



**Expression, Reinigung und molekulare Charakterisierung  
des Proteins ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Silke Anna Allekotte**

aus Köln

Düsseldorf, Mai 2008

Aus dem Institut für Biochemie der Pflanzen  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Georg Groth  
Koreferent: Prof. Dr. Rüdiger Simon

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2008

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 20.05.2008

*Für Wolfgang  
und für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
I.1	Wirkungsweise von Ethylen	1
I.2	Der Ethylensignalweg	4
I.3	EIN2 bildet eine zentrale Komponente des Ethylensignalwegs	6
I.4	EIN2 zeigt Homologie zu Metallionentransportern	9
I.5	Physiologische Auswirkungen in ein2-überexprimierenden Pflanzen	10
I.6	Mögliche Funktionen von EIN2	11
I.7	Die Bedeutung von Kalzium für die Pflanze	12
I.8	Kalzium in der Signaltransduktion	13
I.9	<i>EF-hand</i> -Proteine	14
I.10	Zielsetzung der Arbeit	16
II.	Material & Methoden	17
II.1	Material	17
II.1.1	Geräte	17
II.1.2	Verbrauchs- und Chromatographiematerialien	17
II.1.3	Chemikalien	18
II.1.4	Antikörper	18
II.1.5	Bakterienstämme	19
II.1.6	Vektoren	20
II.1.7	Oligonukleotide	22
II.2	Molekularbiologische Methoden	22
II.2.1	Nährmedien für Bakterienkulturen	23
II.2.2	Transformation von Bakterienkulturen	24
II.2.3	Isolierung von Plasmid DNA	25
II.2.4	DNA-Präzipitation mit Ethanol	26
II.2.5	Bestimmung der DNA Konzentration	26
II.2.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	26
II.2.7	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	27
II.2.8	Alkalische Phosphatase Behandlung von DNA	27
II.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten	28
II.2.10	Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion	28
II.2.11	Klonierung der <i>E. coli</i> -Vektoren zur Expression von EIN2 als Gesamtprotein und einzelner Domänen	29
II.2.12	Klonierung des <i>L. lactis</i> Vektor pNZ8048_EIN2 <sup>1-1294</sup>	30
II.3	Biochemische Methoden	31
II.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford	31
II.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
II.3.3	SDS-Gelfärbung mit Silbernitrat	32
II.3.4	Western Blot	33
II.3.5	2D-Gelelektrophorese	35
II.3.6	Zirkular Dichroismus- (CD-) Spektroskopie	36
II.3.7	Fluoreszenzspektroskopie	38
II.3.8	Isotherme Titrationskalorimetrie	43
II.3.9	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	48
II.3.10	Heterologe Expression von EIN2 <sup>1-1294</sup> in <i>L. lactis</i>	50
II.3.11	Heterologe Expression des Ethylenrezeptorproteins ETR1W <sub>total</sub> in <i>E. coli</i> und Reinigung	51
III.	ERGEBNISSE	54
III.1	Klonierungen und Proteinexpression	54

III.1.1	Expression des Volllängen-Proteins EIN2 <sup>1-1294</sup>	54
III.1.2	Expression von EIN2 <sup>479-1294</sup> in <i>E. coli</i>	56
III.1.3	Reinigung des rekombinanten Proteins EIN2 <sup>479-1294</sup> aus <i>E. coli</i>	58
III.2	Untersuchungen zur Sekundärstruktur von EIN2 <sup>479-1294</sup>	60
III.3	Analyse des Oligomerisierungszustands von EIN2 <sup>479-1294</sup>	62
III.4	Untersuchungen zur Ligandenbindung an EIN2 <sup>479-1294</sup>	63
III.4.1	Mikrokalorimetrische Untersuchungen zur Bindung von Kalzium an EIN2 <sup>479-1294</sup>	63
III.4.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Ligandenbindung an EIN2 <sup>479-1294</sup>	66
III.5	Analyse der Konformationsänderungen in EIN2 <sup>479-1294</sup> nach Ligandenbindung	72
III.6	Sequenzanalyse von EIN2 <sup>479-1294</sup> auf Kalziumbindungsmotive	73
III.7	Untersuchungen zur Bindung von Magnesium- und Manganionen an EIN2 <sup>479-1294</sup>	77
III.7.1	Vergleich der Dissoziationskonstanten für die Bindung von verschiedenen divalenten Kationen an EIN2 <sup>479-1294</sup>	80
III.8	Untersuchungen zur Interaktion zwischen EIN2 <sup>479-1294</sup> und dem Ethylenrezeptor ETR1	81
IV.	DISKUSSION	85
IV.1	Expression und Proteinreinigung	86
IV.1.1	Vorteile eines prokaryontischen Expressionssystems	86
IV.1.2	<i>Codon Bias</i> der Expressionssysteme	87
IV.1.3	Expression der C-terminalen Domäne von EIN2 in <i>E. coli</i>	90
IV.1.4	Reinigung der C-terminalen Domäne von EIN2	90
IV.2	Untersuchungen zur Funktion von EIN2	92
IV.2.1	Die Funktion von EIN2 bleibt auf der Grundlage physiologischer Effekte in der Pflanze unverstanden	92
IV.2.2	Untersuchungen zur Bindung von Kalzium an EIN2 <sup>479-1294</sup>	94
IV.2.3	Notwendige Voraussetzungen im Protein, um mittels Fluoreszenzspektroskopie Bindungsereignisse detektieren zu können	96
IV.2.4	Kalzium wird an zwei unterschiedlichen Typen von Bindungsstellen gebunden	98
IV.3	EIN2 besitzt putative <i>EF-hand</i> -Motive	99
IV.4	Die Bindung von Kalzium verursacht Konformationsänderungen in EIN2 <sup>479-1294</sup>	101
IV.5	EIN2 bindet Magnesium- und Manganionen	102
IV.6	Die Bedeutung der Bindung von zweiwertigen Kationen an EIN2 unter physiologischen Bedingungen	104
IV.7	EIN2 kann über seine membranextrinsische Domäne mit Proteinen des Ethylensignalwegs interagieren	105
IV.8	Kann EIN2 die Rolle eines Kalziumsensoren im Ethylensignalweg übernehmen?	106
IV.9	Das Verständnis der Aufgabe von EIN2 im Ethylensignalweg steht erst am Anfang	107
V.	Zusammenfassung	108
VI.	Literatur	110
VII.	Anhang	122
VII.1	Aminosäuresequenzen	122
VII.1.1	EIN2 Protein aus <i>A. thaliana</i>	122
VII.1.2	EIN2 <sup>479-1294</sup> Protein aus <i>A. thaliana</i>	123

VII.1.3	Vergleich der Sequenzlängen und Molekulargewichte des Volllängenproteins und der C-terminalen Domäne von EIN2	123
VII.2	Codon Bias	124
VII.2.1	<i>Codon Usage</i> zwischen <i>A. thaliana</i> und <i>E. coli</i>	124
VII.2.2	<i>Codon Usage</i> zwischen <i>L. lactis</i> und <i>E. coli</i>	125
VII.2.3	<i>Codon Usage</i> zwischen <i>L. lactis</i> und <i>A. thaliana</i>	126
VII.3	Abkürzungsverzeichnis	127
VIII.	Danksagung	128

# **I. EINLEITUNG**

Phytohormone sind niedermolekulare Signalstoffe in Pflanzen, die bereits in geringer Konzentration spezifische physiologische Reaktionen durch die Bindung an einen spezialisierten Rezeptor auslösen. Im Gegensatz zur Hormonwirkung in Tieren sind Phytohormone weniger an der Regulation des Stoffwechsels im differenzierten Organismus beteiligt, sondern sie kontrollieren vielmehr selbst Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Pflanze. Auch besitzen sie im Vergleich zu tierischen Hormonen eine geringere Gewebe- und Organspezifität. Daraus resultiert ein breites Wirkungsspektrum, das von der Induzierung der Samenkeimung über Stimulation des Sprosswachstums bis zu Seneszenzprozessen reicht [1]. Die Spezifität der von Phytohormonen ausgelösten Prozesse wird dabei vom jeweiligen Differenzierungszustand der Zelle bestimmt.

Die Vermittlung von Stresssignalen auf externe biotische und abiotische Faktoren steht ebenfalls unter der Kontrolle der Phytohormone. Dies ist besonders wichtig, da die sessile Lebensweise der Pflanzen physiologischen Differenzierungsprozesse sehr stark abhängig macht von der Anpassung an die am Standort vorherrschenden Umweltvorgaben wie z.B. die Licht-, Wasser- und Nährstoffverfügbarkeit. Dabei sind die Signalübertragungswege der einzelnen Phytohormone eng miteinander verknüpft, so dass ihr Zusammenspiel zu einer komplexen Wirkung in der Pflanze führt [2,3,4].

Um die Vernetzung des Wirkungsspektrums der Phytohormone bei der Differenzierung und der Anpassung der Pflanze an wechselnde Umweltbedingungen zu verstehen, müssen zunächst die Signalübertragungswege der einzelnen Phytohormone aufgeklärt werden, deren klassische Vertreter die Auxine, Giberelline, Cytokinine, Abscisinsäure und Ethylen sind.

## **I.1 Wirkungsweise von Ethylen**

Ethylen nimmt unter den Phytohormonen eine besondere Stellung ein. Da es sich um ein gasförmiges Molekül handelt, kann Ethylen ohne aktive Transportmechanismen durch das Intrazellulärensistem der Pflanze diffundieren und aufgrund seiner Löslichkeit sowohl in wässriger als auch in hydrophober Umgebung barrierefrei über Zellmembranen hinweg transportiert werden. Zudem



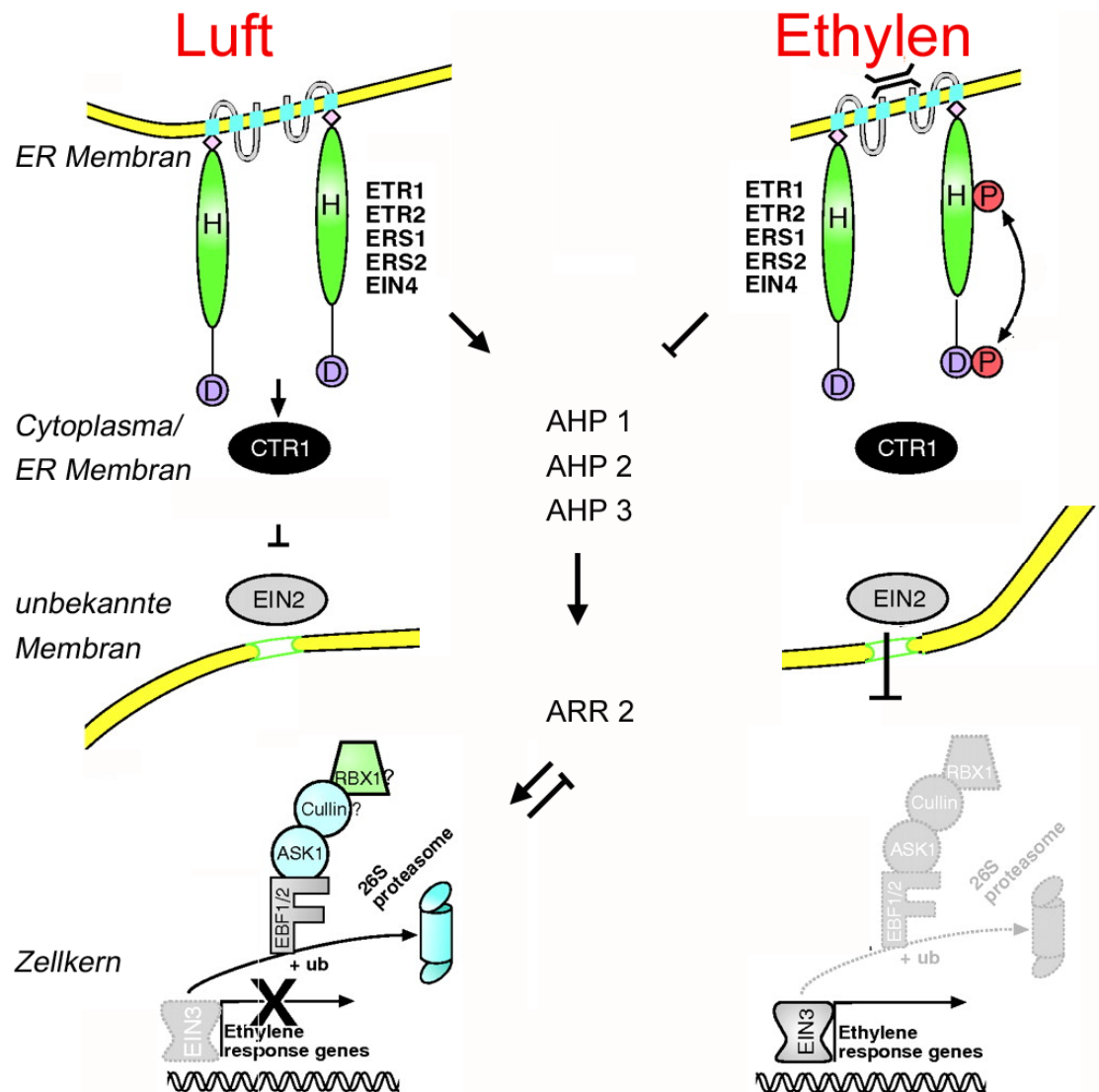
gestattet der gasförmige Aggregatzustand die Signalweitergabe auch zwischen verschiedenen Pflanzen.

Die Hormonwirkung von Ethylen ist beispielsweise bei physiologischen Prozessen wie der Fruchtreife, der Seneszenz der Blüte und der Blätter oder bei der Abszission bekannt [1]. Ebenso ist Ethylen bei Wachstumsvorgängen wie etwa der Keimung oder der Regulation der Zellstreckung beteiligt. Im Keimling induziert Ethylen etwa die Bildung des Hypokotylhakens, der das empfindliche Apikalmeristem beim Wachstum aus dem Boden vor Verletzungen schützt [5]. Auch ist Ethylen bei der pflanzlichen Antwort auf biotischen Stress beteiligt. Bei Pathogenbefall der Pflanze regelt diese ihre intrinsische Ethylensynthese hoch und induziert somit die Synthese von Abwehrenzymen und Phytoalexinen. [4,6].

Die pflanzenphysiologische Bedeutung des Gases Ethylen wurde bereits vor über einem Jahrhundert von dem Physiologen Neljubov erkannt. Er konnte an im Dunkeln gezogenen (etiolierten) Erbsenkeimlingen zeigen, dass diese bei Begasung mit nanomolaren Konzentrationen an Ethylen bereits einschneidende Veränderungen ihres Phänotyps aufwiesen. Diese Veränderung ist heute als die *triple response* (Dreifachantwort) bekannt [7]. Als morphologische Charakteristika der Dreifachantwort treten in Keimlingen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) eine Inhibition des Längenwachstums von Hypokotyl und Wurzel, eine radiale Anschwellung des Hypokotyls und eine übertrieben starke Krümmung des Apikalhakens ein. Diese Dreifachantwort konnte zur Identifizierung einiger am Ethylen-Signalweg beteiligten Komponenten genutzt werden. In einem genetischen Testsystem wurden dazu Keimlinge mit Ethylen begast und es wurde systematisch nach Ethylenantwort-Mutanten gesucht, die Änderungen in der Dreifachantwort zeigten. Diese Veränderungen waren entweder auf ein ethyleninsensitives Verhalten der Pflanzen zurückzuführen oder auf eine konstitutive Aktivierung des Signalwegs. Die Insensitivität war mit einem Ausbleiben der Dreifachantwort verbunden und konnte dabei entweder auf einen Defekt in der Wahrnehmung des Signals oder auf einen Defekt in der Signalweiterleitung zurückgeführt werden. Pflanzen mit einer konstitutiven Ethylenantwort zeigten dagegen auch ohne Ethylenbegasung den Phänotyp der Dreifachantwort.

Neben den an der Wahrnehmung beteiligten fünf Ethylenrezeptorproteinen konnten durch die genetische Analyse der so identifizierten Mutanten und der Charakterisierung der betroffenen Gene weitere, an der Signaltransduktion beteiligte

Proteine identifiziert werden und durch Epistasisanalysen in einen hierarchischen Zusammenhang gebracht werden [8,9,10]. Diese Untersuchungen führten zu der in Abbildung 1-1 gezeigten Vorstellung über die Ethylensignalvermittlung, in der Ethylen von membranintegralen Rezeptorproteinen wahrgenommen und das Signal über mehrere Schritte bis auf kernlokalisierte Transkriptionsfaktoren weitergegeben wird.



**Abb. I-1: Modell des Ethylen-Signaltransduktionswegs**

Dargestellt ist das Modell des Ethylensignalwegs, der durch die Ethylenrezeptoren negativ reguliert wird. In Abwesenheit von Ethylen aktivieren die Rezeptoren das Protein CTR1. Dieses hemmt die weitere Signaltransduktion, wodurch das Signal nicht an EIN2 weitergegeben und die Signalkaskade unterbrochen wird. Bei Wahrnehmung von Ethylen werden die Rezeptoren inaktiviert, so dass CTR1 das Signal über eine MAPK Kaskade an EIN2 weiterleiten kann, welches dann eine transkriptionelle Kaskade im Kern aktiviert. Dabei wird die Markierung für den proteolytischen Abbau der EIN3-Transkriptionsfaktoren durch Ubiquitin-Proteinligasen unterdrückt, so dass eine Antwort auf den Ethylenreiz induziert wird. Ein alternativer Weg zur Signalweitergabe ist durch den Mechanismus des Zweikomponentensystems eingezeichnet, beispielsweise über die Proteine AHP1-3 und ARR2.

AHP1-3, Arabidopsis Histidinphosphotransferproteine 1-3; ARR, Arabidopsis Antwortregulator; RBX1, RING Box 1 Protein; ASK1, Arabidopsis skp1 like protein; EBF1/2, EIN3 binding box protein 1/2; ub, Ubiquitin.

Verändert nach [11].

## **I.2 Der Ethylensignalweg**

In *A. thaliana* wird das Phytohormon Ethylen von einer aus fünf Mitgliedern bestehenden Familie von Rezeptorproteinen wahrgenommen. Neben ETR1 konnten die vier Proteine ERS1, ETR2, ERS2 und EIN4 als weitere Ethylenrezeptoren identifiziert werden [12-15]. Diese Proteine sind sich in ihrer Gesamtstruktur ähnlich und ihr modularer Aufbau spiegelt die Funktion der unterschiedlichen Domänen wieder. Aminoterminal liegt eine hydrophobe Membrandomäne, die das Protein in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert [16]. In diesem Bereich finden auch die Bindung von Ethylen [17-19] sowie eine Dimerisierung des Rezeptors statt [20].

Die Rezeptoren werden je nach Anzahl an Membrandurchgängen in der aminoterminalen Domäne und der Konservierung der für die Aktivität notwendigen Elemente in der Histidinkinasedomäne in zwei unterschiedliche Familien eingeteilt. Die Proteine der Klasse 1 (ETR1 und ERS1) besitzen drei transmembrane Helices und eine höhere Konservierung der Histidinkinasedomäne, während die Rezeptoren der Klasse 2 (ETR2, ERS2, EIN4) jeweils vier Transmembranhelices besitzen und nicht mit allen zur Kinaseaktivität notwendigen Elementen ausgestattet sind. Bezüglich ihrer Funktionalität konnte eine Redundanz der Rezeptoren festgestellt werden. Je nach Kombination der in *loss-of-function* Mutanten ausgeschalteten Rezeptoren variierte der Phänotyp der Dreifachantwort von ethylen-hypersensitiv bis konstitutiv. Eine konstitutive Antwort wurde bei Pflanzen mit fehlenden Rezeptoren der ETR1-ähnlichen Familie beobachtet, so dass auf eine übergeordnete Rolle der Histidinkinasedomäne geschlossen wurde [21]. Die Beteiligung der Histidinkinaseaktivität als notwendige Voraussetzung für die Ethylensignalweiterleitung wird kontrovers diskutiert. In den ersten dazu durchgeführten Untersuchungen konnte der Histidinkinasedomäne keine Rolle bei der Signalweiterleitung nachgewiesen werden, wie die unveränderte Ethylenantwort einer kinaseinaktivierten Version des ETR1-Rezeptorproteins in einer *etr1 ers 1* Doppelmutante zeigte. [22,23]. In einer neueren Untersuchung konnte allerdings ein kleiner Effekt der Histidinkinaseaktivität auf die Ethylenantwort gezeigt werden. Die Auswirkungen, die durch reduzierte oder ausgeschaltete Rezeptorkinaseaktivität in ETR1-Proteinen erzielt wurden, waren jedoch viel geringer als die Effekte, die unter der Annahme erwartet wurden, das

allein der Phosphorylierungszustand der Histidinkinasedomäne für die Signalweiterleitung verantwortlich ist [24].

Für die Weitergabe des Ethylensignals werden zwei verschiedene Wege in Betracht gezogen. Für den ersten Weg wird eine Signalweiterleitung über eine MAPK-Kaskade diskutiert. Durch die vorgestellten genetischer Versuchsansätze wurde CTR1 (*constitutive triple response 1*) als das in der Signalkaskade dem Rezeptor nachfolgendes Protein identifiziert. Bei diesem Protein handelt es sich um eine mit den Raf-Kinasen verwandte Serin-/Threonin-Kinase [25], die den Kopf einer MAPKK-Kinase Kaskade bildet. Über Dichtegradientenzentrifugation konnte eine Kolokalisation von CTR1 mit dem ETR1-Rezeptorprotein nachgewiesen werden [26]. Zwar ist der Mechanismus der Signalweitergabe noch nicht aufgeklärt, doch die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Ethylenrezeptoren und CTR1 im Hefe-Zwei-Hybridsystem und die Ergebnisse aus *in-vitro*-Bindungsstudien belegen die Interaktion der Histidinkinasedomäne der Rezeptoren ETR1, ERS1 und ETR2 mit Glycin 354 aus der regulatorischen Domäne von CTR1 [27,28]. Als Kopf einer MAPK-Kaskade kontrolliert CTR1 in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Ethylen die Aktivität verzweigter und in ihrer Wirkung antagonistischer MAPK Kaskaden. Das gemeinsame Ziel dieser Signaltransduktionsketten sind zwei Threoninreste im Transkriptionsfaktor EIN3 (*ethylene insensitive 3*), deren Phosphorylierungszustand das EIN3-Level im Kern kontrolliert. Bei Verfügbarkeit von Ethylen sind die Rezeptoren inaktiv. Daraus folgt eine Aktivierung des CTR1-Proteins, welches dadurch eine MKK9-MPK 3/6 Kaskade aktivieren kann, und über einen Zwischenschritt am EIN2 Protein für die Phosphorylierung von Threonin 174 in EIN3 verantwortlich ist. Diese Proteinmodifikation führt zur Stabilisierung des EIN3-Levels im Kern. In Abwesenheit von Ethylen wird unter Mitwirkung von CTR1 die MKK9-MPK 3/6 Kaskade inhibiert. Da es dennoch zu einer Phosphorylierung des Proteins an Threonin 592 kommt, wird die Beteiligung einer anderen, bislang noch nicht identifizierten MAPK Kaskade vermutet. Diese Phosphorylierung markiert EIN3 für die Ubiquitin/Proteasom-abhängige Degradation und führt durch die quantitative Kontrolle des EIN3-Levels letztlich zur Regulation der Transkription ethylenspezifischer Gene [29].

Als ein alternativer Weg für die Signalweitergabe wird ein *Phospho-Relay-Transfer* diskutiert. Carboxyterminal besitzen alle Ethylenrezeptorproteine eine Domäne mit unterschiedlich hoher Konservierung zu den Histidinkinasedomänen aus Zwei-

Komponenten-Systemen [30,31]. Dieser ursprünglich aus Bakterien und Pilzen bekannte Signalübermittlungsmechanismus besteht aus der Phosphatübertragung von einer Histidinkinase auf einen Aspartatrest einer Antwortregulatordomäne eines zweiten Proteins. Wird über die Sensordomäne der Histidinkinase ein Signal empfangen, so bewirkt dies die Autophosphorylierung eines Histidinrests in der Kinasedomäne. Durch den Transfer des Phosphats auf den Antwortregulator moduliert dessen Ausgabedomäne seine Aktivität. Aus den Zwei-Komponenten-Systemen der Hefen und höheren Pflanzen ist ein dreistufiger Übertragungsweg bekannt. Hier findet man Hybridhistidinkinasen, bei denen der Antwortregulator an die Kinasedomäne fusioniert ist. Das durch Autophosphorylierung des Histidinrests gebundene Phosphat der Kinase wird auf einen Aspartatrest im fusionierten Antwortregulator transferiert. Von dort übernimmt ein freies Phosphotransferprotein (HPT) den Transport des Phosphatrests und somit die Signalweiterleitung auf das Antwortregulatorprotein. Dieses liegt häufig kernlokalisiert vor und kann dort die Transkription der Zielgene modulieren [32-34]. Zu diesen Hybridhistidinkinasen weisen die Ethylenrezeptoren Homologie auf.

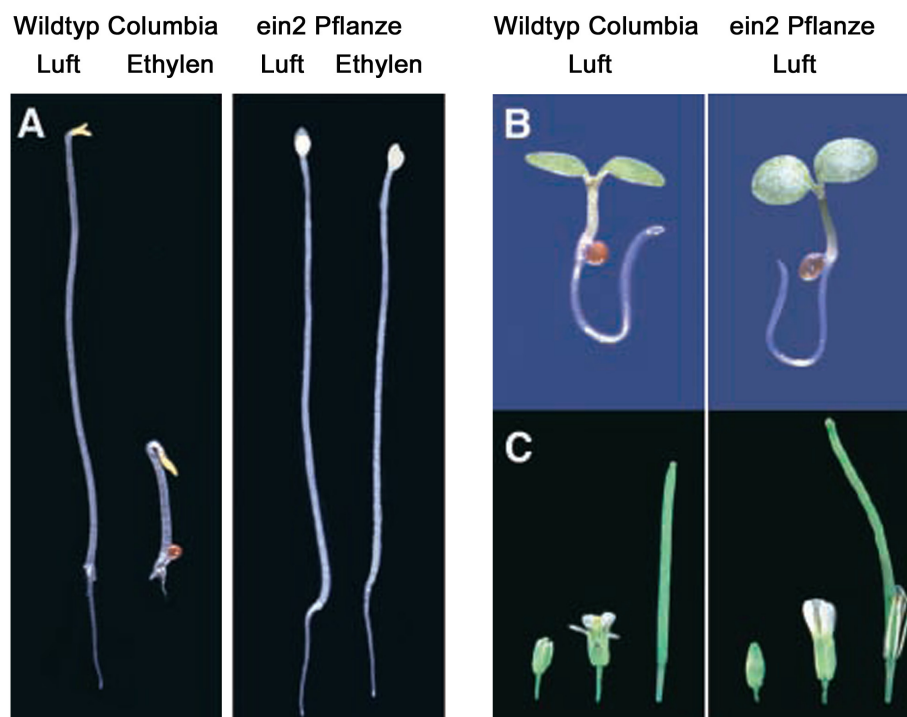
Die Belege sowohl für die Beteiligung einer MAPK Kaskade an der Signalweiterleitung des Ethylens als auch die Hinweise für einen zweikomponenten-system-ähnlichen Mechanismus der Signalweiterleitung führten zu der Hypothese, dass unterschiedliche physiologische Voraussetzungen in der Zelle zur Aktivierung des einen oder des anderen Signalübertragungsmechanismus führen. Der Phosphatübertragungsmechanismus über ein Zweikomponentensystem konnte bei der Signalweiterleitung des Phytohormons Cytokinin nachgewiesen werden. In Hinblick auf die Quervernetzung der verschiedenen Phytohormonwege kann der Weg über ein Zweikomponentensystem also nicht ausgeschlossen werden [35].

### **I.3 EIN2 bildet eine zentrale Komponente des Ethylen-signalwegs**

Das Protein EIN2 (*ethylene insensitive 2*) wurde im genetischen Testsystem der Dreifachantwort von *A. thaliana* als ein mutanter Locus entdeckt, der einen gegenüber Ethylenbegasung insensitiven Phänotyp zeigt [8]. Genetische Untersuchungen konnten das Gen *ein2* epistatisch zu den Rezeptorproteinen und CTR1 einordnen und so als nachfolgende Komponente des Signalwegs identifizieren.

Obwohl die funktionelle Aufgabe dieses Proteins bislang nicht nachgewiesen werden konnte, aktiviert EIN2 nach heutiger Vorstellung die Ethylenantwort als positiver Regulator und ist in der Signalkaskade zwischen CTR1 und den Transkriptionsfaktoren eingeordnet.

Mittlerweile sind über 25 verschiedene Allele dieses Gens bekannt, die alle mit Ausnahme des Allels ein2-9 eine komplette Insensitivität gegenüber Ethylen auf morphologischer, physiologischer und molekularer Ebene bewirken. Die mit den *loss-of-function* Mutationen einhergehenden phänotypischen Veränderungen betreffen dabei Wurzeln, Blätter, Blütenstamm und Blüte.



**Abb. I-2: Vergleich der Phänotypen verschiedener Entwicklungsstadien und Organe von *A. thaliana* im Wildtyp (Columbia) und in einer ein2-Null Mutante**

A: Vergleich 4 Tage alter, etiolierter Keimlinge, Anzucht in Luft oder bei Ethylenbegasung

B: Vergleich 3 Tage alter Keimlinge, die ohne Ethylen im Licht gewachsen sind

C: Phänotypen der Blüte von adulten Pflanzen

Verändert nach [36]

Das Gen für EIN2 aus *A. thaliana* (AtEIN2) wurde in einem *map-based positional cloning* Ansatz isoliert und kloniert [37]. Die mRNA codiert für ein Protein mit 1294 Aminosäureresten und einem theoretisch ermittelten Molekulargewicht von 141 kD. Die EIN2 Proteine unterschiedlicher Pflanzenarten zeigen einen hohen Verwandtschaftsgrad untereinander. Im Vergleich mit EIN2 aus *A. thaliana* weisen die EIN2 Proteine aus *Oryza sativa*, *Zea mays* und der Petunien-Spezies *Petunia 3*

*hybrida cv Mitchell Diploid [MD]* zwischen 37 % und 46 % Sequenzidentität auf Aminosäureebene auf [38,39].

Sequenzanalysen führten zu der Annahme, dass EIN2 eine ausgeprägte dimorphe Struktur besitzt und aus einer sehr hydrophoben aminoterminalen Domäne (AS 1-461) und einer überwiegend hydrophilen carboxyterminalen Domäne besteht [37]. Im aminoterminalen Bereich des Proteins befinden sich Strukturvorhersagen zufolge zwölf transmembrane Helices. Der Carboxylterminus wird durch eine nahe dem 12. Transmembransegment gelegene *Coiled-Coil*-Helix (AS Ser485-Leu515) charakterisiert. Auffällig sind vier Sequenzinseln mit besonders hoher Konservierung am Carboxyl-Terminus, die in EIN2 aus Arabidopsis von den folgenden Aminosäuren gebildet werden: 654-692 (I); 1055-1096 (II); 1123-1180 (III); 1221-1272 (IV). Von ihnen wird eine Beteiligung an Protein-Protein-Wechselwirkungen mit weiter abwärts gelegenen Komponenten des Ethylensignalwegs vermutet [38].

