welche räumlich mit der normalen Position des Histidin-Rings inkompatibel ist, es sei denn, der Imidazol-Rest wird um 180° um die C^β-C^γ-Bindung gedreht. Das N^{ε2}-Atom bildet eine Wasserstoffbrücken-

bindung zu diesem verschobenen Wassermolekül und das ehemalige Wassermolekül (W16) kann nicht mehr mit dem Imidazol-Ring interagieren. Solch eine Ringrotation und Neuordnung der Wasserstruktur wurde erstmals in PC bei niedrigem pH-Wert beobachtet (Guss *et al.*, 1986). Da der His-Ligand protoniert ist, wird die Cu–S^γ(Cys78)-Bindung verkürzt, um den Koordinationsanforderungen des zweiwertigen Kupferions gerecht zu werden.

Der Abstand zwischen dem Kupfer und der N^δ₂S^γ-Fläche ist noch im Bereich der Strukturen von Cu(II)-PAZAMI (~0,7 Å), im Gegensatz zu reduziertem PC bei pH 3,8, wo das Kupfer in dieser Ebene liegt (Guss *et al.*, 1986).

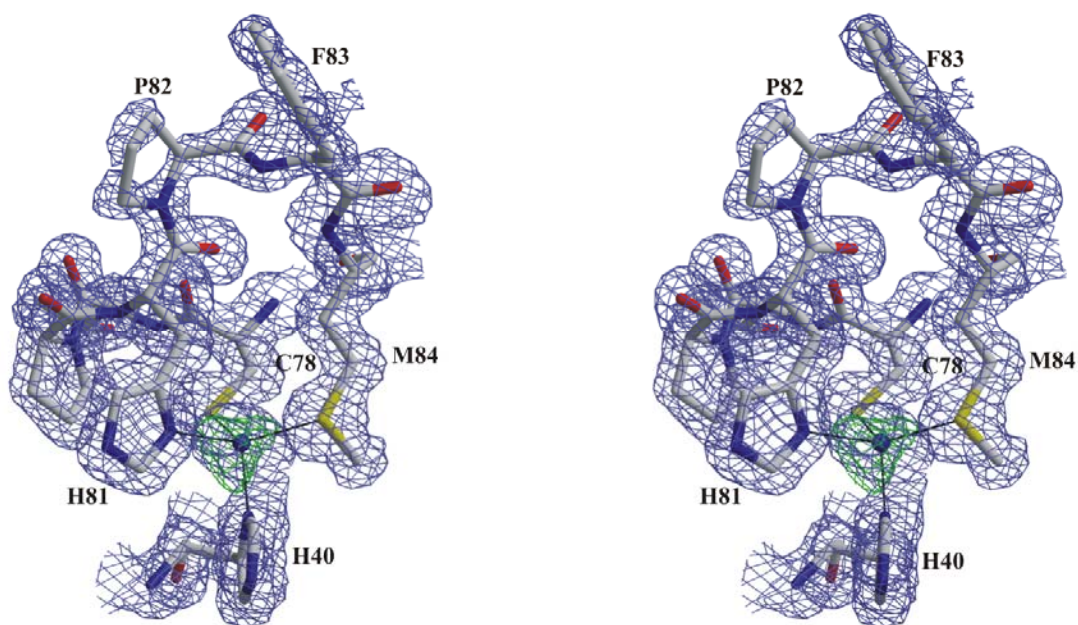


Abb. 30: Stereo-Darstellung, die ein Modell des Cu(I)-Zentrums und die Loop-Region von PAZAMI mit deren Liganden bei einem pH-Wert von 7,5 zeigt. Die 2Fo – Fc (konturiert bei 1,0 σ , blau) und die Fo – Fc (konturiert bei -3,0 σ , grün) Elektronendichten sind auch gezeigt. Die Liganden und die mutierten Reste auf dem Loop sind markiert.

5.8.6. Cu(I) PAZAMI bei pH 5,5

Bei diesem pH-Wert hat der Abstand vom Kupfer zum N^δ(His81) auf 2,64 Å zugenommen, was zeigt, dass der Grad der Protonierung größer ist als bei pH 7,5.

Die Wasserstruktur um den Imidazol-Ring von His81 ist wie in Cu(I)-PAZAMI bei pH 7,5 neu angeordnet und das Wassermolekül, welches W16 in Cu(II)-PAZAMI bei pH 7,5 entspricht, ist sogar weniger besetzt, als das in der reduzierten Struktur bei pH 7,5.

Das ist ein weiterer Beweis für die Protonierung des Imidazol-Rings von His81, aber der Effekt ist nicht vollständig und die Cu(I)-Kristalle waren nicht ausreichend stabil bei noch niedrigeren pH-Werten, um brauchbare Daten sammeln zu können.

Eine teilweise Entfernung des Kupfers hat auch in dieser Struktur stattgefunden, was durch negative Restelektronendichte am Cu(I)-Zentrum angezeigt wird. Dieser Verlust wird höchstwahrscheinlich in der protonierten Form auftreten (siehe oben).

6. Diskussion -PAZAMI

Die Strukturen von PAZAMI mit atomarer Auflösung wurden durch Röntgenkristallographie bestimmt, um den Effekt einer Loop-Verkürzung auf die funktionellen Eigenschaften des Proteins zu verstehen. Das Einfügen des kurzen AMI-Loops wurde verglichen in einer Anzahl von unterschiedlichen Cupredoxin-Gerüsten (Yanagisawa und Dennison, 2003; Yanagisawa und Dennison, 2004) und wie beobachtet wurde, ist der Gesamteinfluss im PAZAMI am größten. Zuvor wurden die Struktur von AZAMI, sowie die von anderen Varianten, an denen Loop-Verkürzungen auf der Grundlage des AZ-Gerüsts durchgeführt wurden, bestimmt. Die in dieser Arbeit bestimmten Strukturen von PAZAMI erlaubten den Einfluss des Einfügens des AMI-Loops in zwei sehr unterschiedliche Cupredoxin-Faltungen im molekularen Detail einzuschätzen (siehe Abbildung 31).

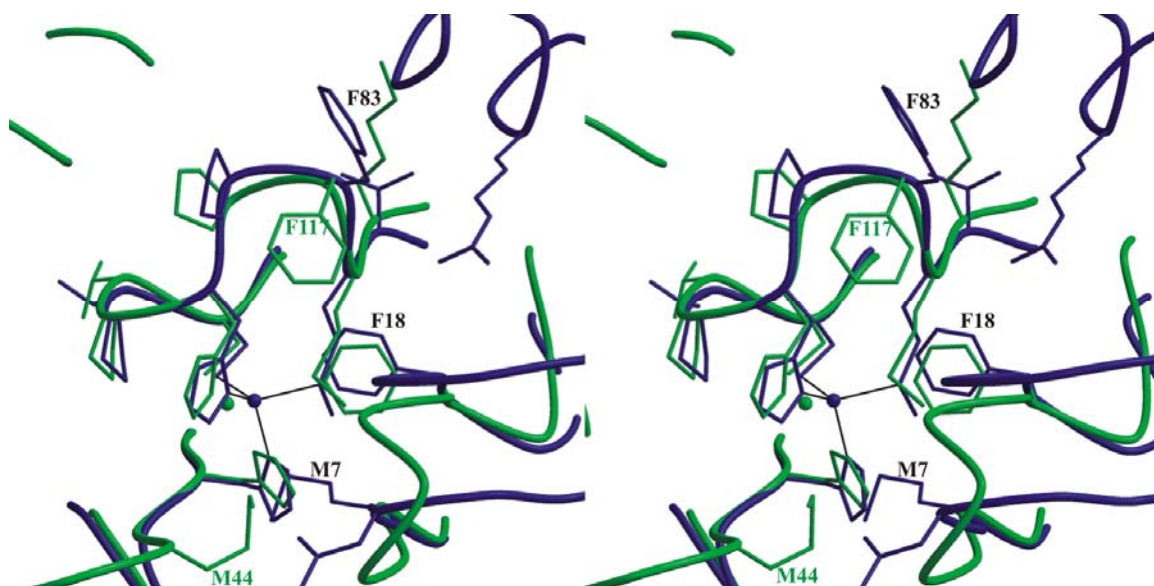


Abb. 31: Stereo-Darstellung, die eine Überlagerung der Cu(II)-Zentren, der C-terminalen Kupferbindungsloops und die angrenzenden Regionen von PAZAMI bei pH 7,5 (blau) und AZAMI (2FTA grün) zeigt (Li *et al.*, 2006). Eine Zahl wichtiger Aminosäuren in der Umgebung des aktiven Zentrums ist markiert (einige Markierungen anwesend in Abbildungen 28 und 29 und die Seitenketten der Reste um Met15 von PAZAMI wurden ausgelassen, um der Klarheit willen).