Auf welche Weise EIN2 an der Signalweiterleitung im Ethylensignalweg beteiligt ist, konnte aufgrund fehlender Information zur Funktion des Proteins nicht gezeigt werden. Auch die zelluläre Lokalisation von EIN2, die Hinweise auf eine mögliche Funktion des Protein geben könnte, schlug bislang fehl. Auch die Aminosäuresequenz von EIN2 lieferte keine Hinweise auf eine in der Zellsortierung bekannte Konsensussequenz. Der Einbau des Proteins in Membranen konnte zwar durch *In Vitro*-Translation und Sedimentationsanalyse nachgewiesen werden, doch die zelluläre Lokalisation durch GFP-Fusionsproteine oder über epitopmarkiertes Protein sowie EIN2-spezifische Antikörper schlug bislang fehl [37]. Somit bildet EIN2 die größte Lücke in der biochemischen Untersuchung des Ethylensignalwegs.

Um die Wirkungsweise und Funktion dieses einzigartigen Proteins näher zu verstehen, wurde versucht, den einzelnen Domänen des EIN2 Proteins eine Funktion zuzuordnen. Dazu wurde die Sequenz von EIN2 in einer Datenbankanalyse mit Proteinen bekannter Funktion abgeglichen. Für die aminoternale, hydrophobe Domäne wurde Homologie zu Nramp-Proteinen (*Natural resistance-associated macrophage protein*) festgestellt. Der carboxyterminale, überwiegend hydrophile Bereich von EIN2 weist dagegen keine Homologie zu bekannten Proteinen auf [37].

## **I.4 EIN2 zeigt Homologie zu Metallionentransportern**

Bei Nramp-Proteinen handelt es sich um eine Familie von integralen Membranproteinen, die in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren vertreten sind [40-43]. Die Homologie zwischen den in Mäusen entdeckten Proteinen zu denen in Hefe, Reis und Fliege identifizierten Proteinen beträgt zwischen 42 und 73 % auf Aminosäureebene [40,43,44]. Der Name dieser Proteinfamilie geht auf ihre Funktion bei der nicht-immunvermittelten Pathogenabwehr in Säugern zurück, bei denen diese Proteine als Effluxpumpen von zweiwertigen Metallionen die Pathogenreplikation in Makrophagen verringern und somit deren Infektiosität senken. Auffälligstes Merkmal der Nramp-Proteine ist ihre ausgeprägte Hydrophobizität. Typischerweise besitzen sie einen hoch konservierten Kern von zehn bis zwölf Transmembranhelices sowie ein bis zwei zusätzliche Transmembransegmente ohne Sequenzkonservierung. In den verbindenden Schlaufen zwischen den hydrophoben Segmenten findet man ebenfalls konservierte Bereiche mit Motiven für Glykosylierung und Transportsequenzen [40].

In Komplementationsstudien konnte die Beteiligung von Nramp-Proteinen an der Metallhomöostasis der Zelle und beim Transport von Metallionen nachgewiesen werden [45-51]. Für das Nramp-Protein SMF1 aus Hefe konnte neben dem Transport von Manganionen [42] auch weitere Spezifität für Zink-, Cadmium-, Kobalt-, Eisen- und Kupferionen belegt werden [46,52]. Auch das in *Xenopus* Oocyten exprimierte DCT1 Protein (Nramp2 Homolog aus Ratten) konnte als ein Proton-gekoppelter Eisentransporter identifiziert werden, der eine breite Spezifität für verschiedene andere zweiwertige Metallionen besitzt [48].

Für *A. thaliana* wurden bis heute sechs Nramp-Proteine identifiziert, die eine Homologie von etwa 70% auf Aminosäureebene aufweisen. Zusätzlich wurde EIN2 dieser Klasse zugeordnet, obgleich der Homologiegrad zu den übrigen *A. thaliana* Nramp-Homologen nur etwa 20 % beträgt und sich nur auf die aminoternale Domäne bezieht [49]. Obwohl für die AtNramp-Proteine sowohl in Hefe als auch *in planta* Metalltransporteraktivität nachgewiesen werden konnte [37,49,53], war dies für EIN2 bislang nicht möglich [37, 49]. Auch in *Xenopus*-Oocyten oder im Baculovirus-System konnte keine Transportaktivität für EIN2 nachgewiesen werden [37].



## I.5

### **Physiologische Auswirkungen in ein2-überexprimierenden Pflanzen**

Die vollständige Insensitivität der bekannten ein2-Mutanten gegenüber Ethylen machte deutlich, dass dieses Protein eine zentrale Rolle im Ethylensignalweg einnimmt. Um die physiologischen Auswirkungen zu untersuchen, die durch die zwei unterschiedlichen Proteindomänen von EIN2 bewirkt werden, wurden neben dem vollständigen EIN2-Protein auch verkürzte Varianten des Proteins in *A. thaliana* mit genetischem ein2-Null-Hintergrund (ein2-5) überexprimiert. Dabei führten sowohl die Expression des vollständigen Proteins als auch des aminoterminalen Proteinfragments weiterhin zu einer vollständigen Insensitivität gegenüber Ethylen. Die Expression der carboxyterminalen Domäne (CEND) von EIN2 löste dagegen eine konstitutive Ethylenantwort aus, die in adulten ein2-5:CEND Pflanzen zur Bildung kleinerer Blattrosetten führte [37].

Wurden diese Pflanzen ohne Nähstoffzufuhr im Licht zur Keimung gebracht und mit Ethylen begast, entwickelten die transgenen ein2-5:CEND-Pflanzen Hypokotyle mit einer Länge, wie sie bei wildtypischen Pflanzen beobachtet werden. In ein2-5-Pflanzen führten diese Keimungsbedingungen dagegen zu verkürzten Hypokotyl-längen. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass durch das Einbringen der carboxyterminalen Domäne CEND in einen ein2-mutanten Hintergrund eine konstitutive Aktivierung der Ethylen-Antwort hervorgerufen werden konnte [37]. Die Rolle des C-Terminus von EIN2 bei der Signalweiterleitung wurde auch durch die *Northern Blotting* Analyse der transgenen CEND-Pflanzen bestätigt. Dort konnte die Expression der ethylenregulierter Gene GST2, basische Chitinase und EBP nachgewiesen werden. Da die Ethylenbegasung solcher Pflanzen keine Veränderung des sonstigen Expressionsmusters der Zelle bewirkte, muss die Weiterleitung des Ethylensignals durch CEND vermittelt worden sein [37]. Somit konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die C-terminale, membran-extrinsische Domäne von EIN2 für die Weiterleitung des Ethylensignals verantwortlich ist. Bis heute ist es jedoch noch nicht gelungen zu ermitteln, wie EIN2 das Signal wahrnimmt und es an die weiteren Komponenten des Signalwegs übermittelt.

## **I.6 Mögliche Funktionen von EIN2**

Für viele der im Ethylensignalweg beteiligten Komponenten konnten strukturelle Äquivalente in eukaryontischen Signalkaskaden (bspw. ETR1/SLN1, CTR1/Raf-1) gefunden werden. Für EIN2 konnte ein solches Gegenstück aus anderen Signaltransduktionswegen nicht ermittelt werden. Besonders die hydrophile, carboxyterminale Domäne zeigt in Datenbankanalysen keine offensichtliche Ähnlichkeit zu anderen Proteinen. Bei der Suche nach funktionellen Äquivalenten wurden jedoch Parallelen zwischen EIN2 und den aus Hefe bekannten Glukosesensoren SNF3 und RGT2 offensichtlich. Durch ihre signifikante Ähnlichkeit in der N-terminalen Domäne zu den Glukosetransportern HXT wurden diese Sensoren irrtümlich als Transportproteine identifiziert. Neuere Studien dagegen konnten zeigen, dass diese Proteine als Glukosesensoren arbeiten. Die besondere Rolle der hydrophilen carboxyterminalen Domänen dieser Proteine als Signaltransmitter im Glukosesignalweg wurden durch Experimente im Zwei-Hybrid-System in Hefe identifiziert [54,55]. Die Modellvorstellung, dass ein primäres, Signalgebendes Ereignis intrazellulär stattfindet, wird durch Experimente unterstützt, in denen der cytoplasmatische „Schwanz“ von SNF3 auch ohne direkte Anheftung an die Cytoplasmamembran das Signal weiterleiten kann [56-58]. Diese Ergebnisse weisen große Parallelen zum EIN2-Protein auf. Auch für CEND konnte gezeigt werden, dass das hydrophile Proteinfragment bei Überexpression unabhängig von der membranständigen NH<sub>2</sub>-terminalen Domäne die Signalweiterleitung aktivieren kann [37]. Für SNF3 stellte Kruckeberg [56] die Theorie auf, dass unter bestimmten Umständen der C-terminale „Schwanz“ des Proteins als Antwort auf die Glukoseverfügbarkeit vom restlichen Protein abgetrennt werden kann und das so verkürzte Protein an den Kern adressiert wird, wo es an der Aktivierung der Zielgene beteiligt ist. Eine direkte Interaktion der jeweiligen C-terminalen Domäne von SNF3 und RGT2 mit kernlokalisierten Transkriptionsfaktoren konnte nachgewiesen werden [55].

Die funktionelle Analogie der C-terminalen Domäne der Zuckersensoren zu EIN2 führte zu der Hypothese, dass EIN2 möglicherweise als Sensor für ein vorangegangenes Signal arbeitet. Im Gegensatz zu den Glukosesensoren fehlt EIN2 jedoch ein Bereich mit konservierten Aminosäuren, von denen eine Beteiligung an der Interaktion mit nachgeschalteten Faktoren der Signaltransduktion vermutet wird.

Stattdessen wird für EIN2 durch Sekundärstrukturvorhersagen eine *Coiled-Coil-Helix* vorhergesagt [37]. Dieses Motiv wurde bereits als Interaktionsort für Protein-Protein-Wechselwirkungen identifiziert und ist möglicherweise auch in EIN2 für die Interaktion mit anderen Signalweiterleitungselementen verantwortlich [59].

Die Kombination einer Nramp-ähnlichen, aminoterminalen Domäne mit der hydrophilen carboxyterminalen Domäne, die funktionelle Ähnlichkeit zu Glukose-sensoren aufweist, führte zu der Theorie, dass es sich bei EIN2 möglicherweise um einen divalenten Kationen-Sensor handelt. Chen [60] schlägt eine Regulation des Ethylensignalwegs durch die Anpassung der Ionenkonzentration in der Zelle durch das EIN2-Protein vor. Eine andere Vorstellung ist, dass EIN2 an der Bestimmung der Konzentration an zweiwertigen Kationen beteiligt ist, um so den physiologischen Status von Zellen oder Geweben festzustellen und diese Information in das Ethylensignal zu integrieren [59].

Als möglicher Kandidat für dieses unbekannte zweiwertige Kation wird Kalzium diskutiert. Diesem Ion konnte bereits eine Beteiligung an der Ethylenantwort nachgewiesen werden [61,62]. Es konnte aber bislang nicht geklärt werden, welche Funktion dem EIN2-Protein bei der Ethylensignalweiterleitung zukommt.

## **I.7 Die Bedeutung von Kalzium für die Pflanze**

Kalzium erfüllt in der Pflanze unterschiedlichste Aufgaben. So ist das Ion an der Strukturgebung von Zellwänden und Membranen sowie am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt, tritt im Stoffwechsel als Kofaktor diverser Enzyme auf, wirkt in zellulären Signalketten auf verschiedenste Stimuli (Umwelt, hormonell- oder entwicklungsbedingt) als *second messenger*, und ist beispielsweise an der Regulation der Spaltöffnungsbewegungen, Gentranskription und Apoptosis beteiligt [63].  $\text{Ca}^{2+}$  wird von der Pflanze als gelöstes Ion über die Wurzel aufgenommen und gelangt über das Xylem in den Sproß. Von dort vermitteln  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanäle in der Plasmamembran die Aufnahme in die Zellen [64]. Allerdings üben hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auf die Zelle einen toxischen Effekt aus, da sie oberhalb einer kritischen Konzentration zur Präzipitation von unlöslichem Kalziumphosphat führt. Daher kommt es bei unkontrolliertem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle zur Entfernung von Phosphat aus dem Cytosol und somit zum Zusammenbrechen des ATP-Metabolismus und weiterführend zum Tod der Zelle. Die Zelle hat aus diesem Grund Mechanismen zur Aufrechterhaltung einer konstanten Konzentration von

100-200 nM an freiem cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) entwickelt [65].  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  Antiporter entfernen  $\text{Ca}^{2+}$  entgegen dem elektrochemischen Gradienten aus dem Cytoplasma und transportieren es in den Apoplast oder speichern es im Lumen intrazellulärer Organellen wie Vakuole und Endoplasmatischem Retikulum (ER), wo das Ion in einer  $10^4$ - $10^5$  fach höheren Konzentration im Vergleich zum Cytoplasma gespeichert wird [66,67].

## **I.8 Kalzium in der Signaltransduktion**

Die aufgrund des geringen Löslichkeitsproduktes von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{PO}_4^{2-}$  konstant niedrige Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  im Cytosol stellte die ideale Voraussetzung für die Evolution eines auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen basierenden Signalsystems in Pflanzen dar [68]. Bei der Stimulierung von Zellen durch verschiedenste Umwelt- (u.a. Licht, Hormone, Dürre, Berührung, Temperaturstress) oder chemische Reize (u.a. Hormone, cyclische Nukleotide) wird ein Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über Kanäle in der Plasmamembran oder in den Vakuolen- und ER-Membranen beobachtet, der zu einer drastischen Erhöhung der Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  im Cytosol führt [69]. Die Bedeutung dieses Ausgleichs im Konzentrationsgefälle und die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  als Vermittler in der Signaltransduktion auf verschiedenste Stimuli werden momentan stark diskutiert. Ohne Zweifel konnte ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  auf verschiedenste Reize nachgewiesen werden, jedoch ist es nicht ausreichend geklärt, ob dies die eigentliche Signalweiterleitung der Zelle darstellt oder ob es sich nur eine „Begleiterscheinung“ bei der Signaltransduktion handelt, in der der eigentliche Reiz über andere Mechanismen weitergeleitet wird.

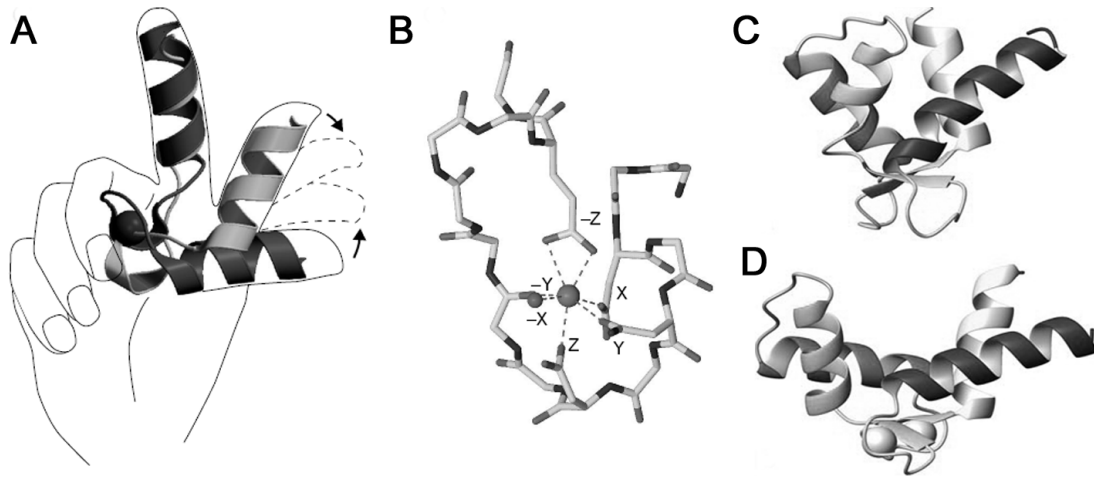
In Anlehnung des Einflusses von  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Signaltransduktion in tierischen Zellen wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signatur-Hypothese entwickelt, wonach in Pflanzen jeder Reiz eine spezifische, vorübergehende  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  generiert, in deren temporären (Amplitude, Dauer, Frequenz) und räumlichen (Ort, Dimension, Verteilung) Ausdehnung die Information für eine adäquate Antwort der Zelle auf physiologischer Ebene codiert ist [70,71]. Bislang konnten mit dieser Hypothese allerdings nur die Spaltöffnungsbewegungen in Pflanzen einwandfrei erklärt werden [72]. In einem anderen Modell handelt es sich bei dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in der Zelle um einen Schalter, der kalziumsensitive Signaltransduktionskomponenten aktiviert [73]. Bei diesen handelt es sich zumeist um  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine, die entsprechend ihrer Aktivität in zwei Hauptklassen eingeteilt werden können:  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren übersetzen das chemische

Signal einer ansteigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol durch Interaktion mit einem Zielprotein in diverse biochemische Antworten. Dabei wird die Signaltransduktionskette durch  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Konformationsänderungen zwischen verschiedenen Proteinen fortgeführt. Das wohl bekannteste Beispiel aus dieser Klasse ist Calmodulin.  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferproteine dagegen, wie z.B. Parvalbumin, binden überschüssiges freies  $\text{Ca}^{2+}$  konstitutiv mit einer Affinität  $<100$  nM und halten durch Abtransport des Ions aus der Zelle die Homöostasis aufrecht.

## **I.9 EF-hand-Proteine**

Mit über 3000 Einträgen in der *NCBI reference sequence databank* bildet die *EF-hand*-Proteinfamilie die bedeutendste Klasse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensorproteine [74]. Sie besitzen für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  und anderen Metallionen ein Helix-Loop-Helix-Motiv, in dem die Anordnung von E- und F-Helices an den Daumen und den Zeigefinger einer Hand erinnern [75]. Die Sequenz dieses Motivs besteht aus 29 hintereinander folgenden Aminosäuren, von denen die ersten neun Aminosäuren die Eingangshelix (E-Helix) des Motivs bilden. Die Ausgangshelix (F-Helix, Aminosäuren 19-29) ist über einen Loop mit der E-Helix verbunden. In diesem befinden sich die Aminosäuren, deren Seitenketten die Liganden zur Chelatisierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions stellen. Da es sich bei Kalzium um ein hartes Ion handelt, bevorzugt  $\text{Ca}^{2+}$  ebenfalls harte Liganden für ionische Interaktionen [76]. Diese werden im Loop durch die Häufung von negativen Ladungen in Form der  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Carboxylsauerstoffe der Aminosäuren Asparagin- bzw. Glutaminsäure zur Verfügung gestellt. Die chelatisierenden Positionen im Loop sind zum einen durch ihre Position in der linearen Sequenz der 12 Aminosäuren des Loops und zum anderen durch ihre dreidimensionale Anordnung benannt und liegen auf den Achsen einer pentagonalen Bipyramide: Positionen 1(+X), 3(+Y), 5(+Z), 7(-Y), 9(-X) und 12(-Z). Die Paare +Y/-Y und +Z/-Z bilden dabei ein planares Pentagon, und das Paar +X/-X steht senkrecht auf der so gebildeten Ebene [77]. Um ein Pentagon mit nur vier Liganden bilden zu können, wird der fünfte Eckpunkt und somit die siebente Koordinationsstelle des  $\text{Ca}^{2+}$  Ions durch einen zweiten Liganden aus der -Z Position bereitgestellt. Die Selektivität für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  geht hauptsächlich auf die zwei Koordinierungsstellen an Position -Z zurück. Bei Austausch des konservierten Glutamatrests gegen ein Aspartat in der regulatorischen leichten Kette von Myosin

beispielsweise führt dieser Austausch zu einer Bevorzugung von  $Mg^{2+}$  anstelle von  $Ca^{2+}$ -Ionen [78].



**Abb. 1-3: Das *EF-hand*-Motiv**

**A:** schematische Abbildung eines *EF-hand*-Motivs. Helix E wird durch den Zeigefinger und Helix F durch den Daumen der rechten Hand symbolisiert. Bei Bindung von Kalzium kommt es durch eine Bewegung von Helix F zu einem Übergang von der geschlossenen Konformation (hellgrau) in eine offene Konformation (dunkelgrau). Entnommen aus [78]

**B:** Geometrie der  $Ca^{2+}$ -Liganden im Bindungsloop. Entnommen aus [78].

**C:** geschlossenen Konformation des *EF-hand*-Motivs von sTroponin C aus der Skelettmuskulatur

**D:** offene Konformation des *EF-hand*-Motivs von sTroponin C aus der Skelettmuskulatur. Entnommen aus [79].

In den zahlreichen nicht-kanonischen *EF-hand*-Motiven erfolgt die Koordination des Ions dagegen fast ausschließlich über die Carbonyl-Sauerstoffe der Hauptkette. Eine Ausnahme besteht für den konservierten carboxyterminalen Glutaminsäurerest an Position -Z, der auch im nicht-kanonischen Loop den Liganden für die Bindung des Ions stellt. Die ähnliche, bipyramidale Geometrie für die Bindung kann dabei häufig nur durch Insertionen und Deletionen aufrecht erhalten werden, die zur Variation der Looplänge zwischen 11 und 14 Resten (Calpain (11), Osteonectin (13), Calbindin<sub>D9K</sub> (14)) führen [81-84]. Zudem findet man in nicht-kanonischen *EF-hand*-Motiven mit Insertionen eine oktahedrale Anordnung der Liganden. In diesem Fall erfolgt die Chelatisierung ausschließlich über die zu Beginn des Loop liegenden Aminosäuren, da der Glutamatrest für eine potentielle Bindung zu weit entfernt liegt [77].

Fast immer liegen *EF-hand*-Motive paarweise angeordnet vor, wobei die zwei *EF-hand*-Motive über einen Linker mit flexibler Länge verbunden sind. Bildet ein Protein eine Domänenstruktur aus, so findet man häufig auch eine größere Anzahl an *EF-hand*-Paaren. Calbindin<sub>D9K</sub> ist mit nur einem *EF-hand*-Paar einer der kleinsten Vertreter dieser Proteinfamilie [85]. Im Gegensatz dazu konnten in dem

Multidomänenprotein Calumenin 7 *EF-hand*-Motive identifiziert werden [86]. Die Calmodulin-ähnlichen Proteine besitzen typischerweise 4 *EF-hand*-Motive, die als Tandem auf zwei unterschiedliche Domänen des Proteins verteilt sind und dadurch die Bildung einer stabilen *EF-hand*-Struktur ermöglichen. Abweichungen von dem gepaarten Verhalten der *EF-hand*-Domänen zeigen z.B. die Proteine Tescalin und Calpain [82,87]. Im Parvalbumin stabilisiert die ungepaarte *EF-hand* die aus *EF-hand*-Paar 2/3 gebildete Domäne. Auch im Calpain ist die ungepaarte *EF-hand* nicht an einer Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  beteiligt, sondern ist für die strukturelle Stabilität des Heterodimers notwendig. Typischerweise erfolgen durch die Bindung von Kalzium Konformationsänderungen.

## **I.10 Zielsetzung der Arbeit**

Zu Beginn der Arbeit lagen ausschließlich genetische Untersuchungen zum Protein EIN2 aus *A. thaliana* vor, in denen die physiologischen Auswirkungen von mutanten EIN2-Proteinen bei der Ethylenantwort auf verschiedenste Stimuli beschrieben waren.

In dieser Arbeit sollten erstmals Bedingungen für die heterologe Expression in *E. coli* etabliert werden, sowie ein Reinigungsprotokoll entwickelt werden, welches EIN2 in ausreichender Menge für biochemische Untersuchungen zur Verfügung stellte.

Mittels mikrokolorimetrischer und spektroskopischer Methoden sollte EIN2 funktionell und strukturell charakterisiert werden. Aufgrund der Ähnlichkeit der aminoterminalen Domäne von EIN2 zu den Nramp-Metallionentransportern sollte der Fokus der Arbeit auf die Untersuchung einer möglichen Bindung von zweiwertigen Ionen an EIN2 gelegt werden.

Für den Ethylensignalweg wird die Bildung eines Multiproteinkomplex diskutiert, der eine effiziente Signalweiterleitung ermöglichen könnte. Daher sollten mögliche Wechselwirkungen von EIN2 mit weiteren am Ethylensignalweg beteiligten Proteinen untersucht werden. Die mögliche Funktion von EIN2 als divalenter Kationensensor und die Beteiligung von Kalzium am Ethylensignalweg an einer bislang unbekannt Stelle legen den Schluß nahe, dass EIN2 am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sein könnte. Daher sollte besonders eine mögliche Interaktion mit dem Ethylenrezeptorprotein ETR1 untersucht werden, für den bereits eine Lokalisation an der Membran des ERs nachgewiesen wurde.

## **II. Material & Methoden**

### **II.1 Material**

#### **II.1.1 Geräte**

Autoklav, H & P	Labortechnik - Oberschleißheim
Chemilumineszenzdetektor LAS 1000	Fuji Film - Tokio, Japan
Eppendorf 5810R Kühlzentrifuge (Rotoren F-34-6-38, A-4-44)	Eppendorf - Hamburg
Fluoreszenzspektrometer LS 55	Perkin Elmer - Jügesheim
French Pressure Cell Press	Heinemann - Schwäbisch Gmünd
40K French Press Aufschlusszelle	Heinemann - Schwäbisch Gmünd
Kulturschüttler Innova 44R	New Brunswick - Nürtingen
MicroCalorimeter VP - ITC	Microcal LLC - Northampton, USA
Reinstwasseranlage Milli Q Gradient	Millipore - Schwalbach
Spektralpolarimeter J715	Jasco Labor – und Datentechnik GmbH - Großumstadt
Spektralphotometer DU 800	Beckman Coulter - Krefeld
Standkühlzentrifuge Avanti J-26 XP (Rotoren Ti 70.1, SW55)	Beckman Coulter - Krefeld
Thermocycler Master Gradient	Eppendorf - Hamburg
Ultrazentrifuge Optima L-80 XP (Rotoren: JA 10, JA 25.50)	Beckman Coulter - Krefeld

#### **II.1.2 Verbrauchs- und Chromatographiematerialien**

Amicon Ultra-4 Ultrafiltratoren MWCO 30 und 50 kDa	Millipore - Schwalbach
Amicon Ultra-15 Ultrafiltratoren MWCO 30 und 50 kDa	Millipore - Schwalbach
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare - München
Intein Beads	New England Biolabs - Frankfurt
PD10 SephadexTMG-25M Säulen	GE Healthcare - München
Sequi-Blot PVDF Membran 0,2 µm	BioRAD - München



### II.1.3 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in analytischer Qualität (p.a.) von den folgenden Firmen bezogen:

Acros Organics, Geel (BE); AppliChem, Darmstadt; Becton Dickinson, Heidelberg; Carl Roth, Karlsruhe; J. T. Baker, Deventer (NL); Merck, Darmstadt; Millipore, Schwalbach, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, München. Zum Ansetzen von Stammlösungen, Puffern und Kulturmedien wurde demineralisiertes Wasser verwendet, das mit einer Milli-Q-Reinstwasseranlage sterilfiltriert wurde.

### II.1.4 Antikörper

#### II.1.4.1 Primärantikörper

##### ***Maus IgG Tetra - His Antikörper, Qiagen - Hilden***

Dieser Antikörper bindet an Proteine, die mindestens 4 hintereinander liegende, zugängliche Histidinreste besitzen und ist somit zum Nachweis von Proteinen mit Hexahistidinanker geeignet. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

##### ***Maus IgG-Anti Chitin Binding Domain Serum, New England Biolabs - Frankfurt***

Dieser Antikörper erkennt ein Peptid der chitinbindenden Domäne aus *Bacillus circulans* und wird gegen Proteine eingesetzt, die mit dem IMPACT System heterolog exprimiert und gereinigt werden. Das Serum wurde in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt.

#### II.1.4.2 Sekundärantikörper

##### ***Peroxidase gekoppelter anti IgG-Maus Antikörper, GE Healthcare - München***

##### ***Peroxidase gekoppelter anti IgG-Hase Antikörper, GE Healthcare – München***

## **II.1.5 Bakterienstämme**

### ***II.1.5.1 Bakterienstämme der Gattung *Escherichia coli* (*E. coli*)***

#### ***XL1 Blue***

Der *E. coli* Stamm XL1 Blue (Stratagene - La Jolla, CA, USA) wurde zur Amplifikation von DNA verwendet (Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1lac[F'proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)]).

#### ***BL21(DE3)***

Im Chromosom dieses Bakterienstamms ist eine Kopie der T7 RNA Polymerase unter der Kontrolle des lac-Promotors integriert, so dass die Expression der T7 RNA Polymerase erst durch Zugabe des Induktors Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert werden kann. BL21(DE3) Zellen wurden von der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) bezogen. (Genotyp: *E. coli* B F- dcm ompT hsdS(rB-mb-) gal (DE3))

#### ***ER2566***

ER2566 besitzt ebenfalls ein T7-RNA-Polymerase-System und wird von der Firma New England Biolabs (Frankfurt a.M.) für die Expression heterologer Proteine in den pTYB-Vektoren im IMPACT-System vertrieben. Da bei pET-Vektoren das gleiche Expressionssystem verwendet wird, können diese Zellen auch für die Expression von pET-Vektorkonstrukten verwendet werden.

(Genotyp: F- λ- fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10) (TetS) endA1 [dcm]) [88].

#### ***C41 (DE3) und C43 (DE3)***

C41 (DE3) und C43 (DE3) sind Derivate des Stamms BL21 (DE3), die eine erhöhte Effizienz bei der Expression von toxischen Membranproteinen aufweisen [89].

#### ***Rosetta-gami (DE3)***

Dieser Bakterienstamm unterstützt die Expression von Proteinen, in denen selten genutzte Codons von *E. coli* vorkommen. Zudem erlaubt er die Disulfidbrückenbildung im Cytoplasma durch zwei Mutationen im cytoplasmatischen Disulfid-

Reduktions-Reaktionsweg (Genotyp:  $\Delta$ ara  $-$ leu7697  $\Delta$ lac X74  $\Delta$ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL(DE3) F'[lac+ lacIq pro] gor522::Tn10trxB pRARE).

### ***II.1.5.2 Bakterien der Gattung *Lactococcus lactis* (*L. lactis*)***

#### ***L. lactis* NZ9000**

Hierbei handelt es sich um den plasmidfreien Stamm MG1363 von *L. lactis subsp. cremoris*, bei dem die Gene nisKR in das pepN Gen integriert wurden [90]. Daraus resultierte ein pepN-negativer Phänotyp.

*L. lactis* ist ein gram-positives Bakterium, das bereits seit mehr als 5000 Jahren für die Herstellung von fermentierten Milchprodukten wie Käse und Quark genutzt wird. Dieser Prokaryont besitzt für die Expression von Fremdprotein große Vorzüge: ein stark regulierter Promotor ermöglicht die Expression auch toxischer Gene, es wird keine Bildung von *Inclusion Bodies* beobachtet und er besitzt weder extrazelluläre, proteolytisch aktive Enzyme noch Endotoxine.

## **II.1.6 Vektoren**

### ***pET21a\_MCSpET28a***

Hierbei handelt es sich um einen in unserem Labor klonierten *E. coli* Expressionsvektor auf der Grundlage von pET21a (Novagen, Darmstadt). Für dieses Konstrukt wurde das Plasmid pET28a mit den Restriktionsenzymen XbaI und SalI geschnitten. Dabei entstand ein Fragment, das sich aus dem Bereich 5' Bereich vor dem N-terminalen Hexahistidinanker bis in die *Multiple Cloning Site* (MCS) kurz vor den C-terminalen Hexahistidinanker zusammensetzte und über diese Schnittstellen in pET21a ligiert werden konnte. Mit dem bereits in pET21a vorhandenen Hexahistidinanker am 3'Ende der MCS entstand so ein Expressionsvektor, der Fusionsproteine mit 2 His-Tags ermöglicht. Als Selektionsmarker steht im pET21a\_MCSpET28a-Vektor das  $\beta$ -Lactamasegen für die Vermittlung einer Ampicillinresistenz zur Verfügung.

In zwei unterschiedlichen Konstrukten enthält dieser Vektor die cDNA für die Aminosäuren 1-1294 des EIN2 Gens aus *A. thaliana* pET21a\_MCSpET28a\_EIN2<sup>1-1294</sup>, sowie die C-terminale Domäne von EIN2 (Aminosäuren 479-1294, pET21a\_MCSpET28a\_EIN2<sup>479-1294</sup>).

***pRARE***

Das Plasmid pRARE (Novagen, Darmstadt) kodiert die tRNAs für die in *E. coli* selten genutzten Codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA. Finden sich besonders in den ersten 20 Aminosäuren eines heterolog exprimierten Gen eine Häufung dieser Codons, so kann es zu einer Beeinträchtigung der Expression kommen. Die gleichzeitige Expression der tRNAs diese Plasmids parallel zur Expression eines Zielgens soll diesen Effekt verhindern. Das Plasmid ist zur Selektion mit einer Chloramphenicolresistenz ausgestattet.

***pTYB12***

Bei diesem Vektor handelt es sich um einen *E. coli* Vektor, welcher die rekombinante Proteinexpression in Zellen mit einem T7-RNA-Polymerase-System ermöglicht (New England Biolabs, Frankfurt). In der MCS wird eine N-terminale translationale Fusion des VMA Intein aus *S. cerevisiae* (Sce VMA) mit dem Zielprotein hergestellt. Die an das Intein gekoppelte Chitin-bindende Domäne (CBD) aus *B. circulans* gestattet dabei die Affinitätsreinigung des Fusionsproteins über immobilisierte Inteinkügelchen (IMPACT-System). Als Selektionsmarker trägt das Plasmid eine Ampicillinresistenz.

***pNZ8048\_hlyB***

Für die Expression in *L. lactis* wurde der Vektor pNZ8048\_hlyB von der AG Prof. L Schmitt (Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um ein Expressionsplasmid, in das bereits das Gen hlyB über die Schnittstellen NcoI und KpnI kloniert war. Die Expression eines Zielgens befindet sich unter strikter Kontrolle des NisA Promotors. Durch Zugabe des Induktors Nisin wird ein bakterielles Zwei-Komponenten-System aktiviert, bei dem durch Bindung des Induktors Nisin an das Protein NisK dessen Autophosphorylierung initiiert wird. Dabei wird ein Phosphat zur Signalweitergabe auf NisR übertragen und die Expression wird durch Bindung von NisR an den NisA Promotor aktiviert. Das Plasmid ist mit einer Chloramphenicolresistenz zur Selektion ausgestattet. In dieses Plasmid wurde die cDNA des EIN2 Gens (AS 1-1294) aus *A. thaliana* einkloniert.

***pETR1\_W11LW53FW74FW181LW265LW288LW563L***

In Kurzform wurde dieses Plasmid wurde das Plasmid pETR1W<sub>total</sub> genannt.

Das Plasmid wurde von Dr. J. Voet van Vormizeele (AG Prof. Groth, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Es beinhaltet die Substitutionsmutante ETR1W<sub>total</sub>, bei der die Codons aller sieben Tryptophane des ETR1-Rezeptorproteins aus *A. thaliana* gegen Codons für die Aminosäuren Leucin oder Phenylalanin ausgetauscht sind. Das Gen wurde über die NdeI- und BamHI-Restriktionsschnittstellen in den Vektors pET16b eingefügt. Somit wurde das rekombinante Protein mit einem Dekahistidinanker ausgestattet.

### II.1.7 Oligonukleotide

Zur Amplifikation und Klonierung der Gensequenz von EIN2 und Genfragmenten dieses Proteins wurden folgende Oligonukleotide von der Firma MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

<b>Klonierung EIN2<sup>1-1294</sup> in pET21a_MCSpET28a über NheI und EagI</b>	
5' AtEIN2N-Terminus	5-CTA GCT AGC ATG GAA GCT GAA ATT GTG AAT GTG-3
3AtEIN2C-Term EagI	5-CCC GGC CGT CAA ACC CAA TGA TCC GTA CGC AGT CA-3
<b>Klonierung EIN2<sup>479-1294</sup> in pET21a_MCSpET28a über NheI und EagI</b>	
5' AtEIN2C-Terminus	5-CTA GCT AGC AAT GCT TTA TCT TAT CCA TCT GTT
3AtEIN2C-Term EagI	5-CCC GGC CGT CAA ACC CAA TGA TCC GTA CGC AGT CA-3
<b>Klonierung EIN2<sup>1-1294</sup> in pTYB12 über SpeI und NotI</b>	
EIN2Spe	5-GGA CTA GTA TGG AAG CTG AAA TTG TGA ATG TC-3
EIN2 Not	5-TTG CGG CCG CTC AAC CCA ATG ATC CGT ACG CAG T-3
<b>Klonierung EIN2<sup>1-1294</sup> in pNZ8048_hlyB über BspHI und SpeI</b>	
5-EIN2-BspHI_for	5-AGG AGA TAT ATC ATG AAC AGC AGC CAT CAT-3
EIN2N+C_SpeIrev	5-TTT GTT AGC AGC ACT AGT TCA GTG GTG GTG-3

## II.2 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden, soweit nicht anders angegeben, nach dem Laborbuch „Molecular cloning - a laboratory manual durchgeführt [91]. Sterile Lösungen wurden entweder autoklaviert (20 min, 120 °C, 1,1 bar) oder sterilfiltriert (Rotrand Filter, 0,2µm, Schleicher & Schuell, Dassel).

## **II.2.1 Nährmedien für Bakterienkulturen**

### **II.2.1.1 Nährmedien zur Anzucht von *E. coli***

Die Medien wurden in geeigneten Kulturgefäßen angesetzt und zur Sterilisation bei 120 °C für 20 Minuten autoklaviert. Zur Selektion auf das verwendete Plasmid erfolgte die Zugabe von Antibiotika in der jeweiligen gewünschten Endkonzentration (Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 34 µg/ml). Medium für Fest-Kultur-Platten wurde zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar zugefügt.

#### 2YT Medium

16 g/ l Baktotrypton

10 g/ l Hefeextrakt

5 g/ l NaCl

#### LB Medium

10 g/ l Baktotrypton

5 g/ l Hefeextrakt

5 g/ l NaCl

(+ 15 g/ l Baktoagar )

Ampicillin (Stammlösung): 100 mg/ml, gelöst in Wasser, sterilfiltriert

Chloramphenicol (Stammlösung): 34 mg/ml, gelöst in Ethanol, sterilfiltriert

### **II.2.1.2 Nährmedien zur Anzucht von *L. lactis***

In Flüssigkultur wurde *L. lactis* in M17 Medium + 0,5 % (w/v) Glukose im Inkubator bei 30 °C ohne Schütteln angezogen. Als Medium für Festkulturen wurde GSM-Agar verwendet. Als Selektionsmarker enthielten beide Medien 5 µg/ml Chloramphenicol.

#### M17 Medium (Difco) + 0,5 % Glukose

5 g/ l Casein pankreatisch verdaut

5 g/ l Sojapepton

5 g/ l Fleischextrakt

2,5 g/ l Hefeextrakt

0,5 g/ l Ascorbinsäure

0,25 g/ l Magnesiumsulfat

19 g/ l Natrium- $\alpha$ -glycerophosphat

0,5 % Glukose (w/v)

Chloramphenicol (Stammlösung): 5 mg/ml, gelöst in Ethanol, sterilfiltriert

#### GSM-Agar

M17 Medium

+ 0,5 % Glukose (w/v)

+ 0,5 M Saccharose

+ 11 g/ l Bactoagar

## **II.2.2 Transformation von Bakterienkulturen**

### ***II.2.2.1 Transformationprotokoll für E. coli***

#### ***Herstellung transformationskompetenter E.coli-Zellen***

Zur Aufnahme von DNA wurden *E. coli* Zellen mit der Rubidiumchlorid-Methode nach Hanahan [92] kompetent gemacht. 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 angezogen. Die Zellen wurden 15 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (15 Minuten, 2000 x g, 4°C). Das Pellet wurde vorsichtig in 30 ml eiskalter TFBI-Lösung resuspendiert, die Zellen eine Stunde auf Eis inkubiert und erneut für 15 Minuten bei 2000 x g, 4°C zentrifugiert. Nach Resuspension der Zellen in 10 ml TFBII-Puffer und 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Bakterien-suspension zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### TFBI

100 mM Rubidiumchlorid  
50 mM Manganchlorid  
30 mM Kaliumacetat  
10 mM Kalziumchlorid  
pH 5,8 (eingestellt mit Essigsäure)

#### TFBII

10 mM Rubidiumchlorid  
10 mM MOPS  
30 mM Kalziumchlorid  
15 % Glyzerin (w/v)  
pH 6,8 (eingestellt mit NaOH)

#### ***Transformation kompetenter E. coli-Zellen***

Die nach II.2.2.1 kompetent gemachten Zellen konnten durch einen Hitzeschock mit Plasmid-DNA transformiert werden. Dafür wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 50-100 ng Plasmid-DNA vermischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen für 60 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen, erneut 5 Minuten auf Eis inkubiert und mit 250 µl LB-Medium versetzt. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurden die Zellen 60 Minuten bei 37 °C in einem Thermomixer geschüttelt (300 UpM). Der Transformationsansatz wurde in 50 µl-Aliquots auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit den erhaltenen Einzelkolonien wurden Übernachtskulturen (5 oder 500 ml) angeimpft, die entweder für Plasmidpräparationen oder als Vorkulturen für Expressionen verwendet wurden.

### **II.2.2.2 Transformationsprotokoll für *L. lactis***

#### ***Herstellung transformationskompetenter *L. lactis*-Zellen***

Mit einer Einzelkolonie *L. lactis* aus einer Festkultur wurden 5 ml SMGG-Medium inokuliert und bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Die nach zwei Tagen angewachsene Kultur wurde benutzt, um eine Übernachtskultur in 5 ml SMGG zu starten. Mit dieser wurden dann 200 ml SMGG angeimpft und die Zellen bis zu einer OD<sub>660</sub> von 0,5 - 0,7 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 10 000 x g, 4°C) geerntet und durch dreimaliges Waschen mit je 50 ml Waschpuffer und erneutes Zentrifugieren (10 min, 2800 x g, 4°C) von noch vorhandenem Glyzin befreit. Nach Resuspension des Pellets in 2 ml Waschpuffer wurde die Bakterien-suspension zu 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 C gelagert.

Ab dem Zeitpunkt der Zellernte wurden alle Schritte auf Eis ausgeführt und es wurden eiskalte Lösungen verwendet.

#### SMGG-Medium

M17 Medium

+ 0,5 % Glukose (w/v)

+ 0,5 M Saccharose

+ 1 % Glyzin (w/v)

#### Waschpuffer

0,5 M Saccharose

10 % Glyzerin (w/v)

#### ***Transformation von *L. lactis* durch Elektroporation***

50 µl transformationskompetente *L. lactis* Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 - 2 µl DNA vermischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit vorgekühlten Küvetten (Elektrodenabstand 0,2 cm, Peqlab, Erlangen) bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω in einem Elektroporator.

Die Zellen wurden sofort mit 1 ml SMGG-Medium versetzt und zwei Stunden bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf GSM-Agar ausgestrichen und für 24 Stunden bei 30 C inkubiert.

### **II.2.3 Isolierung von Plasmid DNA**

Plasmidpräparationen aus *E. coli* wurden mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen-Hilden) nach der Anleitung des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt (QIAprep Miniprep Handbuch, Ausgabe November 2005).



Plasmidpräparationen aus *L. lactis* wurden ebenfalls nach dem Protokoll des QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen-Hilden). Zusätzlich zur alkalischen Lyse war ein Verdau der Bakterienwand mittels Lysozym notwendig. Dazu wurde dem resuspendierten Zellpellet Lysozym in einer Endkonzentration von 10 mg/ml zugegeben und der Lyseansatz für 10 Minuten bei 55°C inkubiert.

#### **II.2.4 DNA-Präzipitation mit Ethanol**

Das Volumen der DNA-haltigen Probe wurde bestimmt, die Lösung mit 1/10 Volumen 7 M Ammoniumacetat und drei Volumen Ethanol (100 %) versetzt, gut durchmischt und 60 Minuten bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (10 min, 12.000 x g, 4°C) sedimentiert, und das Pellet mit 0,2 ml 70 % Ethanol (v/v) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 12.000 x g, 4°C) wurde das gewaschene Pellet bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und im gewünschten Volumen des benötigten Puffers aufgenommen.

#### **II.2.5 Bestimmung der DNA Konzentration**

Konzentrationsbestimmungen von verdünnten DNA Proben erfolgten photometrisch in einer Quarzküvette bei 260 nm. Zur Verdünnung und als Referenz diente H<sub>2</sub>O. Eine OD<sub>260</sub> = 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ ml doppelsträngiger DNA.

#### **II.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II der Firma New England Biolabs (Frankfurt a. M.) und ihre mitgelieferten Puffer verwendet. In einen analytischen Ansatz wurden 300 ng DNA in einem Volumen von 20 µl eingesetzt, präparative Spaltungen wurden in einem Volumen von bis zu 50 µl durchgeführt. Restriktionsspaltungen mit zwei Enzymen, die unterschiedliche Reaktionspuffer benötigen, wurden sequentiell durchgeführt. Bei ähnlichen Pufferbedingungen wurde zunächst ein Enzym dem Reaktionsansatz zugefügt. Nach dessen Inaktivierung bei 65°C (20 Minuten) wurde ohne weitere Reinigung das zweite Enzym zugesetzt. Bei Verwendung von Enzymen mit unterschiedlichen Puffern wurde eine Gelelution vor der Zugabe des zweiten Enzyms durchgeführt. Pro Spaltungsschritt wurden die Ansätze für mindestens zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Erfolg der Restriktionsspaltung durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

Analytischer Ansatz

300 ng DNA  
2 µl 10 x Puffer (je nach verwendetem Enzym)  
2 µl 10 x BSA  
5 U Restriktionsendonuklease  
ad 20 µl H<sub>2</sub>O

**II.2.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe in einer Gelmatrix. Je nach erwarteter Fragmentgröße betrug die Agarosekonzentration 0,8 – 2 % (w/v). Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf etwa 55°C mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt. Die Agaroselösung wurde in den Gelträger einer Elektrophoresekammer gegossen, ein Probenkamm eingesetzt und bei RT ausgehärtet. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 10 x Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Die Größe der Fragmente konnte durch die gleichzeitige Auftrennung von 1 kb-Marker (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) bestimmt werden.

Zur Isolierung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden die Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert.

TBE-Puffer

108 g/l Tris  
55 g/l Borsäure  
9,3 g/l EDTA  
pH 8,0 (Borat)

10 x DNA-Probenpuffer

50 % Glycerin (v/v)  
0,1 % Bromphenolblau (w/v)

**II.2.8 Alkalische Phosphatase Behandlung von DNA**

Um die Religation eines geschnittenen Plasmids in einem Ligationsansatz zu vermeiden, wurden die freien 5'-Phosphatgruppen durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (shrimp alkaline phosphatase, SAP, Roche) entfernt. Dazu wurden in einem 20 µl Ansatz 10 µg des geschnittenen Plasmids mit 5 U SAP gemischt, 2 µl des entsprechenden Puffers zugesetzt und für 30 Minuten bei 37°C

inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz 15 Minuten bei 65°C inkubiert. Zur Überprüfung des Dephosphorylierungserfolgs wurde in Ligationsansätzen neben dephosphoryliertem Vektor eine Kontrolle mit linearisiertem Vektor durchgeführt. Das dephosphorylierte Plasmid konnte ohne weitere Verfahren direkt in einen Ligationsansatz eingesetzt werden.

### **II.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten**

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisiertem Vektor wurde das Insert-Fragment in einem drei- bis fünffach molarem Überschuß zum Vektor eingesetzt. Die Ligation erfolgte unter Verwendung von T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) und ihrem Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Pro Ligationsansatz wurden 30 U Ligase verwendet. Der Ligationsansatz wurde in ein Wasserbad mit 22°C gestellt und dieses über Nacht im Kühlraum inkubiert. So wurde eine kontinuierliche Erniedrigung der Reaktionstemperatur auf 6 °C erreicht. Der Erfolg der Ligation wurde durch Transformation des Ansatzes in *E. coli* XL 1 Blue-Zellen oder in *L. lactis* NZ9000-Zellen überprüft

### **II.2.10 Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Fragmente. Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese kann eine DNA-Sequenz, die durch zwei Oligonukleotide definiert wird, exponentiell vermehrt werden. Grundlage für diese Technik war die Entdeckung der thermostabilen DNA Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* [93].

Für PCRs mit einer zu amplifizierenden Fragmentlänge bis zu 3000 Basenpaaren wurde Pwo-Polymerase der Firma PeqLab Biotechnology, Erlangen verwendet. Bei Fragmentlängen über 3000 Basenpaaren wurde die Pfu-Turbo-Polymerase der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) verwendet, die eine Mischung aus Pfu-Polymerase und dem *Archae Maxx polymerase enhancing factor* darstellt und bei langen Matrizen vorlagen für eine gesteigerte Ausbeute bei gleichzeitig geringer Fehlerrate in der PCR sorgt. Die Größe der entstandenen PCR Fragmente wurde auf einem Agarosegel (II.2.7) analysiert und zur Reinigung von übrigen Oligonukleotiden und

dNTPs aus dem Gel isoliert. Nach Verdau mit Restriktionsenzymen (II.2.6) konnten die PCR-Fragmente mit linearisiertem, dephosphoryliertem Plasmid ligiert werden (II.2.9). Die Sequenzierung der klonierten PCR Fragmente erfolgte durch die Firma Genterprise GmbH, Mainz.

#### PCR Ansatz

500 ng DNA Matrize  
5 µl 10 x Pwo Reaktionspuffer  
5 µl 5`Primer (10 pmol/ µl)  
5 µl 3`Primer (10 pmol/ µl)  
10 µl dNTP Mix (1,25 mM)  
1 µl Pwo-Polymerase  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O

#### PCR Programm

1. Zyklus 5 min 95°C  
2.-35. Zyklus 1 min 95°C  
1 min 54°C  
3 min 72°C  
32. Zyklus 10 min 72°C

### **II.2.11 Klonierung der *E. coli*-Vektoren zur Expression von EIN2 als Gesamtprotein und einzelner Domänen**

#### ***Herstellung von pET21a\_MCSpET28a\_EIN2<sup>1-1294</sup> und pET21a\_MCS pET28a\_EIN2<sup>479-1294</sup>***

Aus einer cDNA Bank von im Dunkeln angezogenen *A. thaliana* Keimlingen (pD3-Plasmidbank, Genfragmenten größer als zwei Kilobasen, freundliche Gabe der AG Prof. P. Westhoff, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) wurde die cDNA Sequenz von EIN2 (EIN2<sup>1-1294</sup>) sowie das Genfragment EIN2<sup>479-1294</sup> mit Hilfe der PCR amplifiziert. Beide DNA-Fragmente wurden durch die eingesetzten Primer mit flankierenden NheI- und EagI-Restriktionserkennungsstellen ausgestattet.

Für die Klonierung von EIN2<sup>1-1294</sup> wurden die Primer 5`AtEIN2N-Terminus und 3AtEIN2C-TermEagI ausgewählt. Da das Stopcodon des Gens durch eine zusätzliche Base im Primer nicht abgelesen wird, beendet erst das hinter dem 3`terminalen Hexahistidinanker gelegene Stop-Codon die Transkription und führt zu einem Protein mit zweifachem Hexahistidinanker. Zur Amplifikation von EIN2<sup>479-1294</sup> wurden die Primer 3AtEIN2C-TermEagI und 3AtEIN2C-TermEagI verwendet. Hier wurde ebenfalls durch den Einbau einer zusätzlichen Base im 3`-Primer die Fusion an einen C-terminalen Hexahistidinanker im Plasmid ermöglicht.

Die gereinigten PCR Fragmente wurden mit den Enzymen NheI und EagI einem Restriktionsverdau (II.2.6) unterzogen. Geschnittener und dephosphorylierter Vektor pET21a\_MCS pET28a wurde gemeinsam mit den PCR-Fragmenten in eine

Ligationsreaktion (II.2.9) eingesetzt. Der Vektor, der die Aminosäuren 1-1294 des EIN2-Proteins enthält, wurde pET21a\_MCSpET28a\_EIN2<sup>1-1294</sup> genannt, der ausschließlich die C-terminale Domäne mit den Aminosäuren 479-1294 enthaltene Vektor pET21a\_MCS pET28a\_EIN2<sup>479-1294</sup>.

#### ***Herstellung von pTYB12\_EIN2<sup>1-1294</sup>***

Für die Klonierung dieses Konstrukts zur Herstellung einer Intein-EIN2-Fusion wurde eine weitere PCR mit den Primern EIN2\_Spe und EIN2\_Not auf der Matrize pET21a\_MCSpET28a\_EIN2<sup>1-1294</sup> durchgeführt. In dem 5'-Primer wurde vor dem Startcodon des Gens die Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease SpeI eingefügt, in den 3'-Primer unmittelbar vor dem komplementären Stoppcodon die Schnittstelle für das Restriktionsenzym NotI. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit diesen Enzymen geschnitten und mit dem dephosphorylierten Vektor pTYB12 in eine Ligation eingesetzt. Dieser Vektor, der die cDNA Sequenz der Aminosäuren 1-1294 des EIN2 Proteins enthält, wurde pTYB12\_EIN2<sup>1-1294</sup> genannt.

#### **II.2.12 Klonierung des *L. lactis* Vektor pNZ8048\_EIN2<sup>1-1294</sup>**

Da die in der MCS des Vektors pNZ8048 bereitgestellten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen bereits in dem Gen EIN2 aus *A. thaliana* vorkamen, wurde eine Klonierungsstrategie angewendet, bei der kompatibel überhängende Enden im Plasmid und im Gen hergestellt wurden. Dabei wurden Plasmid und Insertfragment mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten, die in den eingesetzten Enzymkombinationen BspHI / NcoI sowie SpeI / XbaI kompatible überhängende Enden generieren und durch Basenpaarung miteinander ligiert werden können.

Für die Klonierung des Gens EIN2<sup>1-1294</sup> wurde eine PCR mit dem Plasmid pET21a\_MCSpET28a\_EIN2<sup>1-1294</sup> als Matrize durchgeführt. Als 5'-Primer wurde 5-EIN2\_BspHI\_for gewählt. Dieser bindet in der Matrize beginnend in der Ribosomenbindestelle des Plasmids, ersetzt die vorhandene NcoI Restriktionsschnittstelle gegen die Erkennungsstelle für das Enzym BspHI und läuft weiter in der Sequenz von pET21a\_MCS pET28a\_EIN2<sup>1-1294</sup>. Der 3'-Primer EIN2N+C\_SpeI\_rev ist ein komplementärer Primer, der zwischen dem T7-Terminator und dem C-terminalen Hexahistidinanker beginnt. Der Primer umfasst die drei letzten Codons des His-Tags, das angrenzende Stoppcodon und setzt unmittelbar dahinter eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym SpeI. Durch diese Klonierungsstrategie

werden die im Vektor pET21a\_MCS pET28a\_EIN2<sup>1-1294</sup> vorhandenen N- und C-terminalen Hexahistidinanker in der PCR mitamplifiziert und können für die Reinigung des Proteins genutzt werden.

Das gereinigte PCR Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen BspHI und SpeI behandelt. Gemeinsam mit dem mit NcoI und XbaI geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pNZ8048\_hlyB wurde dieses in eine Ligationsreaktion eingesetzt. Das Gen hlyB wurde durch diesen Klonierungsansatz vollständig entfernt. Der so entstandene Vektor wurde pNZ8048\_EIN2<sup>1-1294</sup> benannt.

## **II.3 Biochemische Methoden**

### **II.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

Proteinproben wurden mittels BioRAD Protein Assay (BioRAD, München) auf ihren Proteingehalt untersucht. Diese kolorimetrische Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an vorwiegend basische und aromatische Aminosäuren in Proteinen [94]. Die damit verbundene Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm kann photometrisch bestimmt werden. Dazu wurden 900 µl der 1:5 verdünnten BioRAD-Testlösung zu 1 bis 20 µl der Proteinlösung gegeben, der gut gemischte Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei einer Extinktion von 595 nm gemessen. Es wurden jeweils Doppel- oder Dreifach-bestimmungen durchgeführt. Zur Quantifizierung der Proben wurde eine Kalibrierung des Messsystems mit 0-10 µg Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) durchgeführt.

### **II.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Größenauftrennung von Proteinen bzw. zur Überprüfung der Reinheit verschiedener proteinhaltiger Proben wurden Polyacrylamidgele nach der von Laemmli [95] entwickelten Methode verwendet. Die diskontinuierlichen SDS-PAGE Gele setzten sich aus 8 -10 %igen (Acrylamid, w/v) Trenn- und 5 %igen (Acrylamid, w/v) Sammelgelen zusammen. Die Elektrophorese kleiner Gele (Mighty Small, 8 x 10 cm, 0,75 mm Stärke, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) mit 10 oder 15 Probenaschen erfolgte bei 30 – 50 mA für durchschnittlich 1,5 Stunden. Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in großen Gelen mit Platz für 40-60 Proben wurde über Nacht bei 50 mA durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 4-fach SDS- Probenpuffer versetzt. Als

Größenstandard wurde der Precision Plus Dual Color Marker (BioRAD, München) verwendet. Die Zusammensetzung für ein großes Gel ist in dem nachfolgenden Schema aufgeführt, für ein kleines Gel wurden nur etwa 1/10 der Volumina eines großen Gels benötigt. Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurden erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugefügt.

5 x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris HCl pH 6,8

0,4 % SDS (w/v)

2,5 x Trenngelpuffer

1,5 M Tris HCl pH 8,8

0,4 % SDS (w/v)

10 x Elektrophoresepuffer

0,25 M Tris

1,92 M Glyzin

0,5 % SDS (w/v)

4 x SDS-Probenpuffer

0,1 M Tris

0,1 M Borsäure

5 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM DTT

6 % SDS (w/v)

16 % Saccharose (w/v)

0,16 % Bromphenolblau (w/v)

	Sammelgel (4 %)	Trenngel (8 %)	Trenngel (10 %)
Acrylamidlösung 30 % AA, 0,8 % BAA	5 ml	21,3 ml	26,7 ml
Sammelgelpuffer (5 x)	6 ml	-	-
Trenngelpuffer (2,5 x)	-	32 ml	32 ml
H <sub>2</sub> O	18,8 ml	26,5 ml	21 ml
TEMED	0,03 ml	0,04 ml	0,04 ml
10 % APS (w/v)	0,2 ml	0,25 ml	0,25 ml

### **II.3.3 SDS-Gelfärbung mit Silbernitrat**

Bei der Silberfärbung nach der Vorschrift von Heukeshoven und Dernick [96] handelt es sich um eine sehr empfindliche Methode zum Nachweis von Proteinen in SDS PAGE Gelen. Das Polyacrylamidgel wurde nach Beendigung der Elektrophorese aus der Gelapparatur entfernt, für 30 Minuten in Fixierlösung inkubiert und anschließend ebenso lang in Inkubatorlösung geschwenkt. Für die weitere Färbung

musste das Gel dreimal für 10 Minuten gründlich mit bidest. Wasser gewaschen werden. Es folgte die Behandlung mit Färbelösung für 30 Minuten. Zur Entwicklung des Gels wurde die Färbelösung entfernt, das Gel kurz mit bidest. Wasser gewaschen und dann in Natriumcarbonatlösung entwickelt. Der Zusatz von 1/10 Volumen Stopplösung beendete die Entwicklung. Zur Dokumentation wurde das Gel in Folie eingeschweißt und eingescannt.

Fixierlösung

30 % Ethanol (v/v)

10 % Essigsäure (v/v)

Inkubatorlösung

30 % Ethanol (v/v)

0,5 % Natriumacetat (w/v)

0,2 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (w/v)

Färbelösung

0,1 % AgNO<sub>3</sub> (w/v)

0,14 % Formaldehyd (v/v)

Entwicklerlösung

2,5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v)

0,14 % Formaldehyd (v/v)

Stopplösung

2,3 M Zitronensäure

### **II.3.4 Western Blot**

Bei der Western Blot Analyse werden Proteine aus einem Polyacrylamidgel durch die Anlegung eines elektrischen Felds auf eine Membran übertragen und können dann mittels Immundetektion sichtbar gemacht werden.

#### ***II.3.4.1 Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran***

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels semi-dry Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA83, Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Dazu wurden die Transfermembran und sechs Whatmanfilterpapiere in Gelgröße zurechtgeschnitten und mit dem Gel in Transferpuffer getränkt. Auf die Anode der Western Blotting Apparatur (PerfectBlue 'Semi-Dry', Peqlab, Erlangen) wurden drei Filterpapiere luftblasenfrei platziert. Darüber wurden die Nitrocellulosemembran und das SDS-PAGE-Gel geschichtet, Anschließend wurden drei weitere Lagen Filterpapier auf den Stapel geschichtet. Mit Auflegen der Kathode wurde der semi-dry Blotaufbau



verschlossen. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 90 Minuten. Der Erfolg des Proteintransfers wurde durch eine Ponceau S Färbung überprüft.