Die relativen Intensitäten der zwei Cys(S)→Cu(II) LMCT-Banden (A_{460}/A_{600}) im sichtbaren Spektrum von PAZAMI (0,54; siehe Abbildung 22) zeigen, dass sein Typ 1-Cu(II)-Zentrum mehr als das von PAZ (0,45) verzerrt ist. Die Verschiebung des Kupferions aus der $N\delta_2S\gamma$ -Ebene ist im PAZAMI fast verdoppelt (verglichen mit PAZ), was zu einer Erhöhung der Bindungslängen zu diesen drei äquatorialen Liganden einschließlich zu dem koordinierenden Cys führt. Dieses Cystein ist entscheidend für die spektroskopischen Eigenschaften, welche die Typ 1-Kupferzentren aufweisen (Gray *et al.*, 2000; Dennison, 2005; LaCroix *et al.*, 1996; LaCroix *et al.*, 1998). Das ist mit der sehr erhöhten Stärke der Cu-S(Met) axialen Interaktion übereinstimmend, was zur kürzesten Bindungslänge führt, welche jemals in einem Typ 1-Kupferzentrum (2,39 Å) gesehen wurde, und was Anlass zu einer mehr tetragonalen Struktur des aktiven Zentrums ist, wie durch eine 5°-Abnahme der Dihedralwinkel (ϕ) zwischen den $N_{His}CuN_{His}$ - und $S_{Cys}Cu-S_{Met}$ -Ebenen zu erkennen ist (siehe Tabelle 14). Diese Änderungen in der Geometrie stimmen mit Solomons gekoppeltem Verzerrungsmodell überein, welches abgeleitet wurde, um die spektroskopischen Unterschiede zwischen verzerrten und klassischen Typ 1-Kupferzentren zu erklären (LaCroix *et al.*, 1996; LaCroix *et al.*, 1998). Dieses Modell schreibt die in den verzerrten Typ 1-Kupferzentren gesehenen Unterschiede (diejenigen mit verstärkter Absorption bei ungefähr 460 nm und gewöhnlich eher rhombischen EPR-Spektren) einer initialen Verkürzung der Cu-S(Met)-Bindung zu, welche zu einer tetragonalen Jahn-Teller-Verzerrung führt. Diese Verzerrung bezieht die gekoppelten Drehungen von Cys- und Met-Liganden ein. Es ist möglicherweise ein wenig überraschend, dass die Geometrie des aktiven Zentrums im PAZAMI verglichen mit PAZ so unterschiedlich ist, in Anbetracht, dass einige Eigenschaften, insbesondere die EPR- und NMR-Spektren des Cu(II)-Proteins im Grossen und Ganzen, sehr ähnlich zu denen von PAZ sind. Die meisten der direkt beobachteten *hyperfine-shifted*-Resonanzen im 1H NMR-Spektrum der Cu(II)-Proteine sind jedoch nicht hoch empfindlich auf strukturelle Veränderungen an den Typ 1-Kupferzentren (Bertini *et al.*, 2000; Sato und Dennison, 2002; Donaire *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2003). Es wurde zuvor beobachtet, dass die Korrelation zwischen dem Dihedralwinkel ϕ und die rhombicity der EPR-Spektren der Typ 1-Kupferproteine nicht eindeutig sind (van Gestel *et al.*, 2001). Ferner hat die Mutation des axialen Met182-Liganden zu Thr beim Typ 1-Kupferzentrum der Nitritreduktase von *Rhodobacter sphaeroides*, welche das UV/Vis-Spektrum beeinflusst, fast

Tabelle 15: Wasserstoffbindungsmuster um den C-terminalen Liganden-enthaltenden Loops von PAZAMI, PAZ und AMI

	Atom X	Atom Y	PAZAMI ^a	PAZ (1BQK) ^b	AMI (1AAC) ^c
Hauptkette-Hauptkette^d					
	Cys78 N	Met84 O	3,0	3,0	3,2
	His81 N	Cys78 O	3,3	3,2	3,1
	Met84 N	His81 O	3,0	3,1 ^e	2,9
	Gly85 N	Tyr82 O		3,0 ^e	
	Met84 N	His81 O		3,0 ^e	
	Tyr82 N	Cys78 O		3,0 ^e	
	Tyr82 N	Thr79 O		3,6 ^e	
Hauptkette-Seitenkette					
	Thr79 N	Asn41 O ^{δ1}	2,8	2,8	2,8
	Asn41 N	Cys78 S ^γ	3,5	3,6	3,6
	His81 N	Cys78 S ^γ	4,2	4,0	4,0
	Phe83 O	Arg112 N ^η	2,9	3,0	
	Pro96 O	Arg99 N ^{ε1}			2,7 ^f
	Pro96 O	Arg99 N ^{η2}			3,2 ^f
Seitenkette-Seitenkette					
	Asn9 O ^{δ1}	His40 N ^{ε2}	2,8	2,8	2,7
	Asn41 N ^{δ2}	Thr79 O ^{γ1}	3,0	3,0	2,9
	Glu43 O ^{ε2}	Thr79 O ^{γ1}	2,7	2,8	2,7 ^f

^a: Cu(II)PAZAMI dieser Arbeit bei pH 7,5. ^b: Cu(II)PAZ von *Achromobacter cycloclastes* bei pH 6,0. ^c: AMI von *Paracoccus denitrificans* bei pH 5-6. ^d: Die Nummerierung der Reste ist hauptsächlich wie in PAZAMI gefunden. In PAZ, Gly85, Met86 und Arg114 ersetzen Phe83, Met84 und Arg112, während PAZ auch einen Met-Rest an der Position 84 hat. In AMI Glu49, Asn54, His56, Cys92, Thr93, His95 und Met98 ersetzen Asn9, Asn41, Glu43, Cys78, Thr79, His81 und Met84.

^e: Localisiert im langen C-terminal Liganden-Loop von PAZ, welcher Met84 und Met86 einschließt. ^f: Spezifisch für AMI und im Falle von His56 (welches dem Glu43 in PAZAMI entspricht) ist das N^{δ1}-Atom verwickelt.

keinen Effekt auf die EPR-Eigenschaften (Olesen *et al.*, 1998). Der Verlust eines starken axialen Liganden wird durch eine verlängerte Cu–S(Cys)-Bindung in dieser Variante ausgeglichen, was zu einer ähnlichen Ligandenfeldstärke wie bei dem Wildtyp-Protein führt (Basumallick *et al.*, 2003). Es sollte auch nicht übersehen werden, dass blaue und grüne Nitritreduktasen, welche entsprechende klassische und verzerrte Typ 1-Kupferzentren besitzen, sehr ähnliche Cu-S(Met)-Bindungslängen haben (Sato und Dennison, 2006). Die sehr kurze Cu-S(Met)-Bindung in PAZAMI entsteht aus dem Einführen des AMI-Loops in das PAZ-Gerüst, welcher eine verschiedene Konformation als in AMI annehmen muss, was besonders für die His bis Met-Region (siehe Abbildung 29) der Fall ist. In AZAMI kann der eingefügte Loop in eine Konformation wie in AMI annehmen, und der Einfluss auf die Struktur des aktiven Zentrums wird minimal (Li *et al.*, 2006). Der Vergleich der Strukturen von PAZAMI und AZAMI zeigt, dass das Gerüst die Geometrie eines Metallzentrums in einem Protein beeinflussen kann (siehe Abbildung 31).

Eine Abnahme von ungefähr 50 mV im E_m wird beobachtet, wenn der AMI-Loop in AZ eingeführt wurde, was zu einem Wert fast identisch dem von AMI führt (Yanagisawa und Dennison, 2004; Li *et al.*, 2006). Das Einführen des PC-Loops in AZ erhöht den E_m auf einen Wert, der fast identisch ist dem von PC (Li *et al.*, 2007). In diesen AZ-Chimären nehmen die eingeführten AMI- und PC-Loops fast identische Konformationen wie in AMI und PC an (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Es sind nur begrenzte strukturelle Änderungen im aktiven Zentrum dieser Varianten und folglich wurde erkannt, dass die Struktur des Loops eine wichtige Rolle beim Abstimmen der E_m -Werte von Typ 1-Kupferzentren spielt, mit Beiträgen von Proteindipolen in dieser Region als wichtigstes Merkmal (Li *et al.*, 2007; Olsson *et al.*, 2003). Wenn der AMI-Loop in das PAZ-Gerüst eingepflanzt ist, wird der E_m -Wert in einem ähnlichen Umfang wie in AZAMI erniedrigt, aber der resultierende Wert ist signifikant niedriger als der von AMI [PAZ und AMI haben ähnliche E_m -Werte (Yanagisawa und Dennison, 2003; Yanagisawa und Dennison, 2004)]. Die Struktur des AMI-Loops in PAZAMI ist sehr unterschiedlich zu denjenigen, welche in AMI und AZAMI gefunden wurden. Hauptunterschiede wurden für die Konformationen der Pro- und Phe-Reste in dieser Region gefunden, wobei letzterer sich gegen den oberen Teil der langen C-terminalen α -Helix von PAZAMI stapelt. Es sollte deshalb erwartet werden, dass der Einfluss der Protein-

dipole in der Loop-Region unterschiedlich in PAZAMI verglichen zu AZAMI sein wird. Die Loop-Veränderungen führen zu einer großen Abnahme in der Lösungsmittelzugänglichkeit des Phe-Restes in PAZAMI verglichen mit AMI, welches ein Hauptdonor zur erniedrigten Lösungsmittelzugänglichkeit dieser Region in PAZAMI ist (der Loop ist sogar weniger Lösungsmittel-zugänglich in AZAMI, besonders im Cys- bis His-Teil). Die Löslichkeitszugänglichkeit der koordinierenden Reste ist jedoch ähnlich in PAZAMI, PAZ, AZAMI und AMI. Diese Vergleiche sind wichtig, da gefunden wurde, dass die Thermodynamik der Reduktion der Typ 1-Kupferzentren, durch Lösungsmittel-Reorganisationseffekte beherrscht werden (Battistuzzi *et al.*, 2003). Die Lösungsmittelanordnung nahe dem aktiven Zentrum von PAZAMI und PAZ sind jedoch ähnlich, was sehr unterschiedlich ist zu derjenigen in AMI (und AZAMI). Die Anordnung der Lösungsmittelmoleküle, die in der Kristallstruktur nahe den Typ 1-Kupferzentren beobachtet werden, und die Lösungsmittelzugänglichkeit der koordinierenden Reste haben möglicherweise wenig Einfluss auf den E_m (Li *et al.*, 2007).

Andere Faktoren, welche die E_m -Werte der Typ 1-Kupferzentren beeinflussen können, sind die Struktur des aktiven Zentrums einschließlich des Wasserstoffbrückenbindungsmusters in dieser Umgebung (Li *et al.*, 2004; Yanagisawa *et al.*, 2006). Dieser zweite Aspekt von PAZAMI ist vergleichbar mit AMI und AZAMI und ist sehr unterschiedlich zu der Anordnung, die in PAZ gesehen wird (siehe Tabelle 15). Das Wasserstoffbrückenbindungsmuster, welches den Cys-Liganden einbezieht, wurde (Li *et al.*, 2004) als ein E_m -kontrollierendes Hauptmerkmal identifiziert, welches in PAZAMI, AZAMI, AMI und PAZ ähnlich ist. Eine andere Eigenschaft des aktiven Zentrums, welche den E_m zu beeinflussen vorausgesagt wurde, ist die Anwesenheit einer zweiten schwachen axialen Interaktion am aktiven Zentrum, trans zu dem Met-Liganden von einem Carbonylsauerstoffatom der Hauptkette (Li *et al.*, 2004) und man glaubt, dass diese besonders wichtig in AZ ist, wo das Sauerstoffatom nur $\sim 3 \text{ \AA}$ vom Kupferion entfernt ist (Baker, 1988; Nar *et al.*, 1991; Crane *et al.*, 2001). In PAZ (Inoue *et al.*, 1999) und AMI (Cunane *et al.*, 1996) ist das entsprechende Atom $\sim 4 \text{ \AA}$ vom Metall entfernt, und aufgrund der Bewegung des Kupfers in Richtung des axialen Met-Liganden ist der Abstand sogar größer in PAZAMI (siehe Tabelle 14). Bei diesem Abstand vom Metall hat diese Änderung jedoch möglicherweise wenig Einfluss.

Die Bewegung des Kupfers aus der $N^{\delta}_2S^{\gamma}$ -Ebene auf den axialen Met-Liganden zu, muss einen Effekt auf den E_m haben. Der niedrigere E_m , welcher für PAZAMI beobachtet wurde, würden anzeigen, dass die Änderungen in der Geometrie am aktiven Zentrum zu einer Stabilisierung der Cu(II)-Form des Proteins geführt hat. Man würde erwarten, dass die Bewegung auf den Schwefel des Thioethers zu, das Cu(I) stabilisiert, aber dieses wird durch eine Zunahme der Cu–S(Cys)-Bindung begleitet, welche vermutlich den gegenteiligen Effekt hat. Die Änderung von drei starken äquatorialen Liganden in PAZ zu einer mehr tetragonalen Anordnung in PAZAMI würde Cu(II) stabilisieren und es wird daher vorgeschlagen, dass dies einer von den Hauptfaktoren ist, welche den E_m beeinflussen. Die Tatsache, dass die Loop-Mutationen in PAZAMI und AZAMI einen ähnlichen Einfluss auf den E_m haben, scheint rein zufällig zu sein.

Der k_{ESE} -Wert für PAZAMI ist achtmal kleiner als der für PAZ bei pH 7,6 (Yanagisawa und Dennison 2003; Yanagisawa und Dennison 2004). Die hier vorgelegten Strukturuntersuchungen zeigen, dass eine teilweise His81-Protonierung bei pH 7,5 beobachtet wurde. Deshalb ist ein möglicher Grund für die beobachtete Abnahme in der intrinsischen ET-Reaktivität eine erhöhte λ_i , welches durch diesen Effekt verursacht wurde. Studien durchgeführt in Lösung zeigen jedoch, dass der pK_s für His81 6,7 ist, welcher deutlich niedriger als der pH der Strukturuntersuchungen ist [die genauen pH-Werte in den Kristallen sind schwer zu ermitteln (Yanagisawa und Dennison 2003; Yanagisawa und Dennison 2004)]. Da k_{ESE} durch die Analyse des Relaxationsverhaltens vom His-Liganden- 1H NMR-Resonanzen (einschließlich His81) bestimmt wurde, deren chemische Verschiebungswerte abhängig vom Protonierungszustand waren, ist es bekannt, dass deprotoniertes His81 hauptsächlich in diesen Experimenten anzutreffen war. Ein anderer Grund für die verringerte intrinsische ET-Reaktivität ist der Einfluss der Loop-Mutation auf die Struktur und Eigenschaften des hydrophoben Oberflächenbereiches, welcher den His81-Ligand umgibt, und von dem bekannt ist, dass er die Erkennungsstelle für den ESE ist (van de Kamp *et al.*, 1990; Dennison und Kohzuma, 1999; van Amsterdam *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2005). Der Einfluss der Loop-Verkürzungen in AZ auf den ESE wurde durch ihre Auswirkung auf die Hydrophobizität in dieser Region interpretiert, welche minimal für AZAMI ist und was zu einem k_{ESE} -Wert führt, der fast identisch zu dem von AZ ist (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007).

Die zugängliche nicht-polare Fläche in dieser Region ist von $\sim 260 \text{ \AA}^2$ in PAZ (gebildet aus Met16, Pro80, His81, Tyr82, Gly83, Met84) auf $\sim 220 \text{ \AA}^2$ in PAZAMI (bestehend aus Met16, Pro80, His81, Pro82, Phe83) erhöht. Der Haupteffekt ist das Einführen der Pro- und Phe-Reste zwischen den His- und Met-Liganden in PAZAMI, welche einen bedeutend größeren Beitrag zu der Hydrophobizität dieser Fläche als Tyr82 und Met84 in PAZ haben. Die erhöhte Hydrophobizität ist vermutlich der Grund dafür, dass benachbarte Moleküle über diese Region im Kristallgitter von PAZAMI packen [soch eine Packung wurde zuvor in keiner anderen PAZ-Struktur gesehen und man würde dadurch eine Vergrößerung der Assoziationskonstante des PAZAMI-Homodimer im Vergleich zum Wildtyp-Protein erwarten (van Amsterdam *et al.*, 2002)]. Der Verlust der flexiblen Met-Seitenkette und besonders des Tyr in dieser Region, welches als ein allgemein vorkommender Rest an der Berührungfläche von Proteinen, die in Übergangsreaktionen involviert sind, gefunden wurden (Crowley und Carrondo, 2004), könnte ein bedeutsamerer Faktor sein.