Transferpuffer

0,25 M Tris pH 8,3

0,15 M Glycin

10 % Ethanol (v/v)

Ponceau S Färbelösung

0,5 % Ponceau S (w/v)

gelöst in 1 % Essigsäure

**II.3.4.2 Immundetektion der membrangebundenen Proteine**

Über eine antikörperspezifische Reaktion erfolgte der selektive Nachweis der Proteine auf der Nitrocellulosemembran. Dazu wurde die Membran zweimal für 10 Minuten mit TBS gewaschen, und eine Stunde in Caseinpuffer zur Absättigung freier Bindestellen inkubiert. Das ungebundene Casein wurde durch mehrmaliges Waschen in TBT und TBS von der Membran entfernt. Die Inkubation der Membran mit in Caseinpuffer verdünntem Primärantikörper erfolgte in der Regel über Nacht bei 6°C. Unspezifischer und nichtgebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit TBT sowie einem Waschschrift mit TBS für jeweils 10 Minuten entfernt. Der jeweilige Sekundärantikörper wurde 1:10.000 in Caseinpuffer verdünnt, und mit der Membran 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger und unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch wiederholtes Waschen mit TBT und TBS von der Blotmembran entfernt. Der selektive Nachweis der transferierten Proteine erfolgte über eine an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase. Dazu wurde ein geringes Volumen Immobilon Western Chemilumineszenz HRP Substrat (Millipore, Schwalbach) auf der Membran verteilt. An den Stellen, an denen der Antikörper durch die Bindung an das Protein lokalisiert ist, konnte durch die Peroxidase eine Reaktion katalysiert werden, die im Lumineszenzdetektor LAS 1000 aufgezeichnet wurde.

TBS

10 mM Tris HCl pH 8

150 mM NaCl

Caseinlösung

1 % Casein (w/v)

gelöst in 1x TBS

TBT

20 mM Tris HCl pH 8

500 mM NaCl

0,05 % Tween (v/v)

### II.3.5 2D-Gelelektrophorese

Bei der hier verwendeten 2D-Gelelektrophorese wurde eine native Gelelektrophorese mit einer denaturierenden SDS-Gelelektrophorese kombiniert. Dieses Vorgehen erlaubt eine hochaufgelöste Trennung multimerer Proteinkomplexe in ihrer nativen Form. Dazu wurde eine Proteinprobe zunächst in einem nativen Gradienten-Polyacrylamidgel aufgetrennt (1. Dimension) und eine Spur des Gels ausgeschnitten. Diese wurde für 15 Minuten bei RT in SDS-Laufpuffer inkubiert, dem 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt war. Für die denaturierende zweite Dimension wurde das Gelstück in das denaturierende Gel eingebaut. Dazu wurde die Spur horizontal zwischen zwei Glasplatten gelegt, und das Trenngel für die denaturierende SDS-PAGE wurde vorsichtig daneben gegossen, wobei zwischen Gelstück und Trenngel ca. 1 cm Freiraum gelassen werden sollte. Nach der Polymerisation des Trenngels konnte das Sammelgel um das ausgeschnittene Gelstück gegossen werden. Das Gel wurde nach dem Lauf vorsichtig aus der Kammer gelöst und nach II.3.4 gefärbt.

3-fach Gelpuffer

1,5 M Aminocapronsäure  
150 mM Bis-Tris  
pH 7,0 (HCl)

Kathodenpuffer

50 mM Tricin  
15 mM Bis-Tris  
0,02 % Coomassie Blue Serva G (w/v)

Anodenpuffer

50 mM Bis-Tris  
pH 7,0 (HCl)

10-fach Probenpuffer

80 % Glyzerin (w/v)  
1 % Dodecylmaltosid (w/v)

	Trenngel (14,5%)	Trenngel (7,5 %)	Sammelgel (4 %)
Acrylamidlösung 30 % AA, 0,8 % BAA (w/v)	2,5 ml	1,25 ml	0.8 ml
Gelpuffer (3 fach)	1,66 ml	1,66 ml	2 ml
Glyzerin (80 %, w/v)	1 ml	1 ml	-
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l
10 % APS	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Wasser	1 ml	-	ad 6 ml

## II.3.6 Zirkular Dichroismus- (CD-) Spektroskopie

### II.3.6.1 Messprinzip und Analyse der Messdaten

Zirkular polarisiertes Licht entsteht durch die Überlagerung zweier um 90° gegeneinander phasenverschobener linear polarisierter elektromagnetischer Wellen. Moleküle mit chiralen oder asymmetrischen Zentren besitzen unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht. Werden solche chiralen Moleküle von zirkular polarisiertem Licht durchdrungen, werden die links- und rechts-zirkular polarisierten Wellen unterschiedlich stark absorbiert. Daraus resultiert eine unterschiedlich starke Veränderung in der Länge der beiden elektrischen Vektoren  $E_L$  und  $E_R$ , und es entsteht elliptisch polarisiertes Licht. Der CD-Effekt eines Moleküls kann somit als Unterschied zwischen den beiden Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_L$  und  $\varepsilon_R$  oder in Form eines Winkels als Maß für die Elliptizität  $\Theta$  angegeben werden [97,98].

Es gilt:

$$\Theta = \ln 10 \cdot \frac{180}{2\pi} \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. II.1})$$

mit  $c$  = Konzentration  
 $d$  = Schichtdicke  
 $\varepsilon_L$  und  $\varepsilon_R$  = Extinktionskoeffizienten für links und rechts polarisiertes Licht

Proteine sind vor allem aufgrund ihrer verschiedenen Sekundärstrukturelemente solch optisch aktive Moleküle. Jedes Sekundärstrukturelement besitzt dabei andere asymmetrische Eigenschaften, und so bringt jedes einen eigenen Anteil in das CD-Spektrum ein. Im Fern-UV-Bereich (185-250 nm) liefern hauptsächlich die Elektronenübergänge der Amidgruppen des Proteinerückgrats Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins. Da sich die CD-Effekte der einzelnen Sekundärstrukturelemente eines Proteins addieren, lassen sich anhand des CD-Spektrums eines Proteins die Anteile an  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt, Schleifen und Zufallsknäuel im Protein abschätzen [99,100]. Dies erfolgt mit Computerprogrammen, die verschiedene Algorithmen verwenden, um das gemessene Spektrum mit denen von Proteinen bereits bekannter Struktur zu vergleichen [99,100]. Die weiteste Entwicklung liefern Programme auf der Grundlage von neuronalen Netzwerken.

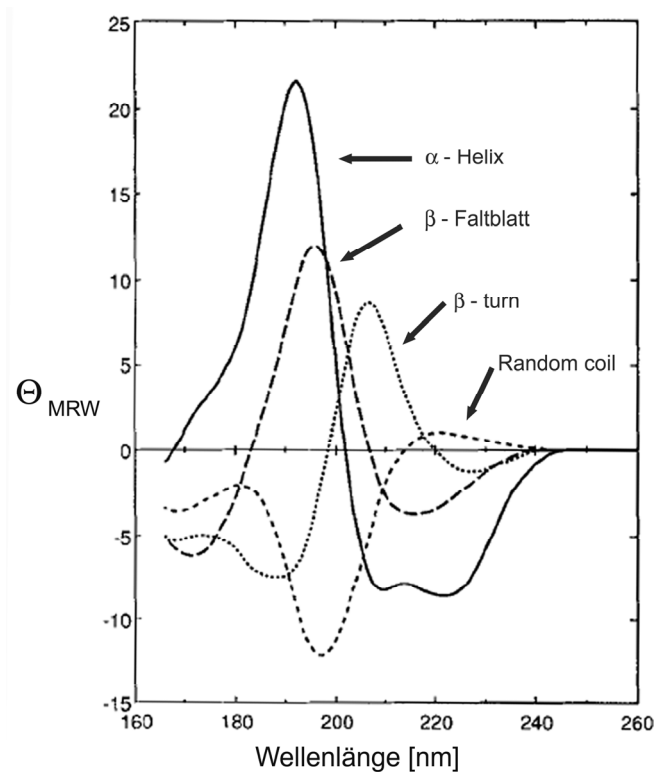
Des Weiteren eignet sich die CD-Spektroskopie, um durch Liganden verursachte Konformationsänderungen in Proteinen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde die

Technik verwendet, um Veränderungen in der Sekundärstrukturzusammensetzung von EIN2<sup>479-1294</sup> sowie mögliche Konformationsänderungen nach Titration eines Liganden zu analysieren. Hierfür wurde nur die Veränderung im  $\alpha$ -helicalen Anteil des Proteins betrachtet.

### ***Messdurchführung***

Die Aufnahme der CD-Spektren wurde an einem Spektralpharimeter JASCO J715 (Jasco Labor- und Datentechnik, Groß-Umstadt) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Probenkammer des Polarimeters wurde kontinuierlich mit Stickstoff gespült, um Absorptionseffekte durch Sauerstoff sowie oxidative Beschädigung der Spiegelsysteme im Gerät zu vermeiden. Für Messungen zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile lag das Protein in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,6 / 50 mM NaCl vor, bei den Titrationsversuchen mit Ligand musste das Protein in 50 mM Tris HCl pH 7,6 / 10 mM NaCl umgepuffert werden. Es wurde in einer Mikroküvette mit Schichtdicke 1 mm bei einer typischen Proteinkonzentration von 0,08 mg/ml gemessen. Bei einer Messgeschwindigkeit von 50 nm/min wurden zwischen 260 und 195 nm zwei Datenpunkte je Nanometer Wellenlänge mit einer Bandbreite von 1 nm aufgezeichnet. Für die Untersuchungen mit Liganden wurden verkürzte Spektren zwischen 230 und 205 nm aufgenommen. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden je 10 Spektren akkumuliert, gemittelt und gegen das Pufferspektrum korrigiert. Die Umrechnung der gemessenen Elliptizität in Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht von Aminosäuren (mean residue weight ellipticity,  $\Theta_{MWR}$ ) erfolgte unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinkonzentration in der Probe.

$$\Theta_{MWR} = \Theta \cdot 100 \cdot \frac{MWR}{c \cdot d} \quad (\text{Gl. II.2})$$



**Abb. II-1: Typische CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturelemente von Proteinen**  
Verändert nach [98].

### ***Auswertung der CD Daten***

Die Analyse der quantitativen Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente erfolgte mit den Programmen Selcon3 und ContinLL [100,101]. Eine erste Einschätzung der Sekundärstrukturgehalte wird bei diesen Programmen als Grundlage für weitere Rechenschritte verwendet, bis zur Konvergenz der Lösung.

## **II.3.7 Fluoreszenzspektroskopie**

### ***II.3.7.1 Messprinzip***

Das Messprinzip der Fluoreszenzspektroskopie beruht darauf, dass bestimmte Stoffe nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bei der Relaxation in ihren Grundzustand Energie in Form von Licht emittieren können. Dabei ist die Emission des absorbierten Lichtes im Vergleich zur Anregungswellenlänge bathochrom verschoben. Stoffe mit dieser Fähigkeit nennt man Fluorophore.

Die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen wird durch ihre aromatischen Aminosäuren vermittelt. Da Tryptophan eine viel höhere Quantenausbeute als

Tyrosin und Phenylalanin liefert, wird das Fluoreszenzspektrum von Proteinen durch die Anzahl ihrer Tryptophane dominiert. Durch die Wahl einer Anregungswellenlänge  $> 295$  nm ist es zudem möglich, selektiv nur die Tryptophanfluoreszenz zu beobachten.

Das Fluoreszenzspektrum eines Proteins ist dabei stark abhängig von der unmittelbaren Umgebung des Fluorophors im Molekül. Für Tryptophane in stark lösungsmittlexponierten Bereichen eines Proteins wurde im Vergleich zu freiem Tryptophan eine Rotverschiebung der Emissionsmaximums bis auf 353 nm beschrieben. Für lösungsmittelabgeschirmte Reste verschiebt sich das Maximum dagegen in den blauen Spektralbereich des Lichts. Die Lage des Fluoreszenzmaximums und die Fluoreszenzintensität eines Spektrums können daher dazu verwendet werden, Konformationsänderungen und Ligandenbindung in der unmittelbaren Umgebung eines Tryptophanrests im Protein zu untersuchen.

### ***Fluoreszenzlöschung***

Die Fluoreszenzintensität einer Probe kann durch die Anwesenheit eines Quencher-moleküls vermindert werden. Bei Annäherung von Fluorophor und Fluoreszenzlöcher (Quencher) findet ein Energietransfer vom Fluorophor auf den Quencher statt, so dass dieser Prozess zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität führt. Dabei kann die Fluoreszenzintensität durch die strahlungslose Deaktivierung des angeregten Zustands gelöscht werden. Dieser als dynamisches Quenching bezeichnete Vorgang wird durch unspezifische Stöße zwischen dem Quencher und dem Fluorophor hervorgerufen.

Der Zusammenhang zwischen Abnahme der Fluoreszenzintensität (F) und Quencherkonzentration ([Q]) lässt sich durch die Stern-Volmer-Beziehung beschreiben:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + R \cdot [Q] = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad (\text{Gl. II.3})$$

Mit  $F_0$  und  $F$  = Fluoreszenzintensität in Ab- und Anwesenheit des Quenchers  
 $\tau_0$  und  $\tau$  = Fluoreszenzlebensdauer in Ab- und Anwesenheit eines Quenchers  
 $R$  = Stern-Volmer Quenching Konstante („Ratenkonstante“)  
 $k_q$  = bimolekulare Quenchkonstante  
[Q] = Konzentration des Quenchers

Über die Stern-Volmer-Beziehung kann durch die Löschung der Fluoreszenzintensität bei der Verwendung von Quenchern mit verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften auf die Lokalisation der Fluorophorsonde im Molekül

rückgeschlossen werden. In Proteinen können Tryptophanreste bei selektiver Anregung als solche Sonden dienen. Dazu werden Fluoreszenzlöschungsstudien im so genannten Stern-Volmer-Diagramm dargestellt. Die relative Steigung der Auftragung  $F_0/F$  gegen  $[Q]$  ergibt dabei die Zugänglichkeit des Fluorophors im Molekül.

Bei der zweiten Art der Fluoreszenzlöschung (statisches Quenching) bindet der Quencher an das Fluorophor im Grundzustand, und verhindert somit die Anhebung der Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Somit ist der Vorgang des statischen Quenchens unabhängig von der Fluoreszenzlebensdauer und es gilt die Stern-Volmer-Beziehung:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + R_S \cdot [Q] \quad (\text{Gl. II.4})$$

Mit  $F_0$  und  $F$  = Fluoreszenzintensität in Ab- und Anwesenheit des Quenchers  
 $R_S$  = Komplexbildungsrate  
 $[Q]$  = Konzentration des Quenchers

### ***Experimentelle Durchführung von Fluoreszenzmessungen***

Soweit nicht anders angegeben, erfolgten die Messung der Fluoreszenzspektren mit einem LS55 Fluorimeter (Perkin Elmer) bei Raumtemperatur. Es wurden Quarz-SUPRASIL-Halbmikroküvetten (PerkinElmer; Schichtdicke 1 cm, 500  $\mu$ l Volumen) verwendet. Für einen typischen Messansatz wurde eine Proteinmenge von 0,5  $\mu$ M EIN2<sup>479-1294</sup> in 50 mM TrisHCl/ 50m M NaCl eingesetzt und die Fluoreszenzspektren nach Titration kleiner Aliquots an potentiellen Quenchern oder Liganden aufgezeichnet.

Geräteeinstellungen	
Anregungswellenlänge	295 nm
Emissionsspektrum	305-350 nm
Spaltbreite Excitation	5 nm
Spaltbreite Emission	3,5 nm
Scangeschwindigkeit	100 nm/min
Anzahl gemittelter Spektren	10

***Charakterisierung unterschiedlicher Proteinbereiche durch die Zugänglichkeit von intrinsischen Tryptophansonden***

Die Stern-Volmer-Beziehung ist nur gültig für Fluorophore mit gleicher Lösungsmittlexposition. Für Proteine mit mehreren Tryptophansonden ist diese Anforderung nicht gegeben, so dass aus dem Stern-Volmer-Plot nicht auf die Zugänglichkeit der einzelnen Tryptophane geschlossen werden kann. Mit Hilfe einer modifizierten Gleichung, die Populationen von Tryptophanresten annimmt, die sich in ihrer Lösungsmittelzugänglichkeit unterscheiden, können jedoch auch multi-tryptophanhaltige Proteine auf die fraktionale Zugänglichkeit ihrer Tryptophane untersucht werden.

Die so modifizierte Stern-Volmer-Gleichung ergibt sich zu:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{f_1}{(1 + K_1[Q])e^{V_1[Q]}} + \frac{f_2}{(1 + K_2[Q])e^{V_2[Q]}} = \sum_{n=0}^i \frac{f_n}{(1 + K_n[Q])e^{V_n[Q]}} \quad (\text{Gl. II.5})$$

- |     |                                   |   |
|-----|-----------------------------------|---|
| Mit | F <sub>0</sub> und F              | = Fluoreszenzintensität in Ab- und Anwesenheit des Quenchers  |
|     | K <sub>1</sub> und K <sub>2</sub> | = dynamische Quenchingkonstanten aus Löschprozessen durch Stöße                                     |
|     | V <sub>1</sub> und V <sub>2</sub> | = statische Quenchingkonstanten (Bildung eines stabilen Komplexes zwischen Fluorophor und Quencher) |
|     | f <sub>1</sub> und f <sub>2</sub> | = anteilige Fluoreszenz an den zwei verschiedenen Tryptophanpopulationen                            |

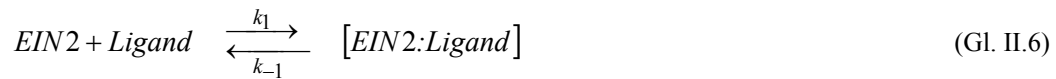
Die neun Tryptophanreste des Extramembranbereichs von EIN2 wurden durch Fluoreszenzlöschungsexperimente mit dem apolaren Quencher Acrylamid und dem ionischen Quencher Iodid auf ihre Lösungsmittlexposition untersucht. Je nach Messreihe wurden kleine Aliquots der Quencherlösungen (Acrylamid: 0-0,5 M/ Natriumiodid: 0-0,7 M) direkt und unter Rühren zu der Proteinprobe in die Küvette titriert. Die Zugänglichkeit der Tryptophanreste im Protein wurde durch die nicht-lineare Regression der Stern-Volmer Auftragung nach Gleichung II.5 bestimmt.

***Untersuchung zur Ligandenbindung an EIN2<sup>479-1294</sup>***

Die Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht auch die Ermittlung von Bindungskonstanten eines Proteins und seines Liganden. Zur Berechnung des K<sub>D</sub>-Werts als Maß für die Affinität wird in diesen Messungen die Änderung der Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum betrachtet.



Bindung eines Liganden an EIN2



$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (Gl. II.7)$$

Die Dissoziationskonstante  $K_D$  des EIN2-Ligandenkomplexes ist im Gleichgewicht gegeben durch:

$$K_D = \frac{[EIN2]_0 [Ligand]_0}{[EIN2:Ligand]} \quad (Gl. II.8)$$

Da durch die Bindung die Gesamtkonzentration an Protein und Ligand unverändert bleibt, können diese auch beschrieben werden als:

$$[EIN2]_{tot} = [EIN2] + [EIN2:Ligand] \quad (Gl. II.9)$$

Und

$$[Ligand]_{tot} = [Ligand] + [EIN2:Ligand] \quad (Gl. II.10)$$

Durch Einsetzen in Gleichung II.8 erhält man somit

$$K_D = \frac{([EIN2]_0 - [EIN2:Ligand]) \cdot ([Ligand]_0 - [EIN2:Ligand])}{[EIN2:Ligand]} \quad (Gl. II.11)$$

Durch Auflösen nach  $[EIN2:Ligand]$  wird die Gleichung in folgende Form gebracht:

$$[EIN2:Ligand] = \frac{[EIN2]_{tot} + [Ligand]_{tot} + K_D}{2} \quad (Gl. II.12)$$

$$\pm \sqrt{\left( \frac{[EIN2]_{tot} + [Ligand]_{tot} + K_D}{2} \right)^2 - [EIN2]_{tot} \cdot [Ligand]_{tot}}$$

Die Gesamtfluoreszenz berücksichtigt sowohl freies als auch gebundenes EIN2-Protein, so dass man für die Gesamtfluoreszenz  $F_T$  auch schreiben kann:

$$F_{tot} = \left( 1 - \frac{[EIN2:Ligand]}{[EIN2]_{tot}} \right) F_{tot} + \left( \frac{[EIN2:Ligand]}{[EIN2]_{tot}} \right) F \quad (Gl. II.13)$$

Setzt man nun in die obige Gleichung ein und löst gleichzeitig nach  $\frac{F_0 - F}{F_0}$  auf, so

erhält man mit 
$$\frac{F_0 - F}{F_0} = F_{tot} \frac{[Ligand]_0}{K_D + [Ligand]_0} \quad (Gl. II.14)$$

eine Gleichung, die große Ähnlichkeit mit der in der Enzymkinetik verwendeten Michaelis-Menten-Gleichung hat.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Bindung von zweiwertigen Metallionen an EIN2<sup>479-1294</sup> wurden Bindungsstudien mit Kalzium, Magnesium und Mangan durchgeführt. Dazu wurden Emissionsspektren des Proteins bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm aufgenommen und die Spektren im Bereich zwischen 305 und 450 nm aufgezeichnet. Die Änderung in der Fluoreszenzintensität nach schrittweiser Titration der Metallionen (0-10 mM) wurde in einem abgewandelten Stern-Volmer-Diagramm durch das Verhältnis  $(F_0-F)/F_0$  gegen die Ionenkonzentration aufgetragen. Zur Bestimmung des  $K_D$ -Werts wurde eine Kurvenanpassung an eine Gleichung angewendet, die die Bindung des Liganden an zwei unabhängige Bindungsstellen beschreibt.

#### ***Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen EIN2<sup>479-1294</sup> und ETR1***

Für diese Messreihen wurde mit der tryptophanfreien Substitutionsmutante ETR1\_W<sub>total</sub> gearbeitet, deren sieben Tryptophane durch Leucine oder Phenylalanine ausgetauscht waren. Bei selektiver Anregung bei 295 nm sollte die Fluoreszenz ausschließlich auf die in EIN2<sup>479-1294</sup> vorkommenden Tryptophane zurückzuführen sein. Findet eine mögliche Komplexbildung zwischen EIN2 und ETR1 in der Nähe eines Tryptophanrests statt, sollte dies durch Fluoreszenzlöschung beobachtbar sein. Typischerweise wurde in diesen Versuchen eine Proteinmenge von 0,4-0,5  $\mu$ M EIN2 in 50 mM Tris HCl pH 7,5/ 50 mM NaCl eingesetzt. Zusätzlich enthielt der Messpuffer 10 mM CaCl<sub>2</sub>. ETR1\_W<sub>total</sub>-Protein wurde bis zum Erreichen eines sechsfach molaren Überschusses zutitriert. Da das ETR1-Protein auch ohne Tryptophane eine gewisse Eigenfluoreszenz nach Anregung bei 295 nm zeigte, mussten Pufferspektren bei Zugabe von ETR1\_W<sub>total</sub> zur Korrektur aufgezeichnet werden

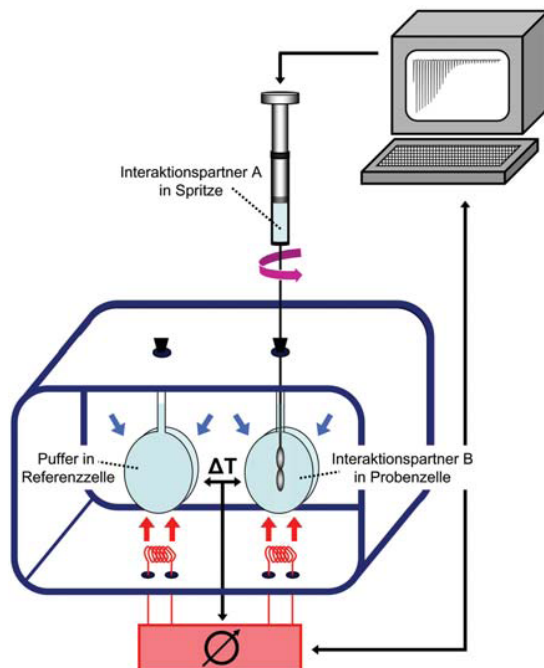
### **II.3.8 Isotherme Titrationskalorimetrie**

Jede chemische Reaktion ist mit einer Enthalpieänderung  $\Delta H^0$  verbunden, bei der Wärme an die Umgebung abgegeben (exotherme Reaktion) oder von ihr aufgenommen wird (endotherme Reaktion). Diese Eigenschaft ist unabhängig von der Größe der reagierenden Moleküle, so dass die Bildung von Komplexen zwischen Proteinen, DNA, Lipiden oder niedermolekularen Biomolekülen untersucht werden kann. Des Weiteren ist die Enthalpieänderung unabhängig von der Reaktionsart, so

dass diese sowohl beim Entstehen kovalenter und nicht-kovalenter Bindungen, als auch bei Ionisierungsprozessen und Hydratisierungsreaktionen hervorgerufen wird. Die Enthalpieänderung kann mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) direkt erfasst werden. Des Weiteren lassen sich aus ITC-Experimenten Bindungskonstanten berechnen, die Anzahl an Bindungsplätzen für einen Liganden an einem Molekül bestimmen und abgeleitete Größen wie Änderung der Entropie  $\Delta S$  und der freien Energie  $\Delta G$  berechnen [102].

**Geräteaufbau und Messprinzip**

Ein ITC-Gerät besteht im Wesentlichen aus je einer Mess- und Referenzzelle mit exakt gleichem Volumen. In die Messzelle wird das zu untersuchende Protein vorgelegt. In der abgeschlossenen Referenzzelle befindet sich entgastetes Wasser. Die Probenzelle ist an eine computergesteuerte Dosiereinrichtung angeschlossen, die der Proteinlösung kleine Volumina des Liganden zusetzt. Beide Zellen sind thermostatisiert und isoliert, und gegen die Umgebungstemperatur durch einen adiabatischen Mantel abgeschirmt.



**Abb. II-2: Schematischer Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters** entnommen aus [103]

Während der Messung werden beide Zellen jeweils mit einem kontrollier- und messbaren Heizstrom versorgt, der ihre Temperatur konstant (isotherm) exakt gleich hält. Wird durch die Injektion des Liganden eine Reaktion mit der in der Messzelle

befindlichen Proteinlösung ausgelöst, so kommt es dort zu einer Auslenkung aus dem thermischen Gleichgewicht. Um die isothermen Bedingungen aufrecht zu erhalten, wird der Probenzelle durch den angelegten Heizstrom eine entsprechend höhere oder geringere Wärmemenge zugeführt. Dieser zur Temperaturdifferenz proportionale Heizstrom dient im ITC-Experiment als Messsignal. Diese Regelleistung wird zeitabhängig gemessen und stellt die Wärmeänderung der Reaktion dar.

***Theoretische Grundlagen***

Die reversible Bindung eines Liganden L an ein Protein P unter Bildung eines Protein-Liganden-Komplexes [PL] lässt sich durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]} \tag{Gl. II.15}$$

Dabei sind die Gesamtkonzentration an Protein  $[P]_{tot}$  und des Liganden  $[L]_{tot}$  wie folgt definiert:

$$[P]_{tot} = [L] + [P : L] \tag{Gl. II.16}$$

$$[L]_{tot} = [L] + [P : L] \tag{Gl. II.17}$$

Durch Auflösen der obigen Gleichungen nach [L] und [M] können die Konzentrationen an ungebundenem Ligand und Protein bestimmt und in das Massenwirkungsgesetz (Gl. II.15) eingesetzt werden.

$$K_a = \frac{[PL]}{([P]_{tot} - [PL])([L]_{tot} - [PL])} = \frac{[PL]}{([P]_{tot}[L]_{tot}) - ([PL][L]_{tot}) - ([PL][P]_{tot}) + [PL]} \tag{Gl. II.18}$$

Löst man die Gleichung nach der Konzentration des entstandenen Komplexes [PL] auf, so ergibt sich eine Funktion mit der Variablen  $K_a$ . Aus dieser Gleichung wird ersichtlich, dass die Konzentration des Protein-Liganden-Komplex abhängig ist von der Gesamtproteinkonzentration, der Gesamtligandenkonzentration und der Bindungskonstanten.

$$\left( ([P]_{tot}[L]_{tot}) - ([PL][L]_{tot}) - ([PL][P]_{tot}) + [PL]^2 \right) - \frac{[PL]}{K_a} = 0 \quad (Gl.II.19)$$

$$[PL]^2 - \left( [L]_{tot} + [P]_{tot} + \frac{1}{K_a} \right) [PL] + [P]_{tot} + [L]_{tot} = 0 \quad (Gl.II.20)$$

Nach Lösen der quadratischen Gleichung kann die Konzentration an [PL] nun rechnerisch ermittelt werden.

$$[PL] = \frac{[P]_{tot} + [L]_{tot} + \frac{1}{K_a}}{2} \pm \sqrt{\left( \frac{[P]_{tot} + [L]_{tot} + \frac{1}{K_a}}{2} \right)^2 - [P]_{tot}[L]_{tot}} \quad (Gl.II.21)$$

$$= \frac{[P]_{tot} + [L]_{tot} + \frac{1}{K_a}}{2} \pm \sqrt{\frac{[P]_{tot} + [L]_{tot} + \frac{1}{K_a}}{4} - [P]_{tot}[L]_{tot}}$$

Während eines ITC-Experiments wird die Wärmemenge gemessen wird, die bei der Erhöhung der Gesamtligandenkonzentration  $[L]_{tot}$  in der Zelle frei oder aufgenommen wird. Mathematisch handelt es sich dabei um die Ableitung der Gesamtligandenkonzentration. Daher kann Gl II.21. umgewandelt werden zu:

$$\frac{d[PL]}{d[L]_{tot}} = \frac{1}{2} + \frac{[P]_{tot} - \frac{[L]_{tot} + [P]_{tot} + \frac{1}{K_a}}{2}}{\sqrt{\left( \frac{[L]_{tot} + [P]_{tot} + \frac{1}{K_a}}{4} \right) - [P]_{tot}[L]_{tot}}} \quad (Gl. II.22)$$

Die entstehende Temperaturdifferenz zwischen den zwei Zellen während des Experiments kann anschließend zu der Konzentration an Protein-Ligand-Komplexen in Beziehung gesetzt werden:

$$dq = \Delta H_{bind}^0 \cdot d[PL] \cdot V_{cell} \quad (Gl.II.23)$$

mit  $\Delta H_{bind}^0$  = Molare Bindungsenthalpie des[PL] Komplex  
 $dq$  = integrale Wärmemenge  
 $V_{cell}$  = Volumen der Messzelle

### **Datenanalyse**

In einem ITC-Experiment wird der Wärmefreisetzung bei der Bildung von Protein-Ligand-Komplexen in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration an eingesetztem Ligand ( $dq/d[L]_{tot}$ ) ermittelt. Dieser Wert ist nur abhängig von dem Verhältnis der

Gesamtproteinkonzentration  $[P]_{\text{tot}}$  zur Bindungskonstante  $K_a$  und zur Gesamtkonzentration des Liganden  $[L]_{\text{tot}}$ , jedoch nicht von der absoluten Proteinkonzentration  $[P]_{\text{tot}}$  in der Messzelle.

Der gemessene Heizstrom wird als Wärmetönung in  $\mu\text{cal s}^{-1}$  integriert und gegen das Verhältnis Liganden- zu Proteinkonzentration aufgetragen. Mittels Kurvenanpassung an eine Funktion nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate können Bindungskonstanten, Bindungsenthalpien und Anzahl der freien Bindungsplätze bestimmt werden. Indirekt können die Änderung der freien Energie und Entropie durch den Zusammenhang  $\Delta G^0 = -RT \ln K_a$  und durch die Gibbs-Helmholtz Gleichung  $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S$  ermittelt werden.

### ***Experimentelle Durchführung***

Gereinigte Proteinproben von EIN2<sup>479-1294</sup> wurden für ITC Experimente über eine PD10-Entsalzungssäule in den ITC-Messpuffer (50 mM Tris HCl pH 7,5/ 50 mM NaCl) überführt. Die zu titrierende CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurden im selben Puffer angesetzt, da bereits kleine Veränderungen im pH-Wert, sowie in der Zusammensetzung und Konzentration der gelösten Stoffe Wärmetönungen entstehen lassen, die um ein vielfaches größer sind als diejenigen, die durch die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein entstehen.

Protein- und Ligandenlösung wurden unmittelbar vor dem Experiment durch Rühren unter Vakuum vollständig entgast, um Störungen des Experiments durch Luftblasen zu vermeiden. In die Messzelle wurden 0,015 mM EIN2<sup>479-1294</sup> vorgelegt. Die Spritze zur Injektion des Liganden wurde mit Ligandenlösung befüllt und luftblasenfrei in die Messzelle eingeführt.

25 Injektionen mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurden in Titrationschritten von 1 und 16  $\mu\text{l}$  aus einer 7,5 mM Stammlösung zur Proteinlösung in der Messzelle titriert (10 x 1  $\mu\text{l}$ / 15 x 16  $\mu\text{l}$ ). Der Abstand zwischen den Injektionen betrug 240 Sekunden und war ausreichend lang, um das System zurück ins Gleichgewicht zu bringen. Die Messungen erfolgten bei 20°C. Die Korrektur der Verdünnungswärme erfolgte durch Injektion des Liganden in Puffer ohne Protein.

## **II.3.9 Heterologe Proteinexpression in *E. coli***

### **II.3.9.1 Heterologe Expression von EIN2<sup>479-1294</sup> in *E. coli* und Reinigung durch Metallchelatchromatographie**

#### ***Expressionsstudien von EIN2<sup>479-1294</sup>***

Die Proteindomäne EIN2<sup>479-1294</sup> aus *A. thaliana* wurde mit Hilfe des Expressionsplasmids pET21a\_MCS pET28a\_EIN2<sup>479-1294</sup> in Probeexpressionen mit den *E. coli* Expressionsstämmen BL21(DE3), ER2566,C41(DE3), C43(DE3) und *Rosetta-gami* eingesetzt. Transformationskompetente *E. coli* Zellen (vgl. II.1.5.1) wurden mit je 0,5µg pET21a\_MCS pET28a\_EIN2<sup>479-1294</sup> und pRARE kotransformiert. Mit einer Einzelkolonie wurden je 5 ml 2YT-Amp/CM-Vorkultur angeimpft, über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert und zum Animpfen einer 50 ml Hauptkultur (Erlenmeyerkolben mit Schikane, 2YT- Amp/CM) verwendet. Die Anzuchttemperatur der Kulturen in verschiedenen Experimenten betragen 16°C, 20°C, 25°C, oder 30°C. IPTG zur Induktion der Expression wurde bei optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 1 zugegeben. Zum Austesten der Expressionsbedingungen wurde ein Konzentrationsbereich zwischen 0 und 1 mM IPTG (in der Endkonzentration) abgedeckt.

#### ***Expression von EIN2<sup>479-1294</sup> in ER2566-Zellen***

Transformationskompetente ER2566-Zellen (vgl. II.1.5.1) wurden mit 0,5µg pET21a\_MCS pET28a\_EIN2<sup>479-1294</sup> und pRARE kotransformiert. Eine Einzelkolonie der Transformationsplatte wurde in eine 500 ml Vorkultur mit 2YT-Amp/CM überimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. 40 ml dieser Vorkultur wurde zum Animpfen von 500 ml Hauptkultur (Erlenmeyerkolben mit Schikane, 2YT- Amp/CM) verwendet. Die Kulturen wurden bei 30°C unter Schütteln inkubiert und bei einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,8 mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,25 mM induziert. Sechs Stunden nach der Induktion wurden die Zellen bei 7000 x g (10 min) geerntet. Das Zellmaterial wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert

#### ***Reinigung von EIN2<sup>479-1294</sup> über immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie***

Zur Präparation des EIN2<sup>479-1294</sup> Proteins wurden 6 - 7 g eingefrorene Zellpellets in 30 ml eiskaltem Aufschlusspuffer rückgelöst und mittels Hochdruckdispersion bei 1200 psi in einer auf 4°C gekühlten FrenchPress-Zelle aufgeschlossen. Die

Zelltrümmer sowie nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch zwei Zentrifugationsschritte (30 min, 30000 x g, anschließend 60 min 100.000 x g, jeweils 4°C) vom Zelllysat abgetrennt. Der Überstand nach Zentrifugation wurde in eine präparativen Metallchelatchromatographie eingesetzt. Über die spezifischen Interaktionen der zwei Hexahistidinanker des Proteins EIN2<sup>479-1294</sup> mit dem Säulenmaterial Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Bioscience, Freiburg) wurde das Protein gereinigt. Dazu wurde der Rohextrakt auf zwei mit 15 Säulenvolumen (SV) Aufschlusspuffer äquilibrierten Säulen (1 x 1 x 20 cm, Säulenvolumen 2 ml) geladen, das Säulenmaterial aufgewirbelt und für 60 Minuten auf dem einem Taumelschüttler inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 3 Waschsritten (je 15 SV) von der Säule entfernt, in denen der Aufschlusspuffer mit ansteigenden Konzentrationen an Imidazol versetzt war (0 mM, 75 mM und 100 mM Imidazol). Die Elution des Proteins erfolgte durch einen linearen Imidazolgradienten (100 - 250mM Imidazol im Aufschlusspuffer) über 15 SV. Mögliche Aggregate wurden durch Zentrifugation bei 100.000 x g (45 min, 4°C) entfernt. Um die Proteinkonzentration zu erhöhen, wurde die Proteinlösung in einem Ultrafiltrationskonzentrator (Amicon Ultra, MWCO 50 kDa; Millipore) auf etwa 2,5 ml eingengt. Mit diesem Proteinvolumen wurde ein Pufferwechsel durchgeführt. Durch Verwendung einer PD10-Entsalzungssäule lag das Protein nun frei von Imidazol in Messpuffer vor. Das Protein wurde nun weiter konzentriert, es wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt und das Protein wurde anschließend bei 4°C gelagert.

Aufschlusspuffer

50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,6

300 mM NaCl

5 % Glyzerin (w/v)

0,002 % PMSF (w/v)

Messpuffer

50 mM Tris/HCl pH 7,6

50 mM NaCl

**II.3.9.2 Studien zur heterologen Expression von EIN2<sup>1-1294</sup> in *E. coli***

Die Expression der Plasmide pET21a\_MCSpET28a\_EIN2<sup>1-1294</sup> und pTYB12\_EIN2<sup>1-1294</sup> wurde in verschiedenen *E.coli* Stämmen untersucht.

Es wurden transformationskompetente *E.coli* Zellen mit 0,5µg Plasmid und 0,5 µg pRARE-Plasmid kotransformiert (II.2.2.1) und anschließend mit einem Transformationsklon eine 5ml Vorkultur mit 2YT-Medium angeimpft. Diese



Übernachtskultur wurde unter Schütteln bei 30°C angezogen und am nächsten Morgen zum Animpfen einer Hauptkultur (50 ml 2YT Medium) im Verhältnis 1:20 in einem Erlenmeyerkolben eingesetzt. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 25°C angezogen. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte  $OD_{600} = 0,6$  durch Zugabe von IPTG. Ab diesem Zeitpunkt wurde der Verlauf der Expression analysiert. Dazu wurden stündlich Proben aus der Kultur entnommen mittels SDS-PAGE auf ihren Expressionslevel für EIN2<sup>1-1294</sup> untersucht. Um in der Analyse der Gesamtzellextrakt auf den SDS-Gelen vergleichbare Zellmengen aufzutragen, wurde die Zelldichte im Verlauf der Expression bestimmt.

Es erfolgte eine systematische Analyse der Expressionsbedingungen durch Variation der *E. coli* Expressionsstämme (BL21(DE3)/ ER2566/ C41(DE3)/ C43(DE3)/ Rosetta-gami), Variation der Anzuchtstemperatur (16°C/20°C/25°C/30°C), Stärke der Induktion (0/ 0,5/ 1 mM IPTG) und Koexpression des Plasmids pRARE.

### **II.3.10 Heterologe Expression von EIN2<sup>1-1294</sup> in *L. lactis***

Das Expressionsplasmid pNZ8048\_EIN2<sup>1-1294</sup>, welches für ein EIN2-Protein mit N- und C-terminalem Hexahistidinanker codiert, wurde zu Expressionsstudien im grampositiven Bakterium *L. lactis* verwendet.

Dazu wurden elektrokompente *L. lactis*-Zellen (II.2.2.2) mit 0,5 µg Plasmid transformiert, und auf GSM-Agarplatten (+ 5 µg/ml Chloramphenicol) ausgestrichen. Mit den Transformationsklonen wurden 10 ml Vorkulturröhrchen (M17 Medium + 0,5 % Glukose, + 5 µg/ml Chloramphenicol) angeimpft und ohne Schütteln über Nacht bei 30°C angezogen. Mit 2,5 ml der Übernachtskultur wurden 100ml Kulturen (M17 Medium +0,5 % Glukose + 5 µg/ ml Chloramphenicol) in Erlenmeyerkolben ohne Schikane angeimpft. Die Kulturen wuchsen bei 30°C ohne Schütteln bis zu einer  $OD_{660}$  von 0,5-0,8. Die Induktion erfolgte mit einer Endkonzentration von 10 – 100 ng/ ml Nisin. Nach 0/ 1/ 2 und 5 Stunden wurden 1 ml Proben entnommen, die optische Dichte bei 660 nm bestimmt und der Verlauf der Expression beobachtet. Die Kulturen wurden 5 Stunden nach Induktorzugabe abzentrifugiert (10 min, 7000 x g, 4°C), die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### **II.3.10.1 Aufarbeitung der Expressionsproben für SDS PAGE**

Während der Expression entnommene Proben wurden 5 min bei 10.000 x g sedimentiert, das Pellet mit 150 µl Wasser resuspendiert und mit 50 µl SDS

Probenpuffer versetzt. Abweichungen ergaben sich für die Expressionstudien des Inteinproteins und für die Proben aus *L. lactis*. Um die selbstspaltende Aktivität des Inteins nicht zu aktivieren, wurde SDS-PAGE-Probenpuffer ohne reduzierende Eigenschaften verwendet. Dazu wurde SDS-Probenpuffer ohne DTT angesetzt (vgl. II.3.2).

Für Expressionsproben aus *L. lactis* wurden die mit Wasser resuspendierten Zellen mit 10 µg/ml Lysozym für 10 Minuten bei 55°C behandelt, bevor der Probenpuffer zugegeben wurde.

#### ***Membranvesikelpräparation aus L. lactis***

Zur Analyse von schwach exprimierten Membranproteinen in *L. lactis* wurden Membranvesikel präpariert, in denen die Membranfraktion der Zellen stark konzentriert wurde. Zellen aus 50ml Kulturvolumen (~ 0,3 - 0,5g) wurden in 10 ml Aufschlußpuffer resuspendiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Zellwände der Bakterien zu verdauen. Der Zellaufschluß erfolgte durch zweifache Dispersion mit hohem Druck in einer gekühlten French Press Zelle bei 1200 psi. Die Probe wurde für 30 Minuten bei 30000 x g abzentrifugiert (4°C), und die noch im Überstand befindlichen Membranen für 1 Stunde bei 120.000 x g pelletiert. Diese wurden in 100µl des Aufschlußpuffers rückgelöst und zur Analyse in SDS-PAGE und Western Blot eingesetzt.

### **II.3.11 Heterologe Expression des Ethylenrezeptorproteins**

#### **ETR1W<sub>total</sub> in *E. coli* und Reinigung**

##### ***Expression***

*E. coli* C43(DE3)- Zellen wurden mit 400 ng pETR1\_W<sub>total</sub>-Vektor transformiert und auf Festmedium angezogen. Mit einer Einzelkolonie wurde eine 500 ml Vorkultur (2YT-Amp) in einem Erlenmeyerkolben ohne Schikane angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Hauptkultur (500 ml 2YT-Amp in schikanierten 1-Liter Erlenmeyerkolben) wurde mit 40 ml Vorkultur angeimpft. Durch Zugabe von IPTG in der Endkonzentration 0,5 mM wurde die Expression bei einer OD<sub>600</sub> von 1 gestartet. Nach 6 Stunden wurden die Zellen bei 4000 x g in 10 Minuten pelletiert und nach Schockfrost in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert.

***Denaturierende Reinigung mittels Metallchelatchromatographie***

7 g Zellen wurden in 20 ml eiskaltem Puffer H resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch zweimaliges Pressen der Bakteriensuspension durch das Ventil einer gut gekühlten French Press Zelle. Der lösliche Zellüberstand wurde durch Zentrifugation abgetrennt (40000 x g, 30 Minuten, 4°C) und das Pellet mit dem halben Volumen des Zellaufschluß gewaschen. So präparierte Membranen konnten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert werden.

Die Solubilisation der Proteine erfolgte in Puffer G mit 8 M Harnstoff bei 37°C. Die nach einer Stunde aus den Membranen gelösten Proteine wurden zur Abtrennung des unlöslichen Materials für 30 Minuten bei 30000 x g (20°C) zentrifugiert und der Überstand mit 20 mM Imidazol versetzt. Die Proteine wurden auf eine Polypropylen-säule mit 2 ml voräquilibrierter Ni-NTA-Agarose geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurde zunächst mit 10 SV Puffer G, dann mit 30 SV Puffer G + 50 mM Imidazol von der Säule entfernt. Die Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von 6 SV Puffer G + 250 mM Imidazol. Das Eluat wurde bei Raumtemperatur durch Ultrafiltration mit einem 50 kD Konzentrador auf 1-2 ml eingeeengt und mit Puffer G auf dem Konzentrador gewaschen. Um eventuelle Aggregate zu entfernen, wurde das Konzentrat für 30 Minuten bei 250.000 x g (4°C) zentrifugiert. Für die Renaturierung des Proteins musste die Proteinkonzentration durch den Bradford-Test bestimmt und auf 0,8 mg/ ml eingestellt werden. Das Protein wurde mit 10 mM DTT und 1,1 mM EDTA versetzt und in 0,5 ml Aliquots durch 1: 20 Verdünnung mit Puffer R durch schlagartige Verdünnung des Harnstoffs renaturiert. Die Renaturierung und alle nun folgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Das Protein wurde anschließend im Ultrafiltrator einmal mit Puffer R gewaschen und auf eine Konzentration von 1-2 mg/ ml eingestellt. Zur Entfernung von EDTA und DTT aus der Probe wurde das Protein über eine PD10-Entsalzungssäule einem Pufferwechsel unterzogen und mit KO-Puffer von der Säule eluiert.

**Puffer H:**

50 mM Tris/HCl pH 7,5  
15 % Glyzerin (w/v)  
200 mM NaCl  
0,002 % PMSF (w/v)  
2 mM DTT

**Puffer G:**

20 mM Tris HCl pH 8,0  
100 mM NaCl  
8 M Harnstoff

Puffer R:

55 mM Tris pH 8,0  
264 mM NaCl  
11 mM KCl  
100 mM DTT  
0,0055 % PEG 3350 (v/v)  
0,1 %  $\beta$ -Dodecylmaltosid (w/v)  
0,002 % PMSF (w/v)

Puffer KO:

50 mM Tris HCl pH 7,5  
100 mM KCl  
0,1 %  $\beta$ -Dodecylmaltosid (w/v)  
0,002 % PMSF (w/v)

### **III. ERGEBNISSE**

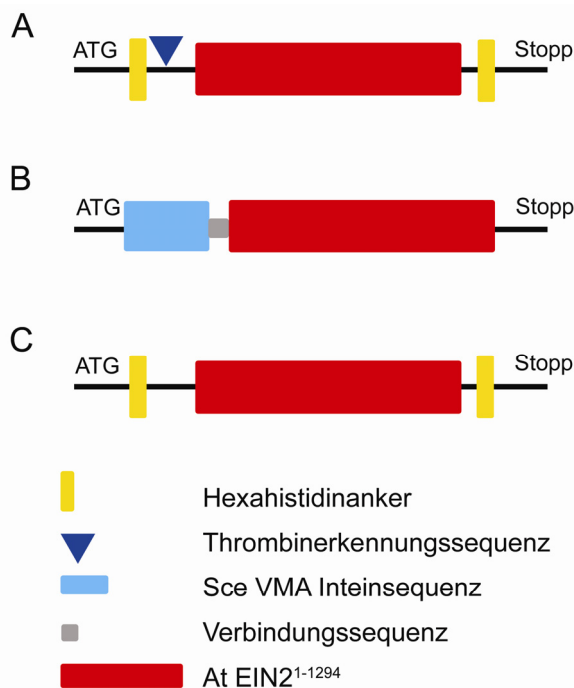
In dieser Arbeit sollte das an der Signaltransduktion von Ethylen beteiligte Protein EIN2 aus *Arabidopsis thaliana* funktionell und strukturell charakterisiert werden. Dazu sollte die Expression des Proteins in einem heterologen, bakteriellen Expressionssystem etabliert werden und ein Reinigungsprotokoll zur Isolierung des Proteins entwickelt werden. Mittels CD-Spektroskopie sollte in einer ersten strukturellen Charakterisierung der Faltungszustand des Proteins beurteilt und die Sekundärstrukturanteile abgeschätzt werden. Die weitere Charakterisierung des Proteins zielte auf die Identifizierung möglicher Liganden des EIN2-Proteins. Dazu sollten mikrokalorimetrische und spektroskopische Methoden eingesetzt werden. Zudem sollten Interaktionspartner von EIN2 identifiziert werden.

#### **III.1 Klonierungen und Proteinexpression**

##### **III.1.1 Expression des Vollängen-Proteins EIN2<sup>1-1294</sup>**

Für die Expression des EIN2-Proteins in zwei verschiedenen prokaryontischen Expressionssystemen wurden drei unterschiedliche Vektoren verwendet. Die zwei Vektoren für die Expression in *E. coli* basierten beide auf dem T7-RNA-Polymerase-System. Im Vektor pET21a\_MCSpET28a\_EIN2<sup>1-1294</sup> wurde das ein2-Gen von je einem 5' und 3' gelegenen Hexahistidinanker eingerahmt. Im Vektor pTYB12\_EIN2<sup>1-1294</sup> sollte durch die Kopplung des VMA-Inteingens aus *S. cerevisiae* mit dem ein2-Gen die Expression des EIN2-Protein mit aminoterminal fusionierten Inteinanker ermöglicht werden. Der Vektor pNZ8048\_EIN2<sup>1-1294</sup> wurde für die Expression des EIN2-Gens in *L. lactis* konstruiert und sollte das EIN2-Protein mit zwei Hexahistidinankern versehen.

Die Bedingungen, die zur Expression des ein2-Gens getestet wurden, sind unter II.3.10 und II.3.11 beschrieben und zielten darauf ab, durch die Verwendung verschiedener Expressionsstämme, durch Variation der Wachstumstemperatur und der Induktionsstärke oder durch die Koexpression des Plasmids pRARE Bedingungen für eine erfolgreiche Expression zu etablieren.



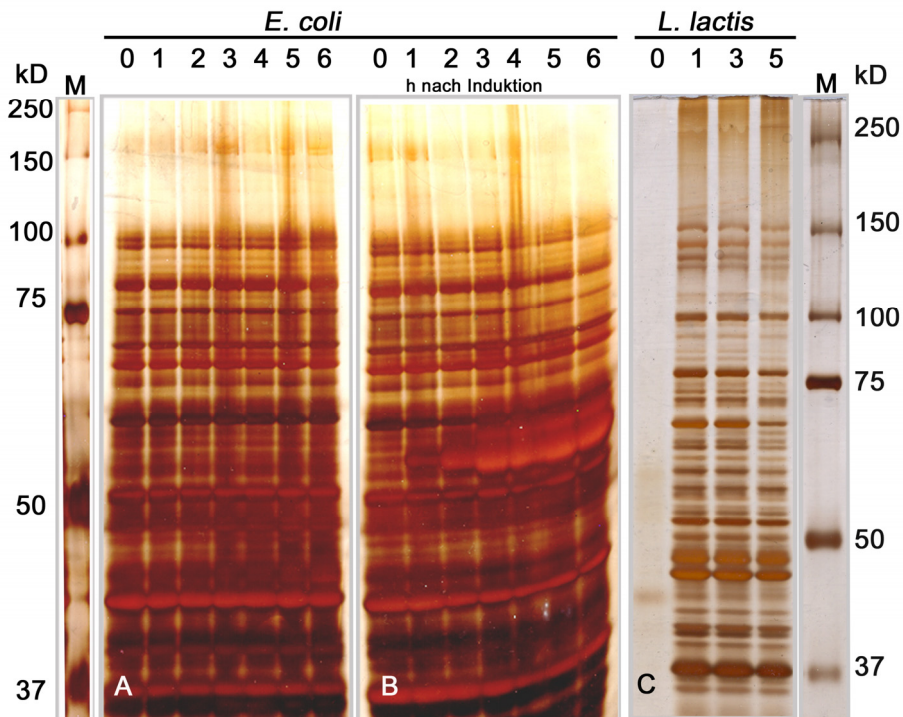
**Abb. III-1: Ausschnitt aus den Vektorkonstrukten zur Expression von EIN2<sup>1-1294</sup>**

Gezeigt sind ausschließlich die Bereiche der Vektoren, die das klonierte Gen, die Sequenzen für Affinitätsanker, Start und Stopp des offenen Leserahmens sowie die Proteaseerkennungssequenz umfasst.

- A) Vektorkonstrukt EIN2<sup>1-1294</sup> mit zwei Hexahistidinankern zur Expression in *E. coli*  
 B) Vektorkonstrukt EIN2<sup>1-1294</sup> für die Expression als Fusionsprotein mit Intein in *E. coli*  
 C) Vektorkonstrukt EIN2<sup>1-1294</sup> mit zwei Hexahistidinankern zur Expression in *L. lactis*

Abbildung III-2 zeigt die Analyse der aus Expressionskulturen gewonnenen Proben mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) exemplarisch für jedes Vektorkonstrukt. Für das mit Histidinanker versehene EIN2-Protein wurde ein Molekulargewicht von 144 kDa erwartet, für das Inteininfusionsprotein ein Molekulargewicht von 195 kDa. Weder in *E. coli* (Abb. III-2, A) noch in *L. lactis* (Abb. III-2, C) konnte unter den getesteten Bedingungen die Überexpression eines Proteins mit der Größe 144 kDa detektiert werden. Das Bandenmuster der uninduzierten Kulturen und der Kontrolleexpression, in denen die gleichen Plasmide ohne die Gensequenz von EIN2 eingesetzt wurden, waren in der SDS-PAGE identisch zu dem von induzierten Kulturen (Ergebnis hier nicht gezeigt). Auch die Western Blot Analyse mit einem gegen den Histidinanker gerichteten Antikörper konnte die Expression von EIN2<sup>1-1294</sup> nicht nachweisen (Ergebnis hier nicht gezeigt). Bei der Expression des EIN2-Intein-Fusionsprotein (Abb. III-2, C) wurde die Intensitätszunahme einer Bande auf Höhe von ~ 60 kDa beobachtet, die weder in der uninduzierten Kultur noch in der Kontrolleexpression mit leerem Plasmid zu erkennen war (Ergebnis hier nicht gezeigt). Das überexprimierte, 60 kDa große Protein wurde in einer Western Blot Analyse durch den inteinspezifischen Antikörper erkannt. Da der immense Unterschied zwischen der erwarteten Größe von 195 kDa und dem beobachteten Molekulargewicht von 60 kDa sehr groß ist, muss davon ausgegangen

werden, dass die Expression von EIN2<sup>1-1294</sup> auch als Inteinfusion nicht etabliert werden konnte.



**Abb. III-2: Auftrennung von Zellextrakten aus Bakterienkulturen zur Expression von EIN2<sup>1-1294</sup>**

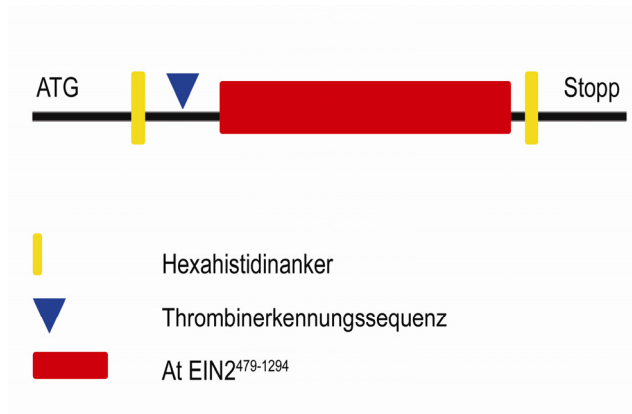
Zur Analyse der Expressionsstudien wurden in regelmäßigen Abständen nach Induktion Proben aus den Kulturen entnommen und mittels SDS-PAGE auf Überexpression von EIN2<sup>1-1294</sup> überprüft.

- A) *E. coli* C41 (DE3) + pET21a\_MCSpET28a\_EIN2<sup>1-1294</sup>, 30°C, 0,5 mM IPTG, Gesamtzell-extrakte
- B) *E. coli* BL21 (DE3) + pTYB12\_EIN2<sup>1-1294</sup>, 30°C, 0,5 mM IPTG, Gesamtzellextrakte
- C) *L. lactis* NZ9000 + pNZ8048\_EIN2<sup>1-1294</sup>, 30°C, induziert mit 10 ng/Nisin / ml Kultur, Membranvesikelpräparation

M= Proteingrößenstandard Dual Color Precision Protein Standard (BioRAD, München)

### III.1.2 Expression von EIN2<sup>479-1294</sup> in *E. coli*

Da die Expression des Gesamtproteins EIN2 in zwei verschiedenen Expressionssystemen und mit unterschiedlichen Affinitätsankern nicht etabliert werden konnte, wurde die Möglichkeit untersucht, die membran-extrinsische Proteindomäne EIN2<sup>479-1294</sup> in *E. coli* zu exprimieren, zu reinigen und zu charakterisieren. Um das Reinigungsprotokoll zu vereinfachen, wurde das Protein durch die unter II.2.11 beschriebene Klonierung mit je einem Hexahistidinanker an jedem Terminus zur Affinitätsreinigung ausgestattet.



**Abb. III-3: Ausschnitt aus dem Vektorkonstrukt zur Expression von EIN2<sup>479-1294</sup> in *E. coli***

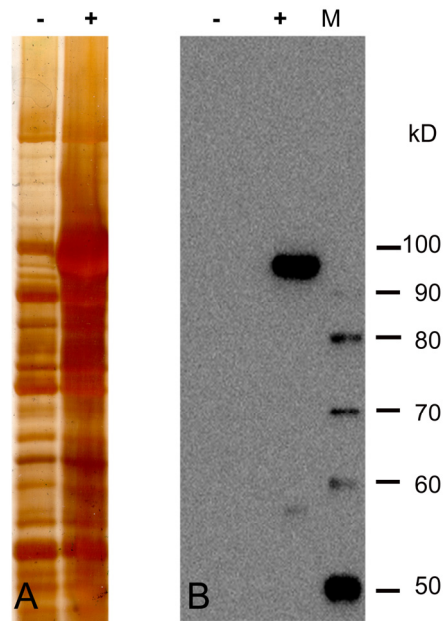
Gezeigt ist ausschließlich das in den Vektor klonierte Gen, sowie der für die Reinigung über Affinitätschromatographie notwendige Hexahistidinanker, des weiteren Start und Stopp des offenen Leserahmens und die Proteaseerkennungssequenz.

Zur Etablierung von Expressionsbedingungen für das Protein EIN2<sup>479-1294</sup> wurden die unter II.3.10 beschriebenen Einflussgrößen wie Bakterienstamm, Anzuchtstemperatur und Induktorkonzentration in ersten Expressionsversuchen untersucht.

Abb III-4 zeigt das silbergefärbte Gel einer SDS-PAGE und den Western Blot von Proteinproben einer Expressionsreihe, die mit pET21a\_MCSpET28a\_EIN2<sup>479-1294</sup> und pRARE cotransformierten *E. coli* ER2566-Zellen durchgeführt wurde. Aufgetragen sind die nicht-induzierten und induzierten Proben, die während einer Expression bei 30°C zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Induktion aus der Kultur entnommen wurden. Im Gegensatz zur nichtinduzierten Kultur wird in der induzierten Kultur eine Proteinbande nachgewiesen, die im Expressionsverlauf stark an Intensität zunahm (Abb. III-4, A). Um dieses Protein mit einer Größe knapp unter 100 kD eindeutig als das EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein zu identifizieren, wurde eine Western Blot Analyse mit einem gegen den Histidinanker gerichteten Antikörper durchgeführt. Das dabei erhaltene Signal konnte eindeutig auf die Expression des Proteins zurückgeführt werden (Abb. III-4, B).

Die Expression von EIN2<sup>479-1294</sup> konnte auch in BL21 (DE3), C41 (DE3), C43 (DE3) und Rosetta-gami-Zellen bei Kotransformation mit pRARE erzielt werden, jedoch war die Kultivierungsdauer und das Expressionslevel für ER2566-Zellen optimal.





**Abb. III-4: Auftrennung von Gesamtzellextrakten einer Expression von EIN2<sup>479-1294</sup> in *E. coli***

Für die Expression wurde ER2566 Zellen verwendet, die mit pRARE kotransformiert waren. Die Expression wurde bei 30°C durchgeführt. Aufgetragen wurden Proben zum Zeitpunkt 6 h nach Induktion.

- entspricht der uninduzierten Kultur, + bezeichnet die mit 0,25 mM IPTG induzierte Kultur.

A) Silbergefärbtes SDS-PAGE Gel

B) Western Blot

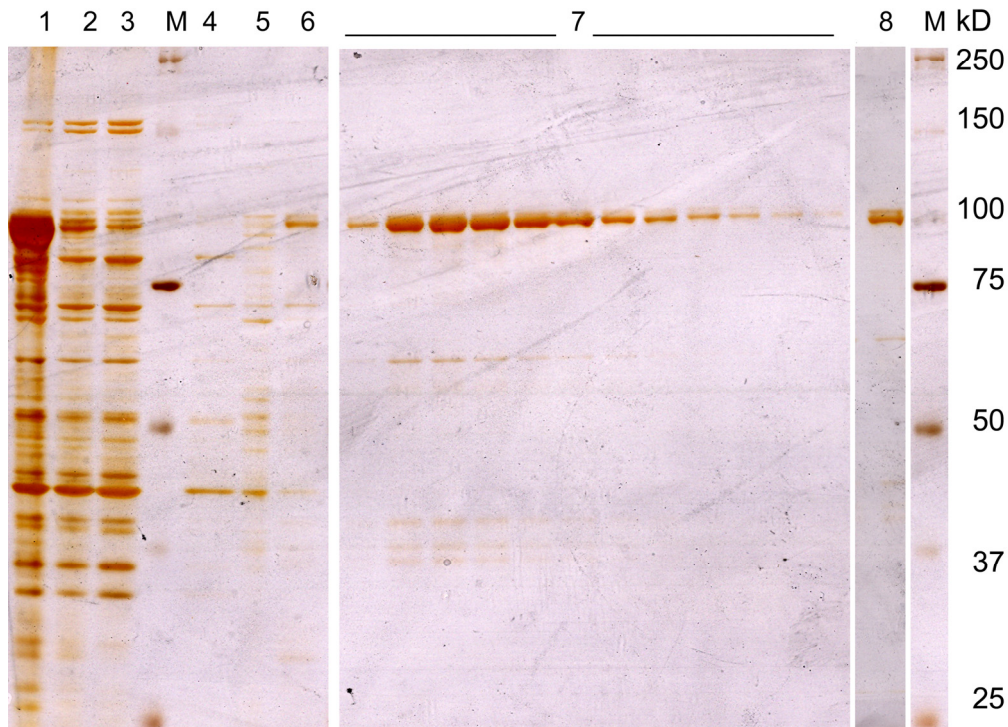
M: Bench Mark Protein Standard

### III.1.3 Reinigung des rekombinanten Proteins EIN2<sup>479-1294</sup> aus *E. coli*

Es wurde eine Präparation entwickelt, durch die das Protein EIN2<sup>479-1294</sup> über immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt werden konnte.

EIN2<sup>479-1294</sup> wurde wie unter II.3.9.1 beschrieben in *E. coli* ER2566 exprimiert. Die Bakterienzellen wurden nativ in Reinigungspuffer aufgeschlossen und das Zelllysat wurde von Zelltrümmern und Membransystemen mittels Zentrifugation abgetrennt. Die Bindung des Proteins an eine mit Nickelionen beladene Iminodiessigsäure-Matrix (IDA) erfolgte über die an beiden Protein-Termini gelegenen Hexahistidinanker. Durch stufenweise Erhöhung der Imidazolkonzentration im Puffer wurde das Protein von Verunreinigungen gesäubert, die durch unspezifisch bindende Proteine verursacht wurden, und konnte schließlich mit einem linearen Imidazolgradienten von der IDA-Matrix eluiert werden (vgl. II.3.11).

Da der kaliumphosphathaltige Reinigungspuffer in Experimenten mit Kalzium zur Präzipitation von unlöslichem Kalziumphosphat führen würde und zudem Glycerin für die Charakterisierungsversuche aus der Probe entfernt werden musste, wurde das Protein in Messpuffer umgepuffert. Dazu wurde das Protein durch Ultrafiltration auf 2,5 ml eingengt und der Pufferwechsel mittels einer PD10-Gelfiltrationssäule in den Messpuffer durchgeführt. Anschließend wurde das Protein erneut konzentriert.



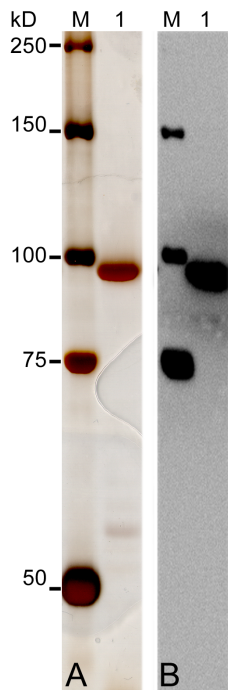
**Abb. III-5: Reinigung von EIN2<sup>479-1294</sup>**

Dargestellt ist ein silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel, das die einzelnen Reinigungsschritte von EIN2<sup>479-1294</sup> über das IMAC-Verfahren zeigt.

- 1) Lösliche Fraktion des Zellaufschluß
- 2) Durchflussfraktion nach Beladen der Ni-IDA – Säule mit der löslichen Fraktion des Zellaufschluß
- 3) Waschschrift mit 0 mM Imidazol
- 4) bis 6) Waschschrift mit 0/ 75/ 100/ mM Imidazol
- 7) Fraktionen des linearen Imidazolgradientens zwischen 100 und 250 mM Imidazol
- 8) Konzentrierte Probe nach Pufferaustausch
- M) Proteingößenstandard

Der Verlauf einer Reinigung von EIN2<sup>479-1294</sup> ist in Abb III-5 dargestellt. Wie auf dem silbergefärbten SDS-PAGE-Gel zu erkennen ist, konnte mit dieser Methode EIN2-Protein ohne Verunreinigung durch andere *E. coli*-Proteine präpariert werden. Spur 1 dieses SDS-PAGE Gels zeigt eine Probe des Zentrifugationsüberstandes nach dem Zellaufschluß. Man erkennt deutlich eine stark angefärbte Proteinbande auf einer Höhe knapp unterhalb von 100 kD, die quantitativ vor die anderen Proteine hervortritt und die dem EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein zugeordnet werden konnte. Die Waschschrift zur Entfernung unspezifischer Bindungspartner an die IDA-Matrix sind in den Spuren 2 bis 6 dargestellt. Spur 7 zeigt die vereinigten Elutionsfraktionen aus dem Imidazolgradienten, die in Spur 8 umgepuffert und erneut konzentriert wurden. Die Identität des EIN2<sup>479-1294</sup>-Proteins in der gereinigten Probe wurde durch einen gegen den Hexahistidinanker gerichteten Antikörper im Western Blot bestätigt.

Unter Verwendung dieser Präparationsvorschrift konnten etwa 1,5 mg Protein aus 10 g Bakterien gewonnen werden.



**Abb. III-6: Untersuchung des gereinigten Proteins**

Mittels Präparationsvorschrift für EIN2<sup>479-1294</sup> wurde reines Protein hergestellt, dass durch seine zwei Hexahistidinanker als EIN2<sup>479-1294</sup> Protein identifiziert werden konnte.

A: Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel

B: Western Blot Analyse mit einem gegen Hexahistidin-Ankern gerichteten Antikörper

Mit M = Größenstandard und 1 = gereinigte Proteinprobe

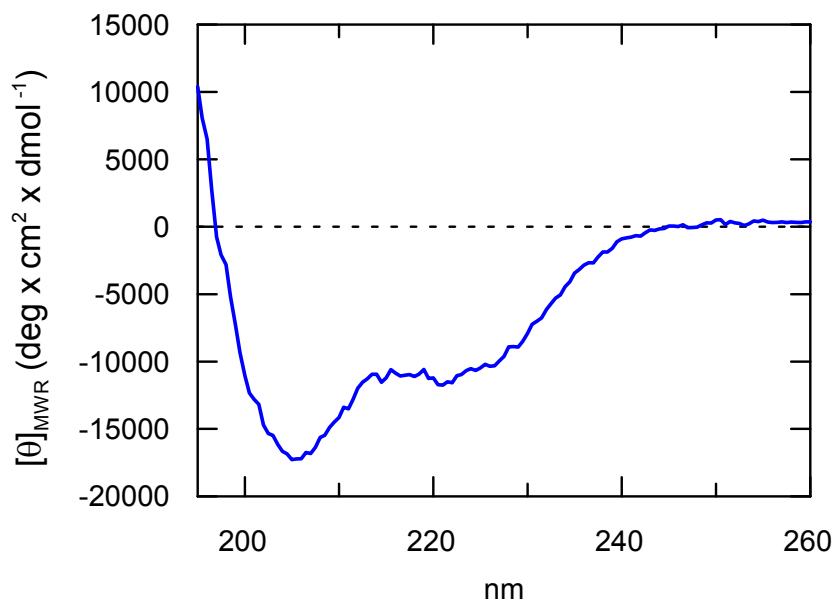
## III.2

### Untersuchungen zur Sekundärstruktur von EIN2<sup>479-1294</sup>

Der Faltungszustand eines Proteins lässt sich mit Hilfe der Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) beurteilen. Zum einen lassen sich bei vorliegender theoretischer, also einer aus der Aminosäuresequenz des Proteins abgeleiteten Strukturvorhersage, aus einem gemessenen CD-Spektrum Aussagen über den Konformationszustand eines gereinigten Proteins ableiten, und zum anderen kann aus dem Spektrum die quantitative Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente des Proteins abgeschätzt werden. Der Nachweis von ausgeprägten Sekundärstrukturelementen gilt als Argument für die erfolgreiche Reinigung des Proteins in seinem nativen Zustand, der die Voraussetzung für eine Charakterisierung des Proteins darstellt. Da bei dieser spektroskopischen Technik alle in der Probe vorliegenden Proteine zum Spektrum beitragen, ist eine hohe Reinheit des Proteins unabdingbare Voraussetzung für diese Untersuchungsmethode. Diese Voraussetzung

war mit der Etablierung des Reinigungsprotokolls für EIN2<sup>479-1294</sup> gegeben (vgl. II.3.11).

Das gemessene Fern-UV-Spektrum einer Proteinprobe von EIN2<sup>479-1294</sup> in Abb III-7 zeigt die charakteristischen Merkmale eines Proteins mit geordneter Struktur. Beim Vergleich des ermittelten Spektrums für EIN2<sup>479-1294</sup> mit den Spektren sekundärstrukturreiner Peptide lässt sich das gemessene Spektrum am besten mit dem für  $\alpha$ -helikale Proteine typischen Spektrum beschreiben. Obwohl die Lage der Minima bei 221 und 205 nm und der Nulldurchgang des Spektrums bei 197 nm geringfügig von den typischen Werten eines  $\alpha$ -helikalen Proteins abweichen (Minima bei 222 und 208 nm, Nulldurchgang bei 202 nm) und sich das für  $\alpha$ -helikale Proteine markante Maximum bei 192nm aufgrund der Datenqualität unterhalb von 200 nm nicht bestimmen lässt, spricht die Ausprägung der Minima und die Lage des Nulldurchgangs für ein Protein mit signifikanter  $\alpha$ -helikaler Ausprägung. Die besonders starke Betonung des Minimums bei 205nm lässt dabei auf einen deutlichen Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen im EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein schließen.



**Abb. III-7: Das CD Spektrum von EIN2<sup>479-1294</sup> zeigt Merkmale eines Proteins mit charakteristischem  $\alpha$ -helikalem Anteil in der nativen Sekundärstruktur**

Die Messungen wurden an einem Jasco 715 Spektralpolarimeter bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurde 0,08 mg/ml Protein in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,6 in einer Mikroquarzküvette mit 1 mm Schichtdicke vermessen. Abgebildet ist die Überlagerung von 10 Einzelspektren, die im Bereich zwischen 195 und 260 nm mit der Bandbreite 1 nm und einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min aufgezeichnet wurden. Die gemessene Elliptizität wurde nach Gleichung II.2 auf das durchschnittliche Molekulargewicht der Aminosäuren normiert ( $\Theta_{MRW}$ ).

Für die quantitative Abschätzung der Sekundärstrukturzusammensetzung in EIN2<sup>479-1294</sup> wurden die Programme Selcon3 und ContinLL verwendet. Mit beiden Programmen konnte für das Protein ein  $\alpha$ -Helix-Gehalt von 38 bis 39 % ermittelt werden. Der Anteil an  $\beta$ -Faltblatt Strukturen wurde zwischen 10 und 13 % berechnet.

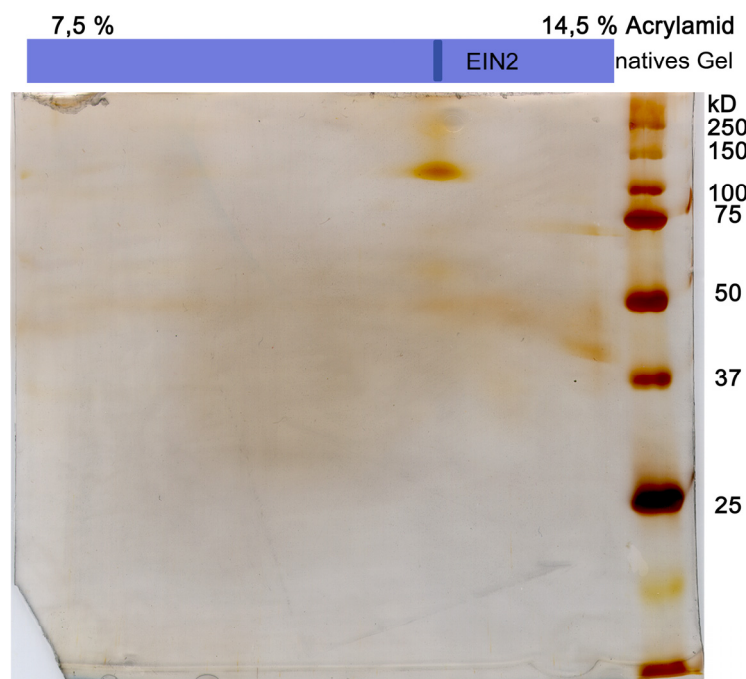
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -turn	Random Coil
Selcon3	38,5	13,4	19,6	29,1
ContinLL	39,4	10,8	19,4	30,4

**Tab III.1: Berechnete Sekundärstrukturanteile in EIN2<sup>479-1294</sup>.**

Dargestellt sind die mit den Programmen Selcon3 und ContinLL ermittelten Sekundärstrukturanteile des Proteins (Angaben in %).

### III.3 Analyse des Oligomerisierungszustands von EIN2<sup>479-1294</sup>

Die monomere Form von EIN2<sup>479-1294</sup> wurde mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen, deren Durchführung unter II.3.5 beschrieben wurde. Im gefärbten Gel der zweiten, denaturierenden Dimension erkennt man, dass gereinigtes EIN2 in seiner nativen Form nicht als multimeres Protein in *E. coli* exprimiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die für EIN2 im denaturierenden Gel identifizierten Bande nicht durch Proteinbanden multimerer Proteine überdeckt wurde.



**Abb. III-8:**  
**2D-Gelelektrophorese von gereinigtem EIN2<sup>479-1294</sup>**

Gezeigt ist das denaturierende SDS-PAGE-Gel der 2. Dimension des Experiments. Das native Gradientengel ist nur schematisch eingezeichnet.

### **III.4 Untersuchungen zur Ligandenbindung an EIN2<sup>479-1294</sup>**

Die Sequenzähnlichkeit des aminoterminalen Domäne des EIN2-Proteins zu Proteinen der Nramp-Familie, die für die Homöostase der Zelle und den Transport zweiwertiger Kationen verantwortlich sind, gibt Hinweise darauf, dass das EIN2-Protein ebenfalls an Transportprozessen oder an der Bindung von zweiwertigen Kationen beteiligt sein könnte. Bislang ist es jedoch noch nicht gelungen, eine solche Beteiligung nachzuweisen. Bei Untersuchungen zur Komplementation der defizienten Transportaktivität für Manganionen in *sfm1*-mutanten Hefezellen konnte dieser Defekt im Gegensatz zu Versuchen mit drei weiteren aus *A. thaliana* getesteten Nramp-Proteinen nicht durch die heterologe Expression von EIN2 aufgehoben werden. Allerdings sind von den Nramp-Proteinen Transportaktivität für verschiedenste Metallionen bekannt, so dass möglicherweise die Untersuchungen mit Kationen durchgeführt wurden, für die EIN2 nicht spezifisch ist.

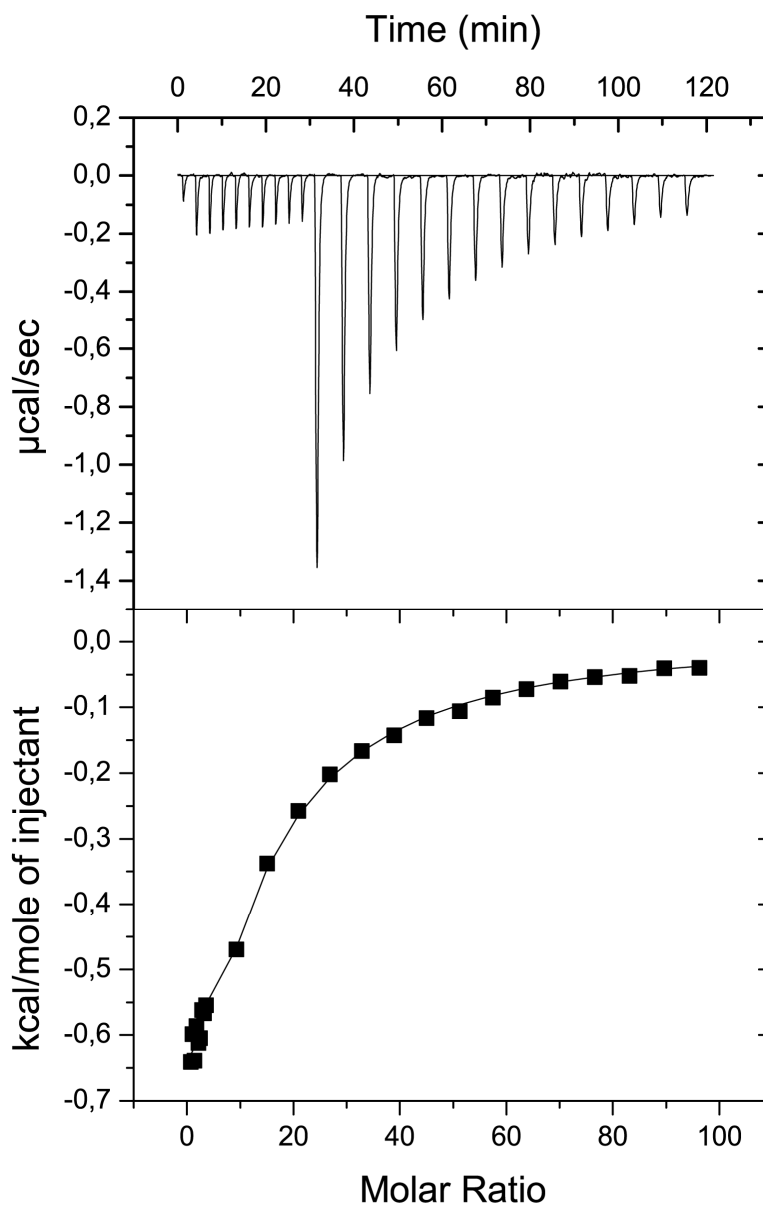
Auch ist die subzelluläre Lokalisation des EIN2-Proteins bislang unbekannt, so dass aus dieser Information keine Rückschlüsse auf die Ligandenspezifität einer solchen Bindungsstelle gezogen werden können. Trotzdem kann Kalzium als ein solcher Kandidat für die Bindung an EIN2 betrachtet werden. Da schon die Bildung eines Proteinkomplexes zwischen Ethylenrezeptor und dem Protein CTR1 an der Membran des ER nachgewiesen werden konnte, ist eine Erweiterung dieses Komplexes um EIN2 aus Effizienzgründen der Signalübertragung vorstellbar. Da das ER den zellulären Pool für Kalzium in der Pflanze darstellt, sollte zunächst getestet werden, ob EIN2 spezifisch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden kann. Zudem konnte die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an der Ethylenantwort bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen werden [61,62]. Die Bestätigung solcher Bindungsstellen im EIN2-Protein würde einen an Kalziumbindung oder -transport gekoppelten Signalmechanismus in der Ethylenantwort unterstützen.

#### **III.4.1 Mikrokalorimetrische Untersuchungen zur Bindung von Kalzium an EIN2<sup>479-1294</sup>**

Zur Klärung der Frage, ob eine Funktion des EIN2-Proteins im Ethylensignalweg in der direkten Interaktion mit Kalziumionen besteht, wurde die Fähigkeit des EIN2-Proteins untersucht, Kalziumionen zu binden. Für Kalzium konnte eine mögliche

Beteiligung am Ethylensignalweg nachgewiesen werden. Ein möglicher Interaktionspartner, für den dieses Ion essentielle Bedeutung für seine Funktion besitzt, konnte bislang jedoch nicht identifiziert werden. Die mögliche Bindung von Kalzium an EIN2 wurde mit Hilfe der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Zur Charakterisierung der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an EIN2 wurden die Stöchiometrie der Reaktion untersucht und die thermodynamischen Parameter der Protein-Ligand-Bindung aus den ITC-Experimenten ermittelt.

Die Untersuchung einer potentiellen Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an das rekombinante EIN2-Protein erfolgte durch die Titration einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zu substratfreier EIN2<sup>479-1294</sup>-Lösung. Unter den hier angewendeten experimentellen Bedingungen resultierten hyperbole bis schwach sigmoide Bindungsisothermen. Um den Anfangsbereich des Experimentes, in dem nur eine geringe Konzentration von Kalzium im System vorlag, besser untersuchen zu können, wurde die Titration in zwei Stufen mit unterschiedlichen Injektionsvolumina durchgeführt. Die obere Hälfte der Abbildung III-9 zeigt die Rohdaten der ITC-Messung. Dabei entspricht jeder Peak der Wärmetönung [ $\mu\text{cal s}^{-1}$ ], die durch die Injektion von  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in jedem Titrationsschritt in der Proteinlösung entsteht. In der unteren Hälfte der Abbildung sind die integrierten Messsignale des Experiments gezeigt, wobei jeder Punkt das Integral eines Peaks repräsentiert. Die durch die Punkte gelegte Kurve ist das Ergebnis einer Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Marquard-Algorithmus). Die Bindungsisothermen wurden unter Verwendung des einfachsten Bindungsmodells (One Set of Sites) ausgewertet. Die Bindungsisothermen der  $\text{CaCl}_2$ -Titration zu rekombinant gereinigtem EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein lieferten eine Bindungskonstante  $K_a$  von  $2,45 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Dabei entsteht bei der Bindung von Kalzium an das Protein eine Wärmetönung, die der Änderung der freien Reaktionsenthalpie  $\Delta H^0$  von  $-5,4 \text{ kJ mol}^{-1}$  entspricht. Somit ist die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an EIN2 ein exothermer Prozess, der mit einer Änderung der Entropie  $\Delta S^0$  von  $-2,8 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  einhergeht. Aus den thermo-dynamischen Parametern für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an EIN2<sup>479-1294</sup> konnte der zu dieser Reaktion zugehörige  $\Delta G^0$ -Wert von  $19,02 \text{ kJ mol}^{-1}$  und somit der entropische Term  $T\Delta S$  zu  $-13,62 \text{ kJ mol}^{-1}$  errechnet werden.



**Abb. III-9: Darstellung der Wärmefreisetzung  $\Delta q$  [ $\text{kcal mol}^{-1}$  Ligand] bei der Titration von  $\text{CaCl}_2$  zu rekombinatem  $\text{EIN2}^{479-1294}$ -Protein**

In der oberen Hälfte der Abbildung ist die freigesetzte Wärmetönung bei der Titration von 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zu  $\text{EIN2}^{479-1294}$ -Protein als Rohdaten des ITC-Experiments gezeigt. Es wurden 10 Injektionen à 1  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$ -Lösung, gefolgt von 15 Injektionen à 16  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$ -Lösung in eine 15  $\mu\text{M}$   $\text{EIN2}^{479-1294}$ -Lösung titriert. Im unteren Teil sind die integrierten Signale dieses Titrationsversuchs abgebildet. Es wurden jeweils drei Titrationsexperimente in 50 mM Tris HCl, 50 mM NaCl pH 7,5 bei 20 °C durchgeführt.

Zusätzlich können durch den Auswertalgorithmus die Anzahl der Bindungsplätze errechnet werden, welche sich im Fall des angewendeten Modells *One Set of Site* durch identische Bindungs- und thermodynamische Eigenschaften auszeichnen. Für die hier beschriebene Kurven-anpassung musste die Anzahl der Bindestellen vorgegeben werden, um eine statistisch signifikante Kurvenanpassung zu erhalten. Die Annahme von 3-4  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen wurde statistisch favorisiert. Der C-Wert für diese Experimente lag bei 0,04. Mittels ITC-Messung konnte also eine Bindung von Kalzium an  $\text{EIN2}^{479-1294}$  nachgewiesen werden.



### III.4.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Ligandenbindung an EIN2<sup>479-1294</sup>

In den mikrokalorimetrischen Messungen wurden nur sehr kleine Wärmeauslenkungen des Systems registriert. Daher sollten die in den ITC-Messungen identifizierte Bindung von 3-4 Kalziumionen pro EIN2<sup>479-1294</sup>-Molekül durch eine weitere Messtechnik bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde die Fluoreszenzspektroskopie zur weiteren Charakterisierung der Ligandenbindung von Ca<sup>2+</sup> an EIN2<sup>479-1294</sup> eingesetzt.

#### III.4.2.1 Bestimmung der Zugänglichkeit der Tryptophane in EIN2<sup>479-1294</sup>

Die Eignung der Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung möglicher Ligandenbindestellen in EIN2 musste durch die Zugänglichkeit der Tryptophanreste für Fluoreszenzquenching-Versuche nachgewiesen werden. Dazu wurden Quencher mit unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften verwendet. Acrylamid ist ein apolares, ungeladenes Molekül, das sowohl Kontakte mit der lösungsmittel-exponierten Proteinoberfläche herstellen als auch ins Proteininnere diffundieren kann. Dadurch kann Acrylamid auch mit Tryptophanen, die in einer hydrophoben Umgebung eingebettet sind, in Kontakt treten. Durch die selektive Anregung der Tryptophane bzw. durch die Löschung der Fluoreszenzintensität nach Kollision mit Acrylamid erhält man so Informationen über Bereiche des Proteins, die in der Nähe der gequenchten Tryptophanreste liegen. Bei dem Quencher Iodid handelt es sich dagegen um ein einwertiges Anion, das aufgrund der Größe seiner Hydrathülle und der negativen Ladung nur mit den an der Proteinoberfläche liegenden Tryptophanresten in Kontakt treten kann.

#### III.4.2.2 Fluoreszenzlöschung durch Acrylamid und Natriumiodid an EIN2<sup>479-1294</sup>

Die Zugänglichkeit der Tryptophanreste von EIN2<sup>479-1294</sup> wurde mittels *Steady State Fluoreszenz Quenching*-Experimenten mit den Quenchern Acrylamid und Natriumiodid bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm untersucht. Unter diesen Bedingungen zeigt das Protein ein Emissionsmaximum von 348 nm, das durch die Zugabe der beiden Quencher eine Blauverschiebung nach 343 nm erfuhr und an dem die Fluoreszenzintensität im Verlauf der Messungen signifikant abnahm. Für die

Stern-Volmer-Diagramme in Abb III-10 wurden der Quotient aus Fluoreszenzintensität in Abwesenheit des Quenchers gegen die Fluoreszenzintensität in Anwesenheit des Quenchers ( $F_0/F$ ) am Emissionsmaximum gebildet und gegen die jeweilig eingesetzte Quencherkonzentration aufgetragen. Die Quench-Versuche mit Acrylamid ergaben einen leicht nach unten gekrümmten Kurvenverlauf. Diese Abweichung des linearen Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Quencherkonzentration deutet im Stern-Volmer-Plot auf das Vorkommen von zwei unterschiedlichen Fluorophorklassen hin; solche Tryptophanreste, die lösungsmittel-exponiert vorliegen und somit für den Quencher gut erreichbar sind und solche Tryptophane, die durch ihre Lage im Inneren des Proteins weitestgehend abgeschirmt sind und daher weniger gut zugänglich sind. Aus der Kurvenanpassung konnten die anteiligen Fluoreszenzbeiträge aus dynamischer und statischer Fluoreszenzlöschung berechnet werden. Dazu wurde eine modifizierte Stern-Volmer-Gleichung (Gl. II.5) verwendet, die die unterschiedlichen Zugänglichkeiten der Tryptophane im Protein berücksichtigt.

Für den Quencher Acrylamid ergab sich die beste Kurvenpassung unter Verwendung von ausschließlich kollisionalem Quench an zwei unterschiedlichen Populationen von Tryptophanen. Kurvenanpassungen unter der Annahme von ein oder zwei statischen Quenching-Prozessen, die durch die Bindung des Quencher-moleküls an das Protein hervorgerufen werden, waren statistisch weniger signifikant und führten somit zu keiner verbesserten Kurvenanpassungen. Der lösungsmittel-exponierten und somit zugänglichen Klasse der Tryptophanreste konnte eine anteilige Fluoreszenz von 28 % zugeordnet werden. Die zugehörige Stern-Volmer-Konstante für diese Tryptophane beträgt  $11,87 \text{ M}^{-1}$ . Die verborgenen Tryptophane trugen zu 72 % an der der Gesamtfluoreszenz bei und besaßen eine Stern-Volmer-Konstante von  $0,91 \text{ M}^{-1}$ . Im Gegensatz dazu ergab sich für Iodid eine lineare Auftragung im Stern-Volmer-Diagramm. Dies lässt auf eine einzige zugängliche Population von Tryptophanen schließen. Diese Gerade ließ sich am besten an ein Modell anpassen, in dem eine einzelne Klasse von Tryptophanen dynamisch die Fluoreszenzlöschung kontrolliert. Für diese Tryptophane wurde eine Stern-Volmer-Konstante von  $0,71 \text{ M}^{-1}$  ermittelt. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl oberflächennahe Tryptophane als auch im Proteininneren verborgenen Tryptophane durch Quencher-moleküle erreichbar sind. Dadurch wurde die Voraussetzung erfüllt, um Ligandenbindung am EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein durch Fluoreszenzlöschung zu detektieren.

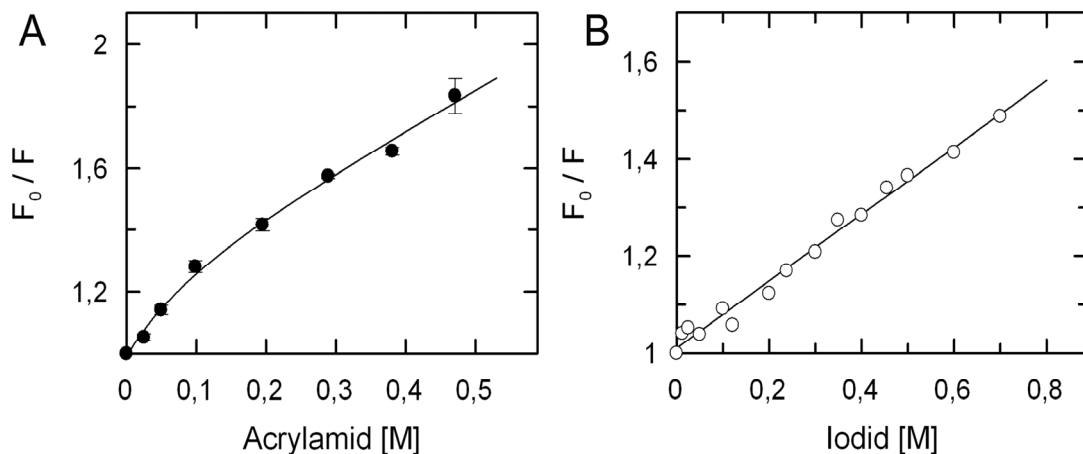


Abb. III-10: Stern-Volmer-Auftragung der Fluoreszenzlöschung an EIN2<sup>479-1294</sup> durch Acrylamid (A) und Natriumiodid (B)

### III.4.2.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Bindung von Kalzium an EIN2<sup>479-</sup>

Um die bereits durch die ITC-Experimente identifizierte Ca<sup>2+</sup>-Bindung an EIN2<sup>479-1294</sup> weiter zu untersuchen, wurden Fluoreszenzemissionsspektren nach Tryptophan-anregung bei ansteigenden Konzentrationen an CaCl<sub>2</sub> aufgezeichnet.

Zunächst musste untersucht werden, ob durch die Titration von CaCl<sub>2</sub> eine Änderung in der Fluoreszenzintensität des Proteins beobachtet werden konnte und ob es sich bei dieser Änderung ausschließlich um dynamische, also durch Stoßvorgänge ausgelöste, Fluoreszenzlöschung handelte, oder ob diese tatsächlich auch durch Bindungsereignisse hervorgerufen werden konnten. Da das verwendete Fluoreszenzspektrometer nicht über die Möglichkeit verfügte, die Fluoreszenzlebensdauer der angeregten Zustände zu messen und somit eine direkte Unterscheidung der beiden verschiedenen Quenchformen (statisch und dynamisch) nicht möglich war, wurde eine indirekte Methode zu ihrer Unterscheidung gewählt. Dazu wurde im Stern-Volmer-Diagramm Gleichungen zur Kurvenanpassung verwendet, die die unterschiedlichen Quenchformen berücksichtigen.

Zur Detektion von statischen Quenchereignissen durch das zweiwertige Kation Ca<sup>2+</sup> wurden Fluoreszenzmessungen nach II.3.8 mit EIN2<sup>479-1294</sup> durchgeführt. Die Emissionsspektren wurden nach additiver Zugabe von CaCl<sub>2</sub> hinsichtlich ihres Maximums analysiert. Das Emissionmaximum für diese Versuche lag bei 348 nm. Aus den experimentell ermittelten Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Titrationsschritte wurden die Stern-Volmer-Beziehungen (F<sub>0</sub>/F) gebildet und diese

im Stern-Volmer-Diagramm gegen die Konzentration von  $\text{CaCl}_2$  aufgetragen. Durch nicht-lineare Regression wurde eine Kurvenanpassung der Datenpunkte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt. Dazu wurden Gleichungen verwendet, die dynamische, statische oder kombinierte Fluoreszenzlöschung an den zwei zuvor identifizierten, unterschiedlichen Tryptophanklassen beschreiben. Mittels  $\chi^2$ -Analyse konnte die beste Kurvenanpassung an die experimentellen Daten ermittelt werden, wobei kleine  $\chi^2$ -Werte eine bessere Anpassung an die verwendete Gleichung beschreiben.

Die Fluoreszenzintensität wurde in den Titrationsversuchen mit dem potentiellen Quencher Kalzium deutlich vermindert. Die Auswertung des Verhältnisses Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration in einem Stern-Volmer-Diagramm ergab für die Versuche mit  $\text{CaCl}_2$  ein Abweichen vom linearen Verhalten und war somit ein Zeichen für die Beteiligung mehrerer Fluorophore an dem Löschvorgang (Abb. III-11). Da bereits durch die Quenchversuche mit Acrylamid und Iodidionen die Existenz zweier unterschiedlich zugänglicher Tryptophanklassen gezeigt werden konnte, wurden diese zwei Klassen auch in die Regressionsanalyse einbezogen. Es zeigte sich, dass die Regression am besten durch eine nicht-lineare Gleichung beschrieben wurde, die zusätzlich zu der dynamischen Löschung an beiden Tryptophanklassen auch statisches Quenching an eine der beiden Tryptophanklassen berücksichtigt. Der  $\chi^2$ -Wert für diese Regression betrug 0,00054, was eine nahezu optimale Anpassung der experimentellen Daten an die Regressionsgleichung darstellte. Der  $\chi^2$ -Wert der Kurvenanpassung durch die Regressionsgleichung, die ausschließlich dynamische Quenchereignisse an beiden Tryptophanklassen betrachtet, ist im Vergleich zu dem oben beschriebenen kombinierten Quenching fast zweimal größer und bedeutet somit eine schlechtere Anpassung an die Daten. Vor allem aus der Ausschnittsvergrößerung des Diagramms wird deutlich, wie es bei der Annahme von ausschließlich dynamischen Quenchereignissen im Bereich der niedrigen Titrationschritte durch die Unterschätzung der experimentellen Daten zu einer Verschlechterung des  $\chi^2$ -Wert kommt. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass Kalziumionen nicht ausschließlich durch kollisionale Quenchereignisse die Fluoreszenzintensität von  $\text{EIN}2^{479-1294}$  löschen, sondern dass die Löschereignisse ebenfalls durch Bindung des Ions an das Protein verursacht werden.

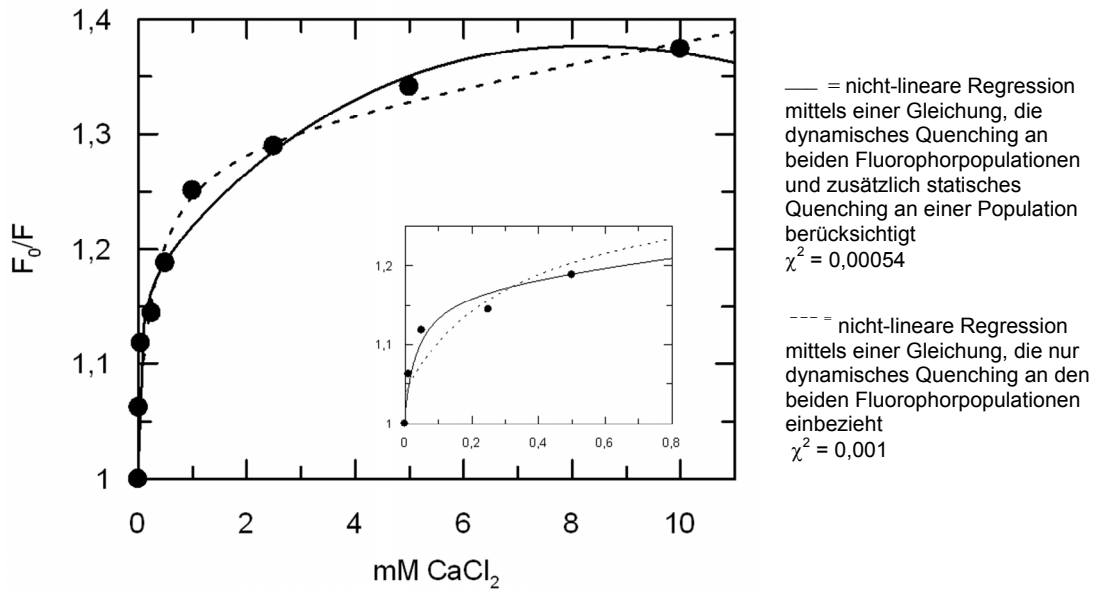


Abb. III-11: Stern-Volmer-Diagramm der Fluoreszenzlösung an EIN2<sup>479-1294</sup> bei der Titration von CaCl<sub>2</sub>

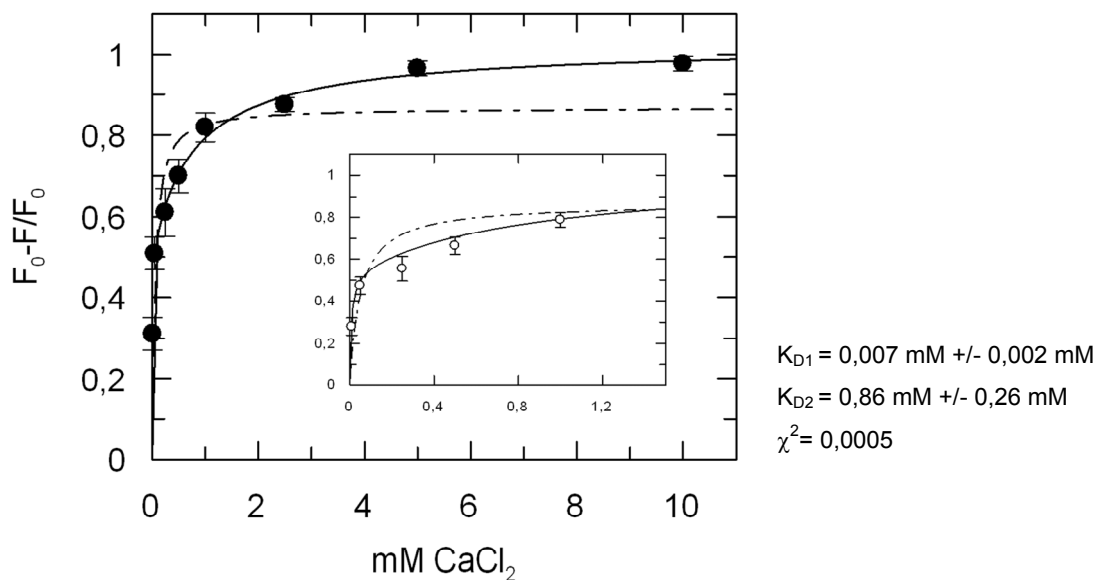
#### III.4.2.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante $K_D$ für die Bindung von $Ca^{2+}$ an EIN2

Aus den Daten der oben beschriebenen Untersuchung konnte durch eine Auswertung in einem abgewandelten Stern-Volmer-Diagramm zusätzlich die Affinität der Bindung des Metallions an das EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein bestimmt werden.

In Abbildung III-12 ist das Ergebnis der Titrationsreihen mit Ca<sup>2+</sup> aus Abb. III-1 in einer abgewandelten Stern-Volmer-Auftragung dargestellt, in der die relative Änderung der Fluoreszenzintensität (ausgedrückt durch den Term  $F_0 - F/F_0$ ) in Bezug zur Ionenkonzentration gesetzt wird. Die daraus resultierende Festlegung des maximal beobachteten Quencheffekts auf den Wert 1 erleichtert zudem die Vergleichbarkeit der nachfolgenden Experimente. Diese abgeänderte Auftragung wurde bereits bei Libich [104] beschrieben.

Bei der Titration von CaCl<sub>2</sub> zu EIN2<sup>479-1294</sup> kann die Löschung der Fluoreszenzintensität nach Zugabe des Quenchers beobachtet werden. Der Kurvenverlauf in dem abgewandelten Stern-Volmer-Diagramm (Abb. III-12) lässt dabei auf eine Bindung des Metallions in zwei unterschiedlich schnell verlaufenden Reaktionsschritten schließen, was auf Bindungsstellen für Ca<sup>2+</sup> mit unterschiedlichen Affinitäten hindeutet. Der steile Anstieg der Kurve beschreibt dabei die Fluoreszenz-lösung bei geringen Konzentrationen an Kalzium in der Lösung, wie sie bei der Bindung eines Liganden an eine affine Bindungsstelle zu erwarten ist. Der flachere Bereich

der Kurve wird durch die Bindung des Ions an eine weitere Bindungsstelle gebildet, an die der Ligand erst bei höheren Konzentrationen binden kann und die somit eine geringere Affinität als die erste Stelle besitzen muss. Tatsächlich lässt sich aus den Auftragungen der anteiligen Fluoreszenz gegen die Ionenkonzentration in Abb. III-14 nur eine schlechte Kurvenanpassung unter der Annahme von einer unabhängigen Bindungsstelle durchführen (gepunktete Linie). Durch die Verwendung einer Kurvenanpassung, die zwei nicht-identische unabhängige Bindungsstellen für  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{EIN2}^{479-1294}$  berücksichtigt (durchgängige Linien), kann der  $\chi^2$ -Wert der Kurvenanpassung im Vergleich zu der Annahme einer einzigen Bindestelle um den Faktor 30 verbessert werden und es ergibt sich eine zufrieden stellende Kurvenanpassung an die experimentellen Daten. Zur optischen Verdeutlichung der unterschiedlichen Kurvenanpassung durch die Verwendung der unterschiedlichen Gleichungen wurde der Kurvenausschnitt zwischen 0 und 1,4 mM  $\text{CaCl}_2$  vergrößert und in die Abbildung des Gesamtexperiments integriert. Den zwei Bindungsstellen für Kalzium im Protein  $\text{EIN2}^{479-1294}$  konnten die Dissoziations-konstanten  $K_{D1} = 7 \mu\text{M}$  und  $K_{D2} = 860 \mu\text{M}$  zugeordnet werden.



**Abb. III-12:  $\text{EIN2}^{479-1294}$  besitzt zwei Bindungsstellen für  $\text{CaCl}_2$  mit unterschiedlichen Affinitäten**

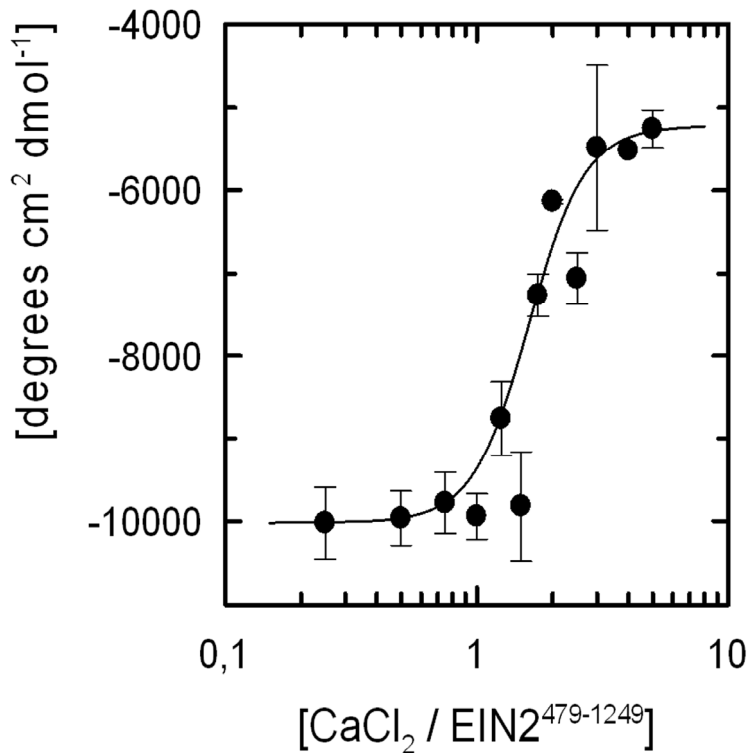
Abgebildet ist die abgewandelte Stern-Volmer-Auftragung der Fluoreszenzlösung bei der Titration von  $\text{CaCl}_2$  zu  $\text{EIN2}^{479-1294}$ .

— = Kurvenanpassung der experimentellen Daten unter Annahme von 2 Bindungsstellen

- - - = Kurvenanpassung der experimentellen Daten unter Annahme einer einzigen Bindungsstelle

### III.5 Analyse der Konformationsänderungen in EIN2<sup>479-1294</sup> nach Ligandenbindung

Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an entsprechende, an der Signalweiterleitung beteiligte Kalzium-bindende Proteine, wird häufig von einer signifikanten Umstrukturierung der Proteinkonformation begleitet. Um zu prüfen, ob die durch ITC-Messungen und Fluoreszenzspektroskopie identifizierte Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  im membran-extrinsischen Bereich von EIN2 auch zu Konformationsänderungen im Protein führt, wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Titrationen zu EIN2<sup>479-1294</sup> CD-spektroskopisch untersucht. Dazu wurden 0,08 mg/ml Protein schrittweise mit einem 5-fach molaren Überschuß an  $\text{Ca}^{2+}$  versetzt. Für die Auswertung wurden die ermittelten Spektren durch Gleichung II.2 auf die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest umgerechnet. Als Indikator für die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen induzierten Konformationsänderungen wurde die Veränderungen des Spektrums bei 222 nm betrachtet, da Proteine mit ausgeprägten  $\alpha$ -helikalen Bereichen, wie auch EIN2<sup>479-1294</sup>, in diesem Bereich ein charakteristisches Minimum besitzen. Veränderungen im Protein, die die Zusammensetzung  $\alpha$ -helikaler Strukturen betreffen, sollten also auf diese Art sichtbar gemacht werden können. Abbildung III-13 stellt die durch Titration mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beobachteten Konformationsänderungen im EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein dar. Bis zu der Zugabe eines molaren Verhältnis  $\text{Ca}^{2+}/\text{EIN2}^{479-1294}$  von 1 konnten nur geringfügige Änderungen in der Sekundärstruktur beobachtet werden. Bei weiterer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt es ab einem zwei- bis dreifach molaren Überschuß von  $\text{Ca}^{2+}$  zu einer deutlichen Abnahme der molaren Elliptizität bei 222 nm und somit zu offensichtlichen Veränderungen in der Sekundärstruktur des Proteins. Wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration weiter auf einen vier- oder fünffachen Überschuß gesteigert, ergeben sich dazu keinen weiteren detektierbaren Änderungen in der molaren Elliptizität des Proteins.



**Abb. III-13: CD-spektroskopische Verfolgung der Konformationsänderungen in EIN2<sup>479-1294</sup> bei Titration des Liganden CaCl<sub>2</sub>**

Die Messungen wurden an einem Jasco 715 Spektralpolarimeter bei 20°C durchgeführt. Es wurde 0,08 mg/ml Protein in 50 mM Tris HCl pH 7,6 / 50 mM NaCl in einer Mikroquarzküvette mit 1 mm Schichtdicke vermessen. Abgebildet ist die Änderung der mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäurerest bei 222 nm bei der Titration von CaCl<sub>2</sub> zu dem Messansatz. Die Spektren wurden im Bereich 230 – 205 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min und einer Bandbreite von 1 nm aufgezeichnet. Die gemessene Elliptizität bei 222 nm aus der Überlagerung von 10 Einzel-spektren wurde nach Gl. II.2 auf das durchschnittliche Molekulargewicht der Aminosäuren normiert (©<sub>MRW</sub>).

### III.6 Sequenzanalyse von EIN2<sup>479-1294</sup> auf Kalzium-bindungsmotive

Aufgrund der vorangestellten Ergebnisse, die eine spezifische Bindung von Kalzium an die membran-extrinsische Domäne von EIN2 gezeigt haben, sollte der C-terminale Bereich von EIN2 auf Ca<sup>2+</sup>-Bindungsmotive untersucht werden. Die größte Klasse der Ca<sup>2+</sup>-bindenden Proteine wird von der *EF-hand*-Superfamilie gebildet. Diese Proteine sind durch das Vorkommen mehrerer Helix-Loop-Helix-Motive charakterisiert, in deren Loop-Bereiche die Bindung des Kalziums erfolgt. Über 50 % aller Ca<sup>2+</sup> bindenden Proteine gehören dieser Proteinfamilie an, deren Erfolg darin begründet liegt, dass des *EF-hand*-Motiv durch Variation der Länge und der



Zusammensetzung des Loops sowie durch die Bildung von Domänenstrukturen eine äußerst große Variabilität erreichen kann.

Zhou et al [107] entwickelten Suchmuster zur Identifikation von *EF-hand*-Motiven, die auf den Resultaten von Sequenzalignments basierten. Für die Vorhersage von kanonischen *EF-hand*-Motiven generierten sie eine Consensussequenz, die besonders die an der direkten Bindung von Kalzium beteiligten Reste des Loops einbezieht. Zudem entwickelten sie auf Grundlage weiterer konservierter Reste des Motivs alternative Suchmuster. Bei dem von ihnen entwickelte Suchalgorithmus für Pseudo-*EF-hand*-Motive wurde von der vereinfachenden Annahme ausgegangen, dass jede Pseudo-*EF-hand* mit einer kanonischen *EF-hand*-Motiv zusammen ein *EF-hand*-Paar bildet. Ein Muster zur Vorhersage Pseudo-*EF-hands* wurde dadurch generiert, indem die Bedingungen, die an der Definition einer kanonischen *EF-hand* geknüpft sind, gelockert werden und gleichzeitig der Einbau konservierter Reste aus kanonischen Loops in die Pseudo-*EF-hand* gestattet wird. Diese Voraussetzung war notwendig, da die Koordination des Kalziums in Pseudo-*EF-hand*-Motiven ausschließlich über die Carbonylgruppen der Proteinhauptkette zustande kommt und somit potentiell jede im Loop vorkommende Aminosäure an der Bindung des Kalziumions beteiligt sein kann.

Auf der Grundlage dieser Sequenzmotive konnten in dieser Arbeit in der carboxyterminalen Domäne von EIN2 mit den Programme ProScan [108] und PattinProt [109] sieben putative *EF-hand*-Motive identifiziert werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei diesen Sequenzabschnitten um *EF-hand*-Domänen mit Kalziumbindungseigenschaften handelt, wird von den Programmen zwischen 80 und 82 % bewertet. Die Zusammenfassung der Sequenzanalyse gibt Tabelle III.2 wieder.

Bei den in EIN2<sup>479-1294</sup> detektierten Sequenzabschnitten handelt es sich ausschließlich um Motive kanonischer *EF-hand*-Loops. Sequenzabschnitte, die Ähnlichkeit zu Pseudo-*EF-hand*-Motiven besitzen, konnten mit den Programmen nicht in der Sequenz von EIN2<sup>479-1294</sup> detektiert werden. Das Suchmotiv Helix-Loop-Helix berücksichtigte bei der Motivsuche ausschließlich vollständige *EF-hand*-Domänen, in denen zusätzlich zu dem bindenden Loop auch die Eingangs- und Ausgangshelices der *EF-hand*-Domäne identifiziert werden. PattinProt ordnet den Sequenzbereichen zwischen den Aminosäuren 779 - 802 sowie 1206 - 1234 eine

knapp über 80 % liegende Wahrscheinlichkeit zu, dass sie diesem Motiv entsprechen.

Den Suchmotiven Loop - Helix und - Loop - fehlen dagegen eine oder beide der stabilisierenden Helices. Durch die Verwendung dieser verkürzten Motive wird eine größere Variabilität in die Motivsuche gebracht, allerdings ohne die durch den Loop vermittelte Spezifität der Bindungsstelle zu verändern. Die Aminosäurebereiche 488 - 508, 575 - 595, 644 - 664 und 979 - 999 wurden als Helix-Loop-*EF-hand*-Motiv identifiziert und Aminosäuren 525 - 538 als -Loop-*EF-hand*- Domäne.

Die meisten in der Literatur beschriebenen Kalzium-bindenden Proteine aus der Klasse der *EF-hand*-Proteine besitzen multiple, paarweise angeordnete Helix-Loop-Helix-Motive (2 - 8 Stück), die über einen kurzen Linker von 5 - 20 Aminosäuren miteinander verbunden sind. Die für den membran-extrinsischen Bereich von EIN2 identifizierten *EF-hand*-Domänen liegen dagegen in der Sequenz weiter voneinander entfernt. Die putativen *EF-hand*- Motiven, die von AS 525 - 538 und 575 - 595 gebildet werden sowie zwischen 575 - 595 und 644 - 664 sind in einem Abstand von 50 Aminosäuren voneinander positioniert, so dass möglicherweise eine Paarung dieser beiden Motive zu einer funktionalen Domäne erfolgen kann.

## ERGEBNISSE

Position im EF Hand Motiv	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Status		-		-	-				-	*		*	-	*	*	-	*	*			*	*			-	-				
<b>Suchmotiv Helix-Loop-Helix</b>	X	D	X	X	G	E	X	X	D	D	X	D	F	D	D	G	L	D	X	X	E	F	X	X	N	D	X	X	X	
konservierte Reste		N			P	N			P	N		N	L	N	N	P	I	E			D	L			P	E				
		Q			P				Q	S		S	I	E	Q		V	N				Y			S	N				
					Q			R				V	S	G		M	Q					M				Q				
					S							W	T	H		C	S					V								
												Y	G	R		T						I								
															K		A						W							
																	G													
																	C													
AS 779-802 82% Wahrscheinlichkeit	M	L	G	A	Y	G	N	T	T	N	N	N	N	N	a	y	E	L	S	E	R	r	Y	S	S	L	R	A	P	S
AS 1206-1234 81% Wahrscheinlichkeit	M	L	P	P	A	A	K	P	A	k	G	k	C	T	t	A	V	T	L	L	D	L	I	K	D	V	E	M	A	
<b>Suchmotiv Helix-Loop-</b>	X	D	X	X	G	E	X	X	D	D	X	D	F	D	D	G	L	D	X	X	E									
konservierte Reste		N			P	N			P	N		N	L	N	N	P	I	E			D									
		Q			P				Q	S		S	I	E	Q		V	N												
					Q			R				V	S	G		M	Q													
					S							W	T	H		C	S													
												Y	G	R		T														
															K		A													
																	G													
																	C													
AS 488-508 82% Wahrscheinlichkeit	E	E	E	I	E	R	T	E	T	r	R	N	E	D	e	S	I	v	R	L	E									
AS 575-595 82% Wahrscheinlichkeit	T	V	V	N	E	V	S	D	K	D	L	i	v	E	t	K	M	A	K	I	E									
AS 644-664 80% Wahrscheinlichkeit	P	S	F	R	S	L	S	G	E	g	G	S	G	T	G	S	L	S	R	L	q									
AS 979-999 82% Wahrscheinlichkeit	G	V	P	S	T	Y	D	D	I	S	Q	S	R	G	G	Y	r	D	A	Y	s									
<b>Suchmotiv -Loop -</b>											D	X	D	F	D	D	G	L	D	X	X	E								
konservierte Reste											N		N	L	N	N	P	I	E			D								
											S		S	I	E	Q		V	N											
													V	S	G		M	Q												
												W	T	H		C	S													
												Y	G	R		T														
															K		A													
																	G													
																	C													
AS 526-538 81% Wahrscheinlichkeit											D	L	p	E	N	i	L	M	T	D	Q	E	I							

**Tabelle III.2: Identifizierung putativer Kalzium-Bindungsstellen in EIN2<sup>479-1294</sup>**

Es sind die Ergebnisse einer Muster-Suche nach kanonischen *EF-hand*-Motiven in der Sequenz von EIN2<sup>479-1294</sup> durch die Programme ProScan und PattinProt dargestellt. In der obersten Zeile sind die 28 Positionen der linearen Sequenz des Motivs dargestellt. In der Zeile darunter markiert ein Stern (\*) die Positionen, deren Konservierung zur Koordination von Kalzium essentiell notwendig sind. Ein Minuszeichen dagegen markiert eine Position, an der auf keinen Fall eine bestimmte Aminosäure stehen darf.

In den durch unterschiedliche Motivmuster ermittelten Sequenzabschnitten sind solche Positionen farbig unterlegt und mit Großbuchstaben gekennzeichnet, die diese Bedingungen erfüllen. Mit weiß unterlegt und mit Kleinbuchstaben versehenen Aminosäuren weisen auf die Abweichungen zu den Suchmotiven hin.

### III.7 Untersuchungen zur Bindung von Magnesium- und Manganionen an EIN2<sup>479-1294</sup>

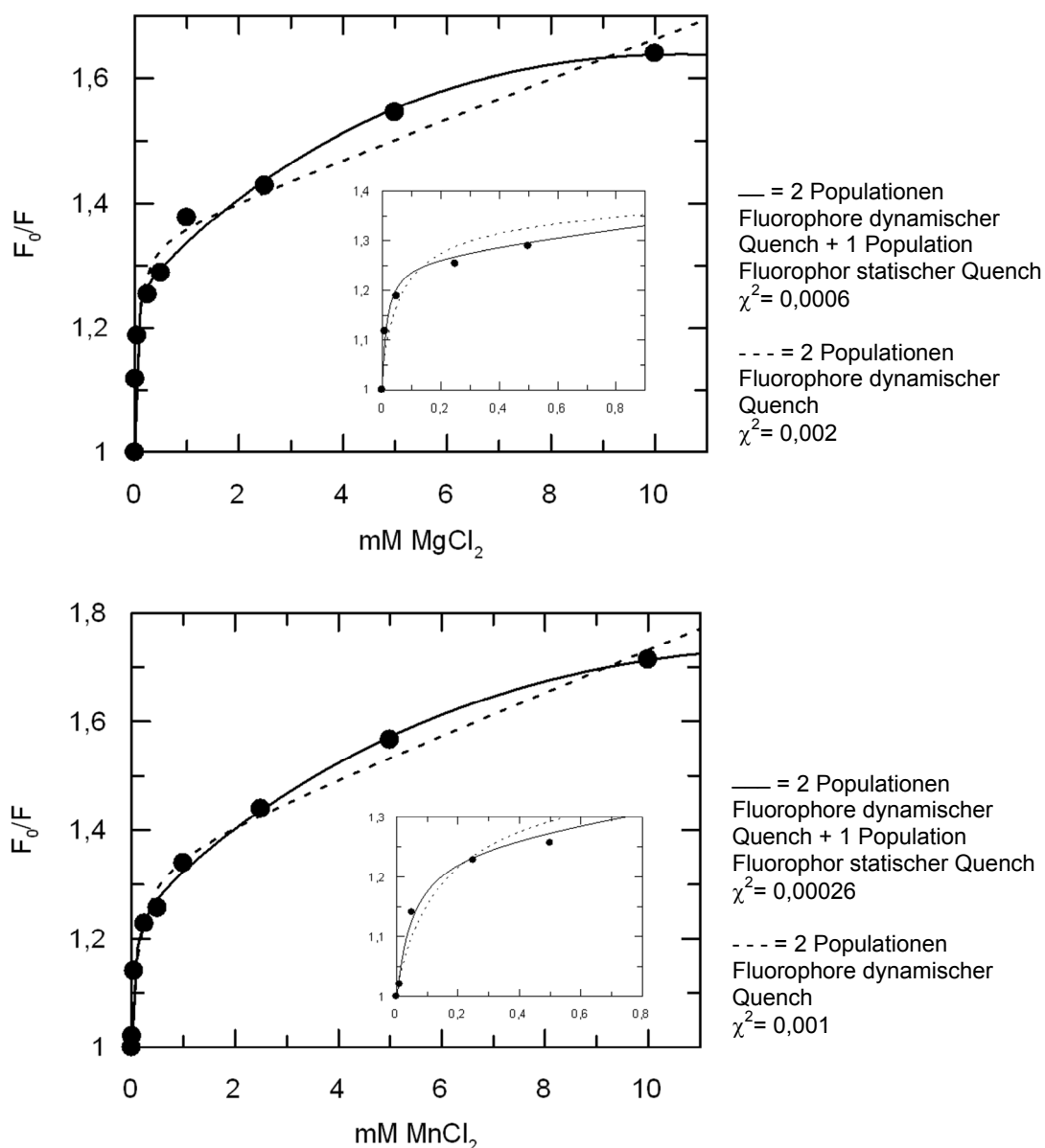
Neben der Bindung von Kalzium konnte für eine Vielzahl an *EF-hand*-Proteine auch eine Bindung von Magnesium gezeigt werden [76]. Die Bindung erfolgt dabei durch die Aminosäuren des *EF-hand*-Loop, die das Ion durch sechsfachen Koordination in einer Oktaeder-Anordnung binden. Im Gegensatz sind an der Koordination von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sieben Loop-Reste beteiligt, die eine pentagonale bipyramidale Anordnung bilden.

Da mit den vorangegangenen Versuchen sowohl Kalziumbindung gezeigt und *EF-hand*-Motive in EIN2<sup>479-1294</sup> identifiziert werden konnten, sollte untersucht werden, ob EIN2 ebenfalls zur Bindung von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen fähig ist. Zudem wurden aufgrund von Sequenzvergleichen Homologien des EIN2 Proteins zu Nramp Proteinen beschrieben. Diese Proteine sind als zweiwertige Metallionentransporter an der Homöostase der Zelle beteiligt. Besonders häufig finden sich in der Literatur Hinweise auf den Transport von Manganionen durch diese Proteine. Demzufolge wurde ergänzend die Bindung von Mangan an das Protein untersucht.

Die Versuche zur Bindung von  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen an EIN2<sup>479-1294</sup> wurden in Anlehnung an die fluoreszenzspektroskopischen Quenchingstudien mit Kalzium durchgeführt. Die Chloridsalze von Magnesium und Mangan wurden dem Protein schrittweise zugesetzt und die Emissionsspektren bei 295 nm aufgezeichnet. Bei Bindung der Ionen an EIN2 sollte die proteineigene Fluoreszenzintensität gequenchet werden und es sollte somit möglich sein, die Bindungsstärke zwischen Ligand und Protein bestimmt zu können.

Zunächst musste erneut geprüft werden, ob die zu beobachtenden Quenchereignisse nicht alleine auf kollisionale Stöße zwischen dem Protein und dem Quencher zurückzuführen sind, oder ob tatsächlich auch Bindungsereignisse zur Verminderung der Fluoreszenzintensität beitragen. Dazu wurden Regressionen an die im Stern-Volmer-Diagramm darstellten Beziehung  $F_0/F$  gegen die Ionenkonzentration mit den schon erwähnten Gleichungen für die verschiedenen Quenchereignisse durchgeführt. Diese sind in Abb. III-14 gezeigt. Die  $\chi^2$ -Werte der Kurvenanpassungen, die neben kollisionalen Löschereignissen zusätzlich auch statische Löschung an EIN2 zulassen (durchgängige Linien), beschreiben eine gute Anpassung der Messdaten an die

verwendete Gleichung und sind sowohl in der Magnesium- als auch in der Mangantitration 3 - 4 fach niedriger als diejenigen, die für die Regressionen bei rein kollisionalen Quenchereignisse (gestrichelte Linien) berechnet wurden (Die Ausschnittsvergrößerungen verdeutlichen noch einmal die optimale Regression bei Berücksichtigung auch statischer Quenchereignisse).

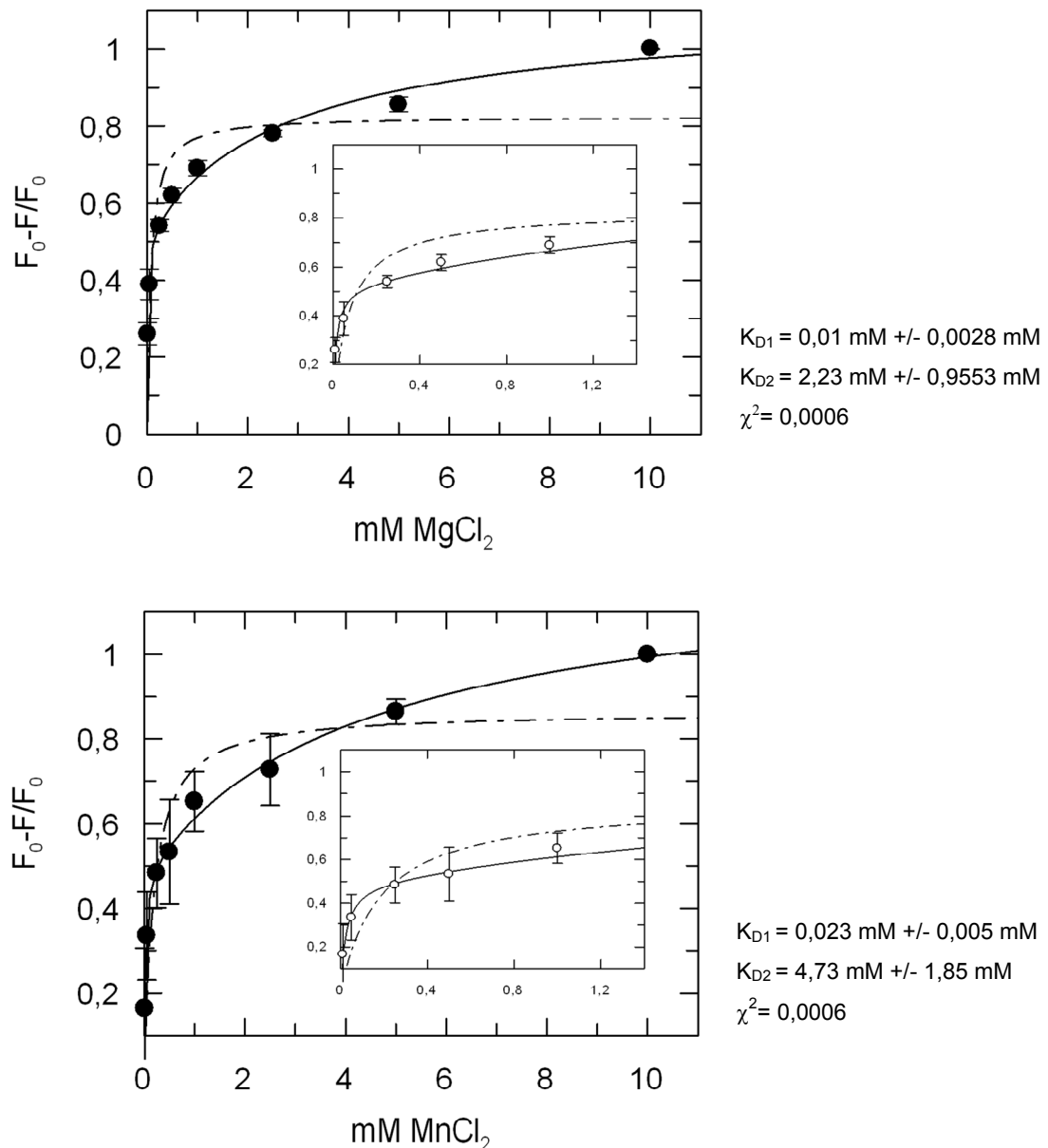


**Abb. III-14: Stern-Volmer – Diagramme der Fluoreszenzlöschung an EIN2<sup>479-1294</sup> bei Titration von Magnesium- und Manganionen.**

Die experimentellen Daten ließen sich am besten durch nicht-lineare Regression anpassen, wenn die verwendeten Gleichungen neben kollisionaler Fluoreszenzlöschung auch statische Ereignisse beinhalteten.

Diese Ergebnisse belegen, dass es bei Zusatz der Ionen tatsächlich zu einer Bindung von Magnesium- und Manganionen an EIN2<sup>479-1294</sup> kommt und sie bilden die

Grundlage dafür, um aus abgewandelten Stern-Volmer-Diagrammen Dissoziationskonstanten bestimmen zu können (Abb. III-15). Zur Bestimmung der Bindungsaffinität wurde der jeweils anteilige Quench ( $F_0-F/F_0$ ) gegen die Konzentration an  $Mg^{2+}$ - oder  $Mn^{2+}$ -Ionen aufgetragen, wobei der maximal beobachtbaren Intensitätslöschung der Wert 1 zugeordnet wurde.



**Abb. III-15: EIN2<sup>479-1294</sup> besitzt zwei Bindungsstellen für  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  mit unterschiedlichen Affinitäten**

Abgebildet sind die abgewandelten Stern-Volmer-Auftragungen der Fluoreszenzlöschung bei der Titration von  $MgCl_2$  und  $MnCl_2$  zu EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein.

— = Kurvenanpassung der experimentellen Daten unter Annahme von 2 Bindungsstellen

- - - = Kurvenanpassung der experimentellen Daten unter Annahme einer einzigen Bindungsstelle

Aus Abb. III-15 kann man entnehmen, dass die Kurvenverläufe durch die Regression „Ligandenbindung an zwei unabhängigen Bindungsstellen pro EIN2-Protein“ sowohl für die Magnesium- als auch für die Manganexperimente sehr genau beschrieben (durchgängige Linien) werden. Die  $\chi^2$ -Werte für beide Kurvenanpassungen lagen bei 0,0006 und waren somit etwa 25 fach kleiner als bei Verwendung einer Gleichung für nur eine unabhängige Bindungsstelle (gestrichelte Linien). Da für die Detektion hoch-affiner Bindungsstellen viele Messungen im niedrigen Konzentrationsbereich notwendig waren und gleichzeitig ein großer Bereich abgedeckt werden sollte, entzerren die Ausschnittvergrößerungen den Bereich der niedrigen Konzentration und verdeutlichen die optimal Anpassung durch eine Bindungskurve, die zwei Bindungsstellen berechnet.

Für die Bindung von  $Mg^{2+}$ -Ionen an EIN2 ergaben sich an den beiden Bindungsstellen die Dissoziationskonsten  $K_{D1} = 0,01$  mM und  $K_{D2} = 2,23$  mM. Somit besitzt Bindungsstelle 1 eine rund 200fach höhere Affinität zu Magnesium als Bindungsstelle 2, und ist für den steilen Anstieg der Bindungskurve verantwortlich. Auch für Mangan unterscheiden sich die ermittelten Dissoziationskonstanten an Bindestellen 1 und 2. Mit  $K_{D1} = 0,023$  mM liegt die Affinität für Bindungsstelle 1 ebenfalls rund 200 fach höher als für Bindungsstelle 2 ( $K_{D2} = 4,73$  mM).

### **III.7.1 Vergleich der Dissoziationskonstanten für die Bindung von verschiedene divalente Kationen an EIN<sup>479-1294</sup>**

Aus den Fluoreszenzlöschversuchen konnte die Affinität von EIN2<sup>479-1294</sup> zu den verschiedenen divalenten Kationen Kalzium, Magnesium und Mangan ermittelt werden. In Tabelle III-3 sind die Dissoziationskonstanten von EIN2<sup>479-1294</sup> an zwei verschiedenen Typen von Bindungsstellen noch einmal zusammengefasst und sollen an dieser Stelle miteinander verglichen werden.

Unter der Annahme, dass die drei verschiedenen Kationen an die gleichen Typen von Bindungsstellen im Protein gebunden werden, und die Daten somit verglichen werden können, kann man aus der Tabelle eine Präferenz des Proteins für die Bindung von Kalzium ableiten. Magnesiumionen werden weniger stark als Kalzium gebunden und die Bindung von Mangan erfolgt mit einer noch deutlich geringeren Affinität. Auffallend ist, dass die Unterschiede in der Affinität des hoch affinen Typs

von Bindungsstelle weniger stark ausgeprägt sind bei dem niedrig affinen Bindungsstellentyp. Die  $K_{D1}$ -Werte für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  unterscheiden sich hier nur unwesentlich, allerdings liegt der  $K_{D1}$ -Wert für die Bindung von  $\text{Mn}^{2+}$  dagegen 3 fach höher als für  $\text{Ca}^{2+}$ . Bei dem niedriger affinen Bindungsstellentyp gibt es jedoch deutliche Unterschiede in den Bindungsaffinitäten für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ . Hier wird Kalzium mit einem 2,5 fach besseren  $K_{D2}$ -Wert gebunden, der sich bei der Bindung von Mangan auf den Faktor 5,5 verschlechtert. Durch diese Analyse wurde gezeigt, dass von den untersuchten zweiwertigen Ionen Kalzium vorrangig vor Magnesium und dieses wiederum bevorzugt zu Mangan an EIN2<sup>479-1294</sup> gebunden wird.

Ligand	$K_{D1}$ [mM]	$K_{D2}$ [mM]
$\text{Ca}^{2+}$	0,0072	0,86
$\text{Mg}^{2+}$	0,010	2,23
$\text{Mn}^{2+}$	0,023	4,73

**Tab: III.3: Vergleich der Dissoziationskonstanten für die Bindung zweiwertiger Kationen an zwei verschiedenen Typen von Bindungsstellen in EIN2<sup>479-1294</sup>**

### **III.8 Untersuchungen zur Interaktion zwischen EIN2<sup>479-1294</sup> und dem Ethylenrezeptor ETR1**

Signaltransduktionswege erfordern häufig Protein-Protein-Interaktionen. Daher bilden die Rezeptoren mancher Signalkaskaden mit den signalweiterleitenden Partnern Proteinkomplexe aus. Für den Ethylensignalweg konnte die Bildung eines solchen signalgebenden Komplexes durch die direkte Interaktion des Ethylenrezeptors ETR1 mit dem in der Signalkaskade nachfolgenden Protein CTR1 an der ER-Membran gezeigt werden. Es wird postuliert, dass in diesem Proteinkomplex noch weitere, an der Signalweiterleitung des Ethylen beteiligte Proteine vorliegen. Voraussetzung für eine Beteiligung in diesem Proteinkomplex ist es, dass die am Komplex beteiligten Proteine miteinander interagieren können. Es sollte geprüft werden, ob EIN2 an den Ethylenrezeptor ETR1 binden kann. Durch die Lokalisation des Proteinkomplexes an der Membran des ERs sollte zudem die Kalziumabhängigkeit der Wechselwirkungen zwischen ETR1 und EIN2 untersucht werden.

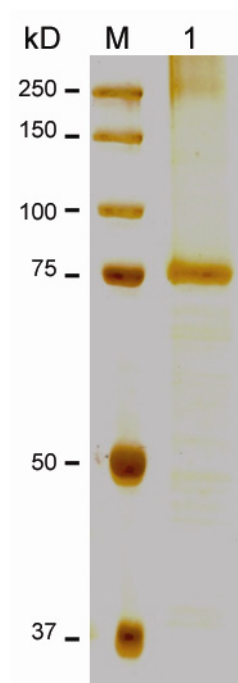
Durch das Vorliegen einer tryptophanfreien Variante des ETR1-Proteins konnten die Untersuchungen zur Bindung zwischen ETR1 und EIN2<sup>479-1294</sup> auch durch



Fluoreszenzversuche analysiert werden. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen mit EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein und dem Protein ETR1\_W<sub>total</sub> nach II.3.8 durchgeführt, die eine Wechselwirkung zwischen den Proteinen ETR1 und EIN2 detektieren sollten.

### **III.8.1.1 Präparation des ETR1 W<sub>total</sub>-Rezeptorproteins**

Für die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung wurde die tryptophanfreie Mutante des ETR1-Rezeptorproteins aus *A. thaliana* nach [105] gewonnen. Abbildung III-16 zeigt die gelelektrophoretische Analyse von gereinigtem ETR1\_W<sub>total</sub>-Protein.



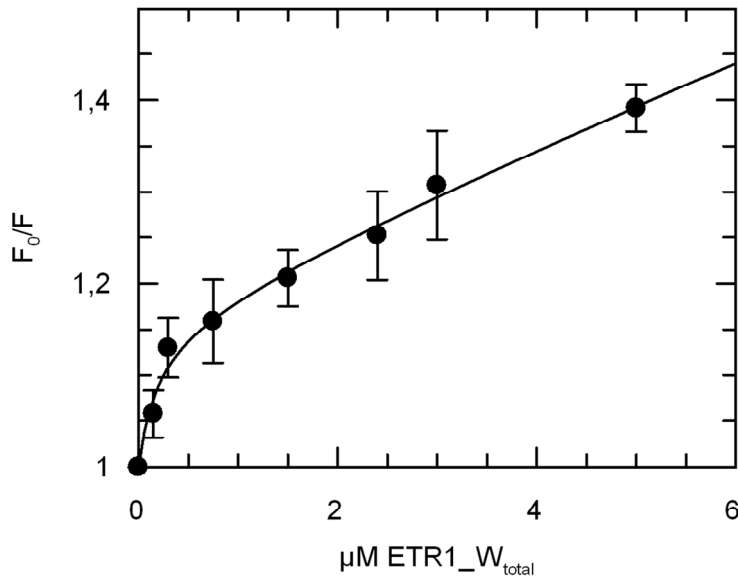
**Abb. III-136: Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel einer Probe des nach II.3.13 gereinigten und rückgefalteten Proteins ETR1\_W<sub>total</sub>.**

Die Bande in Spur 1 bei ca. 75 kD konnte dem ETR1-Rezeptorprotein zugeordnet werden. In Spur M war der Precision Plus Protein Dual Color Größenstandard (BioRAD, München) aufgetragen.

### **III.8.1.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Wechselwirkung von EIN2<sup>479-1294</sup> mit dem Ethylenrezeptor ETR1**

Bei der Analyse möglicher Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen wurde ETR1\_W<sub>total</sub> schrittweise zu einem EIN2-Fluoreszenzansatz titriert. Nach jedem Titrationsschritt wurden Emissionsspektren nach Anregung bei 295 nm aufgezeichnet und hinsichtlich ihrer Maxima analysiert. Diese lagen bei 348 nm und wurden dazu verwendet, die Stern-Volmer-Beziehungen ( $F_0/F$ ) zu bilden. Durch Auswertung der Daten im Stern-Volmer-Diagramm unter Anwendung nicht-linearer Regression an Gleichungen, die statisches, dynamisches und kombiniertes Quenching

berücksichtigen, konnte die Art der Interaktionen zwischen den beiden Proteinen bestimmt werden. Diese Messungen wurden unter Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  durchgeführt. Abbildung III-17 zeigt das Stern-Volmer-Diagramm der Titrationsversuche mit ETR1\_W<sub>total</sub>-Protein zu EIN2<sup>479-1294</sup>.

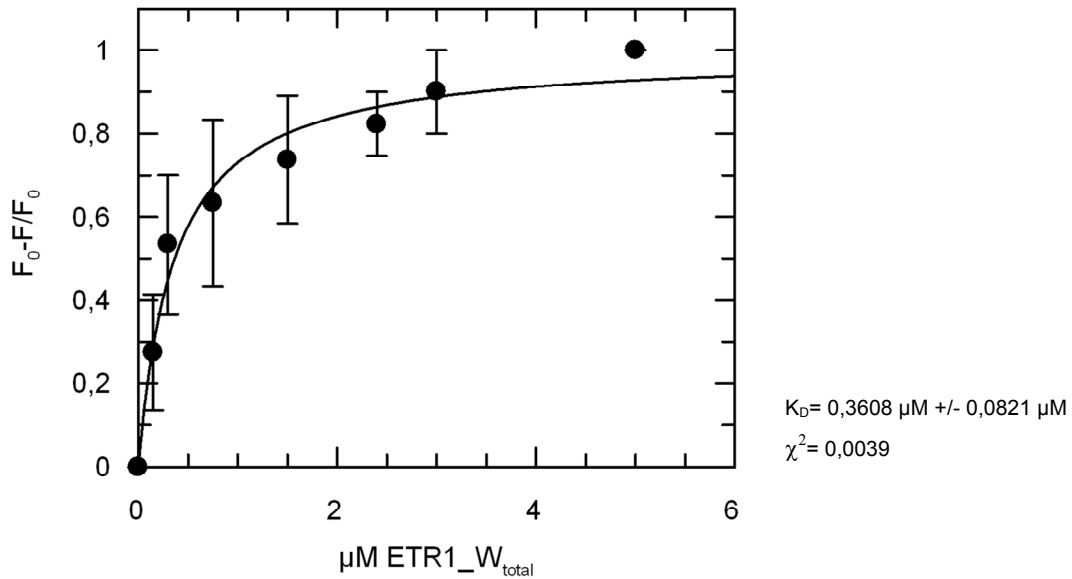


**Abb. III-17: Stern-Volmer-Diagramm der Fluoreszenzlöschung an EIN2<sup>479-1294</sup> bei der Titration von ETR1\_W<sub>total</sub> unter Zusatz von  $\text{CaCl}_2$ .**

Es wurde eine nicht-lineare Regression mittels einer Gleichung durchgeführt, die zusätzlich zu dynamischem Quenching an zwei verschiedenen Fluorophorpopulationen auch statische Quenchereignisse an einer Klasse von Fluorophoren berücksichtigte

Die Daten wurden am besten durch eine Regression beschrieben, die neben kollisionalem Quench an beiden Tryptophanklassen auch statische Quenchereignisse an einer Klasse vorgab ( $\chi^2 = 0,00035$ ). Die Regression unter Annahme rein kollisionaler Quenchereignisse lieferte einen dreifach höheren  $\chi^2$ -Wert und war aus diesem Grund statistisch weniger signifikant.

Die Identifizierung von statischen Quenchereignissen war ein Beleg dafür, dass zwischen den Proteinen EIN2<sup>479-1294</sup> und ETR1 ein Bindungsereignis stattgefunden hatte. Die Affinität von EIN2 bei der Bindung von ETR1 konnte in einem modifizierten Stern-Volmer-Diagramm (Abb. III-18) ermittelt werden. Dazu wurde die Beziehung  $(F_0 - F)/F_0$  gegen die Menge aufgetragen, die an ETR1 zutitriert wurde. Aus den Datenpunkten konnte im Auswerteprogramm Grafit [106] der  $K_D$ -Wert der Bindung zwischen ETR1\_W<sub>total</sub> und EIN2<sup>479-1294</sup> mittels einer Fit-Routine zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten ermittelt werden.



**Abb. III-18: Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die Bindung von ETR1\_W<sub>total</sub> an EIN2<sup>479-1294</sup>.**

Die beste nicht-lineare Regression ergab sich unter Verwendung einer Gleichung, die eine Bindestelle für den Ethylenrezeptor in EIN2 annimmt.

Die beste Kurvenanpassung wurde bei Verwendung einer Gleichung erzielt, die die Ligandenbindung an eine Bindungsstelle beschreibt. Der  $\chi^2$ -Wert lag für diese Regression bei 0,0039, was eine recht gute Annäherung der Daten an die vorgegebene Gleichung darstellt. Der berechnete  $K_D$ -Wert ist mit einer vertretbaren Abweichung versehen und kann somit als aussagekräftig gelten. Somit konnte gezeigt werden, dass es unter den getesteten Versuchsbedingungen zu Bindungsereignissen zwischen der carboxyterminalen Domäne des EIN2-Proteins und ETR1 kommt.

## **IV. DISKUSSION**

Die Regulation von Entwicklungsprozessen in Pflanzen durch Phytohormone sowie deren Beteiligung an der Antwort auf eine Vielzahl von Umweltreizen stellt ein Feld intensiver Forschung dar. Für das Phytohormon Ethylen sind die am besten charakterisierten Proteine des Signaltransduktionswegs die Ethylenrezeptoren sowie die an der Ethylenantwort beteiligten Transkriptionsfaktoren. Während weitere Komponenten des Signalwegs überwiegend molekularbiologisch und in genetischen Ansätzen untersucht wurden, liegen für die Ethylenrezeptoren bereits biochemische Untersuchungen vor. In den letzten Jahren konnten große Fortschritte in Untersuchungen zur Signalwahrnehmung des Ethylens durch die Rezeptorproteine gemacht werden, doch der Mechanismus der Signalweitergabe vom Rezeptor bis hin zu den ausführenden, im Kern lokalisierten Transkriptionsfaktoren, die das Signal in eine spezifische Zellantwort umsetzen, ist bislang noch wenig verstanden. Es fehlen biochemische Untersuchungen auf Proteinebene, die zur Aufklärung dieses Signaltransduktionswegs beitragen können. Die Reinigung der am Ethylensignalweg beteiligten Proteine ist die Voraussetzung dafür, diese Untersuchungen durchführen zu können. Da es sich bei dem Protein EIN2 ebenso wie bei den Ethylenrezeptorproteinen um Membranproteine handelt, stellt bereits die Expression dieser Proteine eine große Herausforderung dar.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, erste funktionelle Untersuchungen an dem carboxyterminalen Bereich des Proteins EIN2 durchzuführen, welches eine zentrale Komponente des Ethylensignaltransduktionswegs darstellt.

Da bislang weder die Funktion von EIN2 nachgewiesen werden konnte, noch biochemische Untersuchungen am EIN2 Proteins durchgeführt worden sind, können die bisherigen Ergebnisse zu EIN2 nur in einem gewissen Umfang als Diskussionsgrundlage dienen. Daher wurden die Ergebnisse zunächst unabhängig von der Rolle betrachtet, die sich aus den Ergebnissen für dieses Protein in der Ethylensignaltransduktion ergeben. In einer abschließenden Bewertung sollen dann die Möglichkeiten diskutiert werden, wie aus den Ergebnissen auf eine Beteiligung und Funktion von EIN2 am Signaltransduktionsweg geschlossen werden kann.

## IV.1 Expression und Proteinreinigung

### IV.1.1 Vorteile eines prokaryontischen Expressionssystems

Die Expression von Membranproteinen und ihre anschließende Reinigung führt in den meisten Fällen nur zu geringen Proteinausbeuten. Da das ein2-Gen nur in einer einzelnen Kopie im Genom von *A. thaliana* vorliegt und die Stärke des vorgeschalteten Promotors unbekannt war, wurde eine rekombinante Expression angestrebt. So sollte verhindert werden, dass die Proteinausbeute der Reinigung nicht bereits durch ein möglicherweise geringes Expressionslevel der Pflanze limitiert wurde. Für die rekombinante EIN2-Expression wurden mit *E. coli* und *L. lactis* zwei prokaryontische Expressionssysteme ausgewählt. Das umfangreiche Wissen um die Genetik, die Physiologie und das Genom dieser Prokaryonten vereinfachte die Klonierung der Zielgene und die Kultivierung der Zellen. Einfache und preiswerten Anzuchtmedien, eine schnelle Wachstumsrate zu hohen Zelldichten und Proteingehalte von bis zu 30 % rekombinantem Protein am Gesamtproteingehalt in *E. coli* sind weitere Vorteile, die dieses Expressionssystem besonders geeignet erscheinen lassen. Da Bakterien keine post-translationalen Modifikationen an Proteinen einführen, sollte das rekombinante Protein zudem äußerst homogen sein [108]. Ein weiterer Vorteil der Expression in *E. coli* war die Vielzahl kommerziell erhältlicher Expressionsvektoren, die die anschließende Reinigung des Zielproteins durch fusionierte Affinitätsanker erleichtern können.

Generell stellt die Expression von Membranproteinen im Vergleich zur Expression löslicher Proteine eine größere Herausforderung dar. Dabei korreliert die Zunahme an Transmembransegmenten mit den erhöhten Schwierigkeiten bei der Expression, die häufig auf die Toxizität des rekombinanten Membranproteins zurückzuführen ist. Durch die ausgeprägt hydrophoben Bereiche und die Probleme beim Einbau eukaryontischer Proteine in die bakteriellen Membranen führt die Expression von Membranproteinen in *E. coli* häufig zur Bildung von *Inclusion Bodies*, deren Entwicklung manchmal durch Absenken der Anzuchttemperatur oder der Induktionsstärke gemindert werden kann [110, 111]. Eine Proteinreinigung aus *Inclusion Bodies* ist zwar möglich, jedoch müssen zur Solubilisation häufig denaturierende Bedingungen gewählt werden, so dass nur wenige Beispiele für Membranproteine bekannt sind, die nach einer Rückfaltung auch unverändert Aktivität besitzen [112,113].

Eine weitere Möglichkeit, um das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Membraneinbau zu verbessern, gelang Miroux und Walker [89]. Durch Selektion von *E. coli*-Zellen,

die eine erhöhte Effizienz bei der Expression von toxischen Proteinen besitzen, wurden die Stämme C41(DE3) und C43(DE3) gezüchtet, die ein zusätzliches intrazelluläres Membransystem ausbilden. Verschiedene Cytochrom P450-Isoformen und die ADP/ATP-Transporter 1 und 2 (alle aus *A. thaliana*) konnten als Beispiele für Membranproteine mit einer Vielzahl an Membrandurchgängen erfolgreich in diesen Stämmen exprimiert werden [114-116].

Das geringe Expressionsniveau heterolog exprimierter Proteine kann auch durch den *Codon bias* zwischen verschiedenen Organismen verursacht werden. Die unzureichende Anzahl an tRNAs für selten genutzte Codons kann zur Unterbrechung der Translation führen, die Translation frühzeitig beenden, oder den nicht korrekten Einbau von Aminosäuren sowie translationale Leserasterverschiebungen verursachen [117,118]. Die Kotransformation spezieller Plasmide (bspw. pRARE, Novagen, Darmstadt), die während der Expression des Zielproteins die Synthese der tRNAs für seltene Codons veranlassen, können zum Teil den *Codon bias* kompensieren. Die Lokalisation der seltenen Codons im Gen besitzt allerdings eine zentrale Bedeutung und führt zu den größten Auswirkungen, wenn mehrere solcher Codons hintereinander folgen oder sie am NH<sub>2</sub>-Terminus einer codierenden Sequenz liegen [119].

Die Verwendung von *L. lactis* zur Überexpression heterologer Proteine ist bislang noch nicht weit verbreitet, obwohl eine Vielzahl an unterschiedlichen Plasmiden für die Klonierung zur Verfügung steht. Der Vorteil dieses Expressionssystems gegenüber *E. coli* liegt in der geringen proteolytischen Aktivität dieses gram-positiven Bakteriums. Zudem wurde bislang keine Bildung von Proteinaggregaten in *Inclusion Bodies* beobachtet. Da es sich um ein relativ neues Expressionssystem handelt, stehen noch nicht viele Daten über die Nutzung von *L. lactis* bei der Synthese von Membranproteinen zur Verfügung. Kunji und Kollegen [120] gelang mit dem KDEL-Transporter aber die erfolgreiche Expression eines eukaryontischen Membranproteins.

#### **IV.1.2 *Codon Bias* der Expressionssysteme**

Um das vollständige Protein EIN2 (EIN2<sup>1-1294</sup>) heterolog zu exprimieren, wurden mit *E. coli* und *L. lactis* zwei unterschiedliche prokaryontische Expressionssysteme getestet. In vielfältigen Ansätzen wurden Expressionsbedingungen variiert und miteinander kombiniert, von denen ein positiver Einfluss auf die Expression heterologer Proteine bekannt war. Die Synthese von EIN2<sup>1-1294</sup> konnte unter der Verwendung verschiedener Zellen als Wirts-

organismus weder durch Anpassung der Temperaturbedingungen oder der Induktionsstärke, noch durch die Kooexpression seltener tRNAs nachgewiesen werden (vgl. Abb. III-2).

Der häufig zu beobachtende toxische Effekt auf das Zellwachstum bei der heterologen Expression in *E. coli* konnte bei der Expression von EIN2<sup>1-1294</sup> ausgeschlossen werden, da induzierte und nicht-induzierte Kulturen ein vergleichbares Zellwachstum aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Der Bildung von *Inclusion Bodies* wurde durch die Verwendung von C41(DE3) und C43(DE3)-Zellen entgegen gewirkt und es konnte keine Aggregation von Proteinen auf SDS-Gelen oder im Western Blot nachgewiesen werden.

Die Löslichkeit des exprimierten Proteins konnte durch Einführung eines Intein-Ankers im Vektorkonstrukt pTYB12\_EIN2<sup>1-1294</sup> entgegen eines Literaturverweises nicht positiv für die Expression von EIN2<sup>1-1294</sup> genutzt werden [121]. In der gelelektrophoretischen Analyse der Expression des Intein-EIN2<sup>1-1294</sup>-Fusionsprotein in Abb