Der pK_s -Wert für den His81-Liganden in Cu(I)-PAZAMI ist ~ 2 pH-Einheiten höher als der in PAZ (Dennison *et al.*, 1994) und stimmt fast genau mit dem für His96 in AMI überein (Dennison *et al.*, 1996; Yanagisawa und Dennison, 2003; Yanagisawa und Dennison 2004; Battistuzzi *et al.*, 2005). Nimmt man die veränderten Anordnungen der Loops und Kupferzentren in PAZAMI und AMI, dann könnte es scheinen, dass die detaillierte Struktur in dieser Region kein Hauptbestimmungsfaktor des pK_s -Wertes für den His-Liganden in dem Loop ist. Eine identische Änderung im pK_s wurde beobachtet, wenn der AMI-Loop in PC eingeführt wurde (Yanagisawa und Dennison 2004). Im Fall von AZAMI wurde ein pK_s -Wert ~ 1 pH-Einheit niedriger als in AMI, PAZAMI und PCAMI beobachtet (Yanagisawa und Dennison, 2004). Dies ist jedoch beträchtlich höher als der für AZ für welchen ein pK_s von < 2 abgeschätzt wurde (Jeuken *et al.*, 2000). Das Einfügen der längeren PAZ- und PC-Loops in AMI führt zu einer Abnahme des pK_s des His Liganden im Cu(I)-Protein, und stimmt überein mit dem von PAZ und PC, während das Einführen des AZ-Loops einen geringen Effekt hat (Dennison *et al.*, 1996; Buning *et al.*, 2000; Battistuzzi *et al.*, 2005). Detaillierte thermodynamische Studien dieser AMI-Varianten haben gezeigt, dass Abnahmen im pK_s einen wichtigen entropischen Beitrag haben (Battistuzzi *et al.*, 2005).

Es wurde vorgeschlagen, dass die bevorzugte Bildung der Cu(I)–N(His)-Bindung nach Verlängerung des Loops von der vergrößerter Flexibilität in dieser Region im reduzierten Protein herrührt (Battistuzzi *et al.*, 2005). Das Wasserstoffbrückenmuster um das aktive Zentrum herum ist ähnlich in PAZAMI, AMI (Cunane *et al.*, 1996) und auch in AZAMI (Li *et al.*, 2006), welches darauf hinweisen würde, dass dieses Merkmal nicht den pK_s -Wert beeinflusst. Die Länge des Loops beeinflusst den pK_s für den His-Liganden, aber die strukturellen Eigenschaften, welche diesen Effekt regulieren, bleiben unbekannt. Die Loop-Mutationen können zu strukturellen Veränderungen führen, die die Rotationsbarrieren beeinflussen, welche in die Dissoziation und die Protonierung des C-terminalen His-Liganden involviert sind und das kann einen bedeutsamen Effekt auf den beobachteten pK_s -Wert haben (Buning und Comba, 2000).

6.1 Schlussfolgerungen

Wenn der kurze AMI-Loop in das PAZ-Gerüst eingebaut wird, nimmt er eine Konformation an, die unterschiedlich ist zu der in AMI und auch in der ähnlichen AZAMI-Loopverkürzungsvariante. Dies führt zu einer unterschiedlichen Struktur des aktiven Zentrums von PAZAMI im Vergleich zu der von PAZ, welche mehr tetragonal mit einer sehr kurzen axialen Cu-S(Met)-Interaktion und einer vergrößerten Cu-S(Cys)-Bindung ist. Diese Veränderungen bewirken ein modifiziertes UV/Vis-Spektrum und sind verantwortlich für den Einfluss dieser Loop-Mutation auf den E_m . Die unterschiedlichen Strukturen des aktiven Zentrums und des Loops scheinen nicht den pK_s des His-Liganden im Loop zu beeinflussen, da PAZAMI den gleichen Wert wie für AMI aufweist. Die Strukturen von PAZAMI zeigen, dass Wechselwirkungen zwischen dem Metallbindungsloop und dem Proteingerüst, in das der Loop eingebaut wurde, die Geometrie des aktiven Zentrums beträchtlich beeinflussen können, was jedoch nicht notwendigerweise zu einer dramatisch veränderten Spektroskopie der Cu(II)-Proteine führen muss. Die Reste im Kupferbindungsloop haben einen spürbaren Einfluss auf Übergangspoteinwechselwirkungen, da sie die Natur des wichtigen Erkennungsoberflächenbereiches, der den exponierten His-Liganden umgibt, beeinflussen.

7. Diskussion – MyD88-Protein

Molekulare Chaperone sind Proteine, die die Faltung anderer Proteine unterstützen, indem sie mit diesen vorübergehend eine Bindung eingehen. Dabei wird eine instabile Konformation dieser Polypeptidkette stabilisiert. Durch wiederholtes Binden und anschließendes Freisetzen (Bukau and Horwich, 1998) werden neu synthetisierte Proteine solange stabilisiert bis sie entweder ihre native Struktur erreicht haben, oder entsprechend andere Chaperone gefunden haben. Chaperone auch Hitzeschockproteine (HSP's: *heat shock proteins*) genannt, da sie aufgrund von Hitze einwirkung in der Zelle vermehrt exprimiert werden, gehören zur Familie der Stressproteine, deren Produktion durch unterschiedliche Belastungen in der Zelle verursacht wird. In *E. coli* repräsentiert das von Hendrix zuerst beschriebene HSP60-Homolog GroEL unter normalen Bedingungen 1-2% des Gesamtproteingehaltes (Hendrix *et al.*, 1979). Unter Stressbedingungen erhöht sich der Anteil des GroEL um das 4-5 fache (Shinnik *et al.*, 1991). Die Funktion der Hitzeschockproteine in Stresssituationen besteht im wesentlichen in der Stabilisierung von Proteinen. Nicht vollständige oder nur zum Teil gefaltete Proteine weisen hydrophobe Regionen auf der Oberfläche auf, die im nativen Zustand im Innern des Proteins eingeschlossen sind. Diese Bereiche neigen einerseits zu Interaktionen mit anderen zellulären Molekülen und andererseits zur Bildung von Proteinaggregaten, wodurch die Zellfunktionen erheblich gestört werden können. Hier spielen molekulare Chaperone eine wesentliche Rolle, da sie spezifisch mit aggregationsanfälligen Proteinen interagieren und somit in direkter Konkurrenz mit den Aggregationsreaktionen treten können (Ellis *et al.*, 1989; Frydman, 2001; Hartl, 1996). Die Hitzeschockproteine werden nach ihrem Molekulargewicht klassifiziert und benannt (Lindquist and Craig, 1988). So unterscheidet man HSP60, 70, 90 und 100, sowie eine Vielzahl niedermolekularer Hitzeschockproteine. Sie werden in vielen Kompartimenten der Zelle gefunden: Mitochondrien, Nukleus, im endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zytosol, in den Lysosomen und an der Plasmamembran (Multhoff *et al.*, 1998)

Im Fall von MyD88 wurde bewiesen, dass dieses Protein nicht korrekt gefaltet war. Das war der Grund warum Chaperone an MyD88 banden. Man dachte zuerst an das Gegenteil, weil nur eine einzige Bande auf dem 12% SDS-Gel zu sehen war (siehe Abbildung 12), welches gemacht wurde, aus den Fraktionen der Affinitätschromatographie-Elution. Durch Vergleich

zwischen der MyD88-GST-Bande und einem Markerprotein könnte das genaue Molekulargewicht MyD88-GST (61 kDa) bestätigt werden. Eine anschließende Gelfiltration als zweiter Schritt der Reinigung zeigte jedoch, dass die einzelne Bande eigentlich zwei sind (eine wird überdeckt). Proteinsequenzierungen ergaben die Anwesenheit von MyD88-GST und Hsp60 aus *E. coli*, welches ein Molekulargewicht von 60 kDa aufweist. Da beide Proteine beinahe das gleiche Molekulargewicht aufweisen, war natürlich zunächst schwer zu unterscheiden, ob es auf dem 12% SDS-Gel nur ein Protein oder zwei vorhanden waren. Andererseits beweist es, dass es eine Interaktion zwischen beiden Proteinen gibt. Folglich ist das ein Hinweis, dass MyD88 keine korrekte Faltung haben kann.

Es wurde deswegen noch versucht, das Fusionsprotein rückzufalten (Ergebnisse nicht gezeigt), aber vergeblich. Laut der Ergebnisse der Analyse im SMART-System eluierte das MyD88-GST-Fusionsprotein immer noch mit einem höheren Molekulargewicht, was darauf hindeutet, dass die Rückfaltung mit Sarcosyl, DTT und Harnstoff nicht erfolgreich war.

Je mehr Domänen ein nicht richtig gefaltetes Protein hat, desto schwieriger wird es, eine erfolgreiche Rückfaltung durchzuführen.

MyD88 wurde auch in anderen Vektoren inkloniert, aber Expressionsversuche scheiterten. Es bleibt offen, ob es in Insekten- oder Hefe-Zellen dieses Protein richtig gefaltet exprimiert werden kann.

Vor kurzem wurden in unserer Gruppe die DD plus ID Domänen von MyD88 im Komplex mit DD-IRAK 4 exprimiert. Es ist noch abzuwarten, ob diese kristallisieren, um die Strukturen röntgenkristallographisch zu analysieren.

8. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	2-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Liter
mA	Milliampere
MES	2-Morpholinoethylsulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i> (Phosphat- gepufferte Salzlösung)
pmol	Pikomol
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro

Abkürzungsverzeichnis

SDS	Minute)
TAE	Sodiumdodecylsulfat
TEMED	Tris-Acetat/EDTA
Tris/HCl	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan (pH mit HCl eingestellt.
U/min	Umdrehungen/Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
EthBr	Ethidiumbromid
K	Kelvin

Literaturverzeichnis

- Adman, E. T. (1991). Advances in Protein Chemistry Copper Protein Structures (Anfinsen, C. B., Edsall, J. T., Richards, F. M., and Eisenberg, D. S., eds). Academic Press, New York. 145-197.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, *413*(6857), 732-738.
- Allendorf, M. D., Spira, D. J., & Solomon, E. I. (1985). Low-temperature magnetic circular dichroism studies of native laccase: spectroscopic evidence for exogenous ligand bridging at a trinuclear copper active site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *82*(10), 3063-3067.
- Antonyuk, S. V., Strange, R. W., Sawers, G., Eady, R. R., & Hasnain, S. S. (2005). Atomic resolution structures of resting-state, substrate- and product-complexed Cu-nitrite reductase provide insight into catalytic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(34), 12041-12046.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., & Ciofi-Baffoni, S. (2004). Perspectives in Inorganic Structural Genomics: A Trafficking Route for Copper. *European Journal of Inorganic Chemistry*, *2004*(8), 1583-1593.
- Baker, E. N. (1988). Structure of azurin from *Alcaligenes denitrificans* refinement at 1.8 Å resolution and comparison of the two crystallographically independent molecules. *J Mol Biol*, *203*(4), 1071-1095.
- Basumallick, L., Szilagyi, R. K., Zhao, Y., Shapleigh, J. P., Scholes, C. P., & Solomon, E. I. (2003). Spectroscopic studies of the Met182Thr mutant of nitrite reductase: role of the axial ligand in the geometric and electronic structure of blue and green copper sites. *J Am Chem Soc*, *125*(48), 14784-14792.
- Battistuzzi, G., Bellei, M., Borsari, M., Canters, G. W., de Waal, E., Jeuken, L. J., et al. (2003). Control of metalloprotein reduction potential: compensation phenomena in the reduction thermodynamics of blue copper proteins. *Biochemistry*, *42*(30), 9214-9220.
- Battistuzzi, G., Borsari, M., Canters, G. W., di Rocco, G., de Waal, E., Arendsen, Y., et al. (2005). Ligand loop effects on the free energy change of redox and pH-dependent equilibria in cupredoxins probed on amicyanin variants. *Biochemistry*, *44*(29), 9944-9949.

- Battistuzzi, G., Borsari, M., Loschi, L., Righi, F., & Sola, M. (1999). Redox Thermodynamics of Blue Copper Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, *121*(3), 501-506.
- Bertini, I., Fernandez, C.O., Karlsson, B.G., Leckner, J., Luchinat, C., Malmstroem, B.O., Nersissian, A.M., Pierattelli, R., Shipp, E., Valentine, J. S., Vila, A.J. (2000). Structural Information through NMR Hyperfine Shifts in Blue Copper Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, *122*, 3701-3707.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979, Nov 24). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, pp. 1513-1523.
- Blackburn, N. J., de Vries, S., Barr, M. E., Houser, R. P., Tolman, W. B., Sanders, D., et al. (1997). X-ray Absorption Studies on the Mixed-Valence and Fully Reduced Forms of the Soluble CuA Domains of Cytochrome c Oxidase. *J. Am. Chem. Soc.*, *119*(26), 6135-6143.
- Brown, K., Djinovic-Carugo, K., Haltia, T., Cabrito, I., Saraste, M., Moura, J. J., et al. (2000). Revisiting the catalytic CuZ cluster of nitrous oxide (N₂O) reductase. Evidence of a bridging inorganic sulfur. *J Biol Chem*, *275*(52), 41133-41136.
- Bukau, B., & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, *92*(3), 351-366.
- Buning, C., Canters, G. W., Comba, P., Dennison, C., Jeuken, L., Melter, M., et al. (2000). Loop-Directed Mutagenesis of the Blue Copper Protein Amicyanin from *Paracoccus versutus* and Its Effect on the Structure and the Activity of the Type-1 Copper Site. *J. Am. Chem. Soc.*, *122*(2), 204-211.
- Buning, C. C. P. (2000). Protonation of the Copper(I) Form of the Blue Copper Proteins Plastocyanin and Amicyanin - A Molecular Dynamics Study. *European Journal of Inorganic Chemistry*(6), 1267 - 1273.
- Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R., & Tschopp, J. (2003). Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med*, *197*(2), 263-268.
- Carter, C. W., Jr., & Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J Biol Chem*, *254*(23), 12219-12223.
- Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, *296*(5573), 1634-1635.
- Chen, P., Cabrito, I., Moura, J. J., Moura, I., & Solomon, E. I. (2002). Spectroscopic and electronic structure studies of the mu(4)-sulfide bridged tetranuclear Cu(Z) cluster in N(2)O reductase: molecular insight into the catalytic mechanism. *J Am Chem Soc*, *124*(35), 10497-10507.

- Chen, P., DeBeer George, S., Cabrito, I., Antholine, W. E., Moura, J. J., Moura, I., et al. (2002). Electronic structure description of the $\mu(4)$ -sulfide bridged tetranuclear Cu(Z) center in N(2)O reductase. *J Am Chem Soc*, *124*(5), 744-745.
- Collyer, C. A., Guss, J. M., Sugimura, Y., Yoshizaki, F., & Freeman, H. C. (1990). Crystal structure of plastocyanin from a green alga, *Enteromorpha prolifera*. *J Mol Biol*, *211*(3), 617-632.
- Crane, B. R., Di Bilio, A. J., Winkler, J. R., & Gray, H. B. (2001). Electron tunneling in single crystals of *Pseudomonas aeruginosa* azurins. *J Am Chem Soc*, *123*(47), 11623-11631.
- Crowley, P. B., & Carrondo, M. A. (2004). The architecture of the binding site in redox protein complexes: implications for fast dissociation. *Proteins*, *55*(3), 603-612.
- Cunane, L. M., Chen, Z. W., Durley, R. C., & Mathews, F. S. (1996). X-ray structure of the cupredoxin amicyanin, from *Paracoccus denitrificans*, refined at 1.31 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, *52*(Pt 4), 676-686.
- Daugherty, R. G., Wasowicz, T., Gibney, B. R., & DeRose, V. J. (2002). Design and spectroscopic characterization of peptide models for the plastocyanin copper-binding loop. *Inorg Chem*, *41*(10), 2623-2632.
- Dennison, C. (2005). Investigating the structure and function of cupredoxins. *Coord. Chem. Rev.*, *249*(24), 3025-3054.
- Dennison, C., & Kohzuma, T. (1999). Alkaline Transition of Pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes* Studied by Paramagnetic NMR and Its Effect on Electron Transfer. *Inorg. Chem.*, *38*(7), 1491-1497.
- Dennison, C., Van Driessche, G., Van Beeumen, J., McFarlane, W., & Sykes, A. G. (1996). Electron-Transfer Properties and Active-Site Structure of the Type 1 (Blue) Copper Protein Umecyanin. *Chemistry - A European Journal*, *2*(1), 104-109.
- Dennison, C., Vijgenboom, E., de Vries, S., van der Oost, J., & Canters, G. W. (1995). Introduction of a CuA site into the blue copper protein amicyanin from *Thiobacillus versutus*. *FEBS Lett*, *365*(1), 92-94.
- Dennison, C. K. T., McFarlane W.; Suzuki S.; Sykes A. G. (1994). Reversible active site protonation and electron-transfer properties of *Achromobacter cycloclastes* pseudoazurin : comparisons with other type 1 copper proteins. *Journal of the Chemical Society. Chemical communications (J. Chem. Soc., Chem. commun.)* *5*, 581-582.

- Dennison, C., Vijgenboom, E., Hagen, W. R. and Canters, G. W. (1996). Loop-Directed Mutagenesis Converts Amicyanin from *Thiobacillus versutus* into a Novel Blue Copper Protein *J. Am. Chem. Soc.*, 118(31), 7406 - 7407.
- Di Bilio, A. J., Dennison, C., Gray, H. B., Ramirez, B. E., Sykes, A. G., & Winkler, J. R. (1998). Electron Transfer in Ruthenium-Modified Plastocyanin. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(30), 7551-7556.
- Donaire, A., Jimenez, B., Fernandez, C. O., Pierattelli, R., Niizeki, T., Moratal, J. M., et al. (2002). Metal-ligand interplay in blue copper proteins studied by ¹H NMR spectroscopy: Cu(II)-pseudoazurin and Cu(II)-rusticyanin. *J Am Chem Soc*, 124(46), 13698-13708.
- Doyle, S., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., et al. (2002). IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity*, 17(3), 251-263.
- Ellis, M. J., Dodd, F. E., Sawers, G., Eady, R. R., & Hasnain, S. S. (2003). Atomic resolution structures of native copper nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* and the active site mutant Asp92Glu. *J Mol Biol*, 328(2), 429-438.
- Ellis, R. J., van der Vies, S. M., & Hemmingsen, S. M. (1989). The molecular chaperone concept. *Biochem Soc Symp*, 55, 145-153.
- Esnouf, R. M. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J Mol Graph Model*, 15(2), 132-134, 112-133.
- Farver, O., & Pecht, I. (1988). Preferred sites and pathways for electron transfer in blue copper proteins. *Prog Clin Biol Res*, 274, 269-283.
- Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M., & Varfolomeev, E. (1995). The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem Sci*, 20(9), 342-344.
- Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K., & Hartl, F. U. (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*, 370(6485), 111-117.
- Galla, H. Spectroscopische Methoden in der Biochemie. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York*.
- Gaykema, W. P. J., Hol, W. G. J., Vereijken, J. M., Soeter, N. M., Bak, H. J., & Beintema, J. J. (1984). 3.2 [angst] structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* haemocyanin. *Nature*, 309(5963), 23-29.
- George, G. N., Byrd, J., & Winge, D. R. (1988). X-ray absorption studies of yeast copper metallothionein. *J Biol Chem*, 263(17), 8199-8203.

- Gewirth, A. A., & Solomon, E. I. (1988). Electronic structure of plastocyanin: excited state spectral features. *J. Am. Chem. Soc.*, *110*(12), 3811-3819.
- Gibney, B. R., Mulholland, S. E., Rabanal, F., & Dutton, P. L. (1996). Ferredoxin and ferredoxin-heme maquettes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(26), 15041-15046.
- Godden, J. W., Turley, S., Teller, D. C., Adman, E. T., Liu, M. Y., Payne, W. J., et al. (1991). The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science*, *253*(5018), 438-442.
- Gray, H. B., Malmstrom, B. G., & Williams, R. J. (2000). Copper coordination in blue proteins. *J Biol Inorg Chem*, *5*(5), 551-559.
- Groeneveld, C. M., & Canters, G. W. (1985). The pH dependence of the electron self-exchange rate of azurin from *Pseudomonas aeruginosa* as studied by ¹H-NMR. *Eur J Biochem*, *153*(3), 559-564.
- Guo, L. H., & Hill, H. A. O. (1991). Direct Electrochemistry of Proteins and Enzymes. *Advances in Inorganic Chemistry*, *36*, 341-375.
- Gurbiel, R. J., Fann, Y. C., Surerus, K. K., Werst, M. M., Musser, S. M., Doan, P. E., et al. (1993). Detection of two histidyl ligands to CuA of cytochrome oxidase by 35-GHz ENDOR. ¹⁴,¹⁵N and ⁶³,⁶⁵Cu ENDOR studies of the CuA site in bovine heart cytochrome aa₃ and cytochromes caa₃ and ba₃ from *Thermus thermophilus*. *J. Am. Chem. Soc.*, *115*(23), 10888-10894.
- Guss, J. M., & Freeman, H. C. (1983). Structure of oxidized poplar plastocyanin at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol*, *169*(2), 521-563.
- Guss, J. M., Harrowell, P. R., Murata, M., Norris, V. A., & Freeman, H. C. (1986). Crystal structure analyses of reduced (CuI) poplar plastocyanin at six pH values. *J Mol Biol*, *192*(2), 361-387.
- Han, J., Adman, E. T., Beppu, T., Codd, R., Freeman, H. C., Huq, L. L., et al. (1991). Resonance Raman spectra of plastocyanin and pseudoazurin: evidence for conserved cysteine ligand conformations in cupredoxins (blue copper proteins). *Biochemistry*, *30*(45), 10904-10913.
- Hardiman, G., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Garcia, D. K., Naylor, S. L., et al. (1997). Genetic structure and chromosomal mapping of MyD88. *Genomics*, *45*(2), 332-339.
- Hardiman, G., Rock, F. L., Balasubramanian, S., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (1996). Molecular characterization and modular analysis of human MyD88. *Oncogene*, *13*(11), 2467-2475.

- Hart, P. J., Nersissian, A. M., Herrmann, R. G., Nalbandyan, R. M., Valentine, J. S., & Eisenberg, D. (1996). A missing link in cupredoxins: crystal structure of cucumber stellacyanin at 1.6 Å resolution. *Protein Sci*, 5(11), 2175-2183.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583), 571-579.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., & Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52(2), 269-279.
- Hay, M., Richards, J. H., & Lu, Y. (1996). Construction and characterization of an azurin analog for the purple copper site in cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1), 461-464.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes Dev*, 18(18), 2195-2224.
- Hendrix, R. W. (1979). Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly. *J Mol Biol*, 129(3), 375-392.
- Himmelwright, R. S., Eickman, N. C., LuBien, C. D., Solomon, E. I., & Lerch, K. (1980). Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.*, 102(24), 7339-7344.
- Hofmann, K., & Tschopp, J. (1995). The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance. *FEBS Lett*, 371(3), 321-323.
- Hoppe, W. (1957). Die Faltmolekuelmethode: Eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta Cryst.*(10), 750-751.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekuelmethode. *Acta Cryst.*(19), 353-356.
- Huber, R. (1989). A structural basis of light energy and electron transfer in biology *Bioscience Reports. Springer Netherlands*, 9(6).
- Hultmark, D. (1994). Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun*, 199(1), 144-146.
- Inoue, T., Kai, Y., Harada, S., Kasai, N., Ohshiro, Y., Suzuki, S., et al. (1994). Refined crystal structure of pseudoazurin from *Methylobacterium extorquens* AM1 at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50(Pt 3), 317-328.

- Inoue, T., Nishio, N., Suzuki, S., Kataoka, K., Kohzuma, T., & Kai, Y. (1999). Crystal structure determinations of oxidized and reduced pseudoazurins from *Achromobacter cycloclastes*. Concerted movement of copper site in redox forms with the rearrangement of hydrogen bond at a remote histidine. *J Biol Chem*, 274(25), 17845-17852.
- Ito, N., Phillips, S. E., Stevens, C., Ogel, Z. B., McPherson, M. J., Keen, J. N., et al. (1991). Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase. *Nature*, 350(6313), 87-90.
- Itoh, N., & Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*, 268(15), 10932-10937.
- Iwata, S. (1998). Structure and function of bacterial cytochrome c oxidase. *J Biochem (Tokyo)*, 123(3), 369-375.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., & Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, 376(6542), 660-669.
- Jancarik, J., & Kim, S. H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography*, 24(4), 409-411.
- Jeuken, L. J. C., van Vliet, P., Verbeet, M. P., Camba, R., McEvoy, J. P., Armstrong, F. A., et al. (2000). Role of the Surface-Exposed and Copper-Coordinating Histidine in Blue Copper Proteins: The Electron-Transfer and Redox-Coupled Ligand Binding Properties of His117Gly Azurin. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(49), 12186-12194.
- Johnson, W. C., Jr. (1990). Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins*, 7(3), 205-214.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, 47 (Pt 2)(Pt 2), 110-119.
- Kaim, W., & Schwederski, B. (1995). Bioanorganische Chemie. *Teubner Verlag Stuttgart*, 2., Ueberarbeitete und erweiterte Auflage, 460.
- Kaisho, T., & Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, 117(5), 979-987; quiz 988.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., & Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11(1), 115-122.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., et al. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in

- activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*, 167(10), 5887-5894.
- Kelly, M., Lappalainen, P., Talbo, G., Haltia, T., van der Oost, J., & Saraste, M. (1993). Two cysteines, two histidines, and one methionine are ligands of a binuclear purple copper center. *J Biol Chem*, 268(22), 16781-16787.
- Kleywegt, G. J. J., T. A. (1994). From First Map to Final Model, edited by S. Bailey, R. Hubbard & D. A. Waller. Warrington: Daresbury Laboratory., 59-66.
- Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110(2), 191-202.
- Kroneck, P. M., Antholine, W. E., Kastrau, D. H., Buse, G., Steffens, G. C., & Zumft, W. G. (1990). Multifrequency EPR evidence for a bimetallic center at the CuA site in cytochrome c oxidase. *FEBS Lett*, 268(1), 274-276.
- Kukimoto, M., Nishiyama, M., Murphy, M. E., Turley, S., Adman, E. T., Horinouchi, S., et al. (1994). X-ray structure and site-directed mutagenesis of a nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6: roles of two copper atoms in nitrite reduction. *Biochemistry*, 33(17), 5246-5252.
- Kukimoto, M., Nishiyama, M., Ohnuki, T., Turley, S., Adman, E. T., Horinouchi, S., et al. (1995). Identification of interaction site of pseudoazurin with its redox partner, copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6. *Protein Eng*, 8(2), 153-158.
- Kyritsis, P., Dennison, C., Ingledeu, W. J., McFarlane, W., & Sykes, A. G. (1995). Determination of the Self-Exchange Rate Constant for Rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans* and a Comparison with Values for Other Type 1 Blue Copper Proteins. *Inorg. Chem.*, 34(21), 5370-5374.
- LaCroix, L. B., Randall, D. W., Nersissian, A. M., Hoitink, C. W. G., Canters, G. W., Valentine, J. S., et al. (1998). Spectroscopic and Geometric Variations in Perturbed Blue Copper Centers: Electronic Structures of Stellacyanin and Cucumber Basic Protein. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(37), 9621-9631.
- LaCroix, L. B., Shadle, S. E., Wang, Y., Averill, B. A., Hedman, B., Hodgson, K. O., et al. (1996). Electronic Structure of the Perturbed Blue Copper Site in Nitrite Reductase: Spectroscopic Properties, Bonding, and Implications for the Entatic/Rack State. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(33), 7755-7768.
- Lappalainen, P., & Saraste, M. (1994). The binuclear CuA centre of cytochrome oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1187(2), 222-225.

- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283-291.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*, 86(6), 973-983.
- Li, C., Banfield, M. J., & Dennison, C. (2007). Engineering copper sites in proteins: loops confer native structures and properties to chimeric cupredoxins. *J Am Chem Soc*, 129(3), 709-718.
- Li, C., Yanagisawa, S., Martins, B. M., Messerschmidt, A., Banfield, M. J., & Dennison, C. (2006). Basic requirements for a metal-binding site in a protein: the influence of loop shortening on the cupredoxin azurin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(19), 7258-7263.
- Li, H., Webb, S. P., Ivanic, J., & Jensen, J. H. (2004). Determinants of the relative reduction potentials of type-1 copper sites in proteins. *J Am Chem Soc*, 126(25), 8010-8019.
- Li, Y. J., & Weser, U. (1992). Circular dichroism, luminescence, and electronic absorption of copper binding sites in metallothionein and its chemically synthesized .alpha. and .beta. domains. *Inorg. Chem.*, 31(26), 5526-5533.
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 22, 631-677.
- Liu, M. Y., Liu, M. C., Payne, W. J., & Legall, J. (1986). Properties and electron transfer specificity of copper proteins from the denitrifier "Achromobacter cycloclastes". *J Bacteriol*, 166(2), 604-608.
- Lommen, A., & Canters, G. W. (1990). pH-dependent redox activity and fluxionality of the copper site in amicyanin from Thiobacillus versutus as studied by 300- and 600- MHz 1H NMR. *J Biol Chem*, 265(5), 2768-2774.
- Lommen, A., Canters, G. W., & van Beeumen, J. (1988). A 1H-NMR study on the blue copper protein amicyanin from Thiobacillus versutus. Resonance identifications, structural rearrangements and determination of the electron self-exchange rate constant. *Eur J Biochem*, 176(1), 213-223.
- Lommen, A., Pandya, K. I., Koningsberger, D. C., & Canters, G. W. (1991). EXAFS analysis of the pH dependence of the blue-copper site in amicyanin from Thiobacillus versutus. *Biochim Biophys Acta*, 1076(3), 439-447.
- Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B., & Liebermann, D. A. (1990). Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid

- differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene*, 5(7), 1095-1097.
- Lu, Y., Berry, S. M., & Pfister, T. D. (2001). Engineering Novel Metalloproteins: Design of Metal-Binding Sites into Native Protein Scaffolds. *Chem. Rev.*, 101(10), 3047-3080.
- Magnus, K. A., Ton-That, H., & Carpenter, J. E. (1994). Recent Structural Work on the Oxygen Transport Protein Hemocyanin. *Chem. Rev.*, 94(3), 727-735.
- Malmstrom, B. G. (1994). Rack-induced bonding in blue-copper proteins. *Eur J Biochem*, 223(3), 711-718.
- Marcus, R. A., & Sutin, N. (1985). Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 811(3), 265-322.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1(2), 135-145.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., et al. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, 2(2), 253-258.
- Merritt, E. A., & Murphy, M. E. (1994). Raster3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50(Pt 6), 869-873.
- Messerschmidt, A. (1993). Blue copper oxidases. *Advances in Inorganic Chemistry*, 40, 121-185.
- Messerschmidt, A. (1997). Copper metalloenzymes. In *Comprehensive Biological Catalyses (ed. Sinnott, M.), III*, 401-426 (Academic Press, London).
- Messerschmidt, A., Huber, R., Wieghardt, K., & Poulos, T. (2001). Handbook of Metalloproteins. *Wiley*, 1.
- Messerschmidt, A., Ladenstein, R., Huber, R., Bolognesi, M., Avigliano, L., Petruzzelli, R., et al. (1992). Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol*, 224(1), 179-205.
- Messerschmidt, A., Rossi, A., Ladenstein, R., Huber, R., Bolognesi, M., Gatti, G., et al. (1989). X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from

- zucchini. Analysis of the polypeptide fold and a model of the copper sites and ligands. *J Mol Biol*, 206(3), 513-529.
- Mikol, V., Rodeau, J. L., & Giege, R. (1990). Experimental determination of water equilibration rates in the hanging drop method of protein crystallization. *Anal Biochem*, 186(2), 332-339.
- Mitcham, J. L., Parnet, P., Bonnert, T. P., Garka, K. E., Gerhart, M. J., Slack, J. L., et al. (1996). T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family. *J Biol Chem*, 271(10), 5777-5783.
- Miyamoto, S., Maki, M., Schmitt, M. J., Hatanaka, M., & Verma, I. M. (1994). Tumor Necrosis Factor α -Induced Phosphorylation of I κ B is a Signal for its Degradation but not Dissociation from NF- κ B. *PNAS*, 91(26), 12740-12744.
- Mulholland, S. E., Gibney, B. R., Rabanal, F., & Dutton, P. L. (1998). Characterization of the Fundamental Protein Ligand Requirements of [4Fe-4S]₂⁺ Clusters with Sixteen Amino Acid Maquettes. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(40), 10296-10302.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273.
- Multhoff, G., Botzler, C., & Issels, R. (1998). The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response. *Biol Chem*, 379(3), 295-300.
- 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(Pt 3), 240-255.
- Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M., & Mantovani, A. (1998). The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med*, 187(12), 2097-2101.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., & Dixit, V. M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, 278(5343), 1612-1615.
- Nar, H., Messerschmidt, A., Huber, R., van de Kamp, M., & Canters, G. W. (1991). Crystal structure analysis of oxidized *Pseudomonas aeruginosa* azurin at pH 5.5 and pH 9.0. A pH-induced conformational transition involves a peptide bond flip. *J Mol Biol*, 221(3), 765-772.
- Neese, F., Zumft, W.G., Antholine, W.E., and Kroneck, P.M.H. (1996). The Purple Mixed-Valence CuA Center in Nitrous-oxide Reductase: EPR of the Copper-63-,

- Copper-65-, and Both Copper-65- and [15N]Histidine-Enriched Enzyme and a Molecular Orbital Interpretation *J. Am. Chem. Soc.*, 118(36), 8692 - 8699.
- O'Neill L, A., & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 7(5), 353-364.
- Olesen, K., Veselov, A., Zhao, Y., Wang, Y., Danner, B., Scholes, C. P., et al. (1998). Spectroscopic, kinetic, and electrochemical characterization of heterologously expressed wild-type and mutant forms of copper-containing nitrite reductase from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Biochemistry*, 37(17), 6086-6094.
- Olsson, M. H., Hong, G., & Warshel, A. (2003). Frozen density functional free energy simulations of redox proteins: computational studies of the reduction potential of plastocyanin and rusticyanin. *J Am Chem Soc*, 125(17), 5025-5039.
- Otwinowski, Z. M., W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* (276), 307-326.
- Paraskevopoulos, K., Antonyuk, S. V., Sawers, R. G., Eady, R. R., & Hasnain, S. S. (2006). Insight into catalysis of nitrous oxide reductase from high-resolution structures of resting and inhibitor-bound enzyme from *Achromobacter cycloclastes*. *J Mol Biol*, 362(1), 55-65.
- Parnet, P., Garka, K. E., Bonnert, T. P., Dower, S. K., & Sims, J. E. (1996). IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1R AcP. *J Biol Chem*, 271(8), 3967-3970.
- Patterson, A. L. (1934). A Fourier Series Method for the Determination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. *Phys. Rev.*(46), 372-376.
- Petratos, K., Banner, D. W., Beppu, T., Wilson, K. S., & Tsernoglou, D. (1987). The crystal structure of pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis* S-6 determined at 2.9 Å resolution. *FEBS Lett*, 218(2), 209-214.
- Petratos, K., Dauter, Z., & Wilson, K. S. (1988). Refinement of the structure of pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis* S-6 at 1.55 Å resolution. *Acta Crystallogr B*, 44 (Pt 6), 628-636.
- Pierloot, K., De Kerpel, J. O. A., Ryde, U., Olsson, M. H. M., & Roos, B. O. (1998). Relation between the Structure and Spectroscopic Properties of Blue Copper Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(50), 13156-13166.
- Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M., & Dodson, E. (2003). A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallographica Section D*, 59(7), 1131-1137.

- Rasmussen, T., Berks, B. C., Sanders-Loehr, J., Dooley, D. M., Zumft, W. G., & Thomson, A. J. (2000). The catalytic center in nitrous oxide reductase, CuZ, is a copper-sulfide cluster. *Biochemistry*, *39*(42), 12753-12756.
- Remenyi, R., Jeuken, L. J., Comba, P., & Canters, G. W. (2001). An amicyanin C-terminal loop mutant where the active-site histidine donor cannot be protonated. *J Biol Inorg Chem*, *6*(1), 23-26.
- Romero, A., Nar, H., Huber, R., Messerschmidt, A., Kalverda, A. P., Canters, G. W., et al. (1994). Crystal structure analysis and refinement at 2.15 Å resolution of amicyanin, a type I blue copper protein, from *Thiobacillus versutus*. *J Mol Biol*, *236*(4), 1196-1211.
- Rossmann, M. G. and Blow, W. M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.*(15), 24-31.
- Saiki, R. K., Chang, C. A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian, H. H., Jr., et al. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med*, *319*(9), 537-541.
- Sato, K., Crowley, P. B., & Dennison, C. (2005). Transient Homodimer Interactions Studied Using the Electron Self-exchange Reaction. *J. Biol. Chem.*, *280*(19), 19281-19288.
- Sato, K., & Dennison, C. (2002). Effect of histidine 6 protonation on the active site structure and electron-transfer capabilities of pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes*. *Biochemistry*, *41*(1), 120-130.
- Sato, K., Dennison, C. (2006). Active Site Comparison of CoII Blue and Green Nitrite Reductases. *Chemistry a European Journal* *12*, 6647-6659.
- Sato, K., Kohzuma, T., & Dennison, C. (2003). Active-site structure and electron-transfer reactivity of plastocyanins. *J Am Chem Soc*, *125*(8), 2101-2112.
- Shinnick, T. M. (1991). Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol*, *167*, 145-160.
- Slack, J. L., Schooley, K., Bonnert, T. P., Mitcham, J. L., Qvarnstrom, E. E., Sims, J. E., et al. (2000). Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem*, *275*(7), 4670-4678.
- Solomon, E. I., Chen, P., Metz, M., Lee, S. K., & Palmer, A. E. (2001). Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, *40*(24), 4570-4590.

- Solomon, E. I., Dooley, D. M., Wang, R. H., Gray, H. B., Credonio, M., Mogno, F., et al. (1976). Letter: Susceptibility studies of laccase and oxyhemocyanin using an ultrasensitive magnetometer. Antiferromagnetic behavior of the type 3 copper in Rhus laccase. *J Am Chem Soc*, 98(4), 1029-1031.
- Solomon, E. I., & Lowery, M. D. (1993). Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science*, 259(5101), 1575-1581.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996). Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem Rev*, 96(7), 2563-2606.
- Steffens, G. C., Soulimane, T., Wolff, G., & Buse, G. (1993). Stoichiometry and redox behaviour of metals in cytochrome-c oxidase. *Eur J Biochem*, 213(3), 1149-1157.
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28(6), 1102, 1104.
- Sun, D., & Ding, A. (2006). MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA. *Nat Immunol*, 7(4), 375-381.
- Suzuki, S., Kataoka, K., & Yamaguchi, K. (2000). Metal coordination and mechanism of multicopper nitrite reductase. *Acc Chem Res*, 33(10), 728-735.
- Sykes, A. G. (1985). Structure and electron-transfer reactivity of the blue copper protein plastocyanin. *Chem. Soc. Rev.*, 14, 283-315.
- Takahashi, N., Ortel, T. L., & Putnam, F. W. (1984). Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(2), 390-394.
- Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.*, 17(1), 1-14.
- Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T., & Akira, S. (2000). Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol*, 12(1), 113-117.
- Tartaglia, L. A., Rothe, M., Hu, Y. F., & Goeddel, D. V. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell*, 73(2), 213-216.
- Tsodikov, O. V., Record, M. T., Jr., & Sergeev, Y. V. (2002). Novel computer program for fast exact calculation of accessible and molecular surface areas and average surface curvature. *J Comput Chem*, 23(6), 600-609.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., et al. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272(5265), 1136-1144.

- Vagin, A., & Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *Journal of Applied Crystallography*, 30(6), 1022-1025.
- Vakoufari, E., Wilson, K. S., & Petratos, K. (1994). The crystal structures of reduced pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis* S-6 at two pH values. *FEBS Lett*, 347(2-3), 203-206.
- van Amsterdam, I. M., Ubbink, M., Einsle, O., Messerschmidt, A., Merli, A., Cavazzini, D., et al. (2002). Dramatic modulation of electron transfer in protein complexes by crosslinking. *Nat Struct Biol*, 9(1), 48-52.
- Van de Kamp, M., Floris, R., Hali, F. C., & Canters, G. W. (1990). Site-directed mutagenesis reveals that the hydrophobic patch of azurin mediates electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, 112(2), 907-908.
- van Gastel, M., Boulanger, M. J., Canters, G. W., Huber, M., Murphy, M. E. P., Verbeet, M. P., et al. (2001). A Single-Crystal Electron Paramagnetic Resonance Study at 95 GHz of the Type 1 Copper Site of the Green Nitrite Reductase of *Alcaligenes faecalis*. *J. Phys. Chem. B*, 105(11), 2236-2243.
- Vogler, C., Hausen, H.-D., Kaim, W., Kohlmann, S., Kramer, H.E.A. und Rieker, J. (1989). Kupfer(I)-induzierte Bildung einer "organischen" Sandwich-Struktur – strukturelle Voraussetzungen für eine Lumineszenz von Zweikernkomplexen [(m-bipyrimidin){Cu(PR₃)₂}₂]₂X₂. *Angew. Chem.*, 101, 1734.
- Walker, W. E., Nasr, I. W., Camirand, G., Tesar, B. M., Booth, C. J., & Goldstein, D. R. (2006). Absence of innate MyD88 signaling promotes inducible allograft acceptance. *J Immunol*, 177(8), 5307-5316.
- Weik, M., Ravelli, R. B., Kryger, G., McSweeney, S., Raves, M. L., Harel, M., et al. (2000). Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(2), 623-628.
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., & Cao, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 7(6), 837-847.
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., et al. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExpASY server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-552.
- Williams, P. A., Fulop, V., Leung, Y. C., Chan, C., Moir, J. W., Howlett, G., et al. (1995). Pseudospecific docking surfaces on electron transfer proteins as illustrated by pseudoazurin, cytochrome c550 and cytochrome cd1 nitrite reductase. *Nat Struct Biol*, 2(11), 975-982.

- Xue, Y., Okvist, M., Hansson, O., & Young, S. (1998). Crystal structure of spinach plastocyanin at 1.7 Å resolution. *Protein Sci*, 7(10), 2099-2105.
- Yamagata, M., Merlie, J. P., & Sanes, J. R. (1994). Interspecific comparisons reveal conserved features of the *Drosophila* Toll protein. *Gene*, 139(2), 223-228.
- Yamaguchi, K., Kataoka, K., Kobayashi, M., Itoh, K., Fukui, A., & Suzuki, S. (2004). Characterization of two type 1 Cu sites of *Hyphomicrobium denitrificans* nitrite reductase: a new class of copper-containing nitrite reductases. *Biochemistry*, 43(44), 14180-14188.
- Yamaguchi, K., Shuta, K., & Suzuki, S. (2005). Roles of Trp144 and Tyr203 in copper-containing nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* IAM1013. *Biochem Biophys Res Commun*, 336(1), 210-214.
- Yanagisawa, S., Banfield, M. J., & Dennison, C. (2006). The role of hydrogen bonding at the active site of a cupredoxin: the Phe114Pro azurin variant. *Biochemistry*, 45(29), 8812-8822.
- Yanagisawa, S., & Dennison, C. (2003). Loop-contraction mutagenesis of a type 1 copper site. *J Am Chem Soc*, 125(17), 4974-4975.
- Yanagisawa, S., & Dennison, C. (2004). Loop-contraction mutagenesis of type 1 copper sites. *J Am Chem Soc*, 126(48), 15711-15719.
- Zaitseva, I., Zaitsev, V., Card, G., Moshkov, K., Bax, B., Ralph, A. and Lindley, P. (1996). The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centres *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1, 15–23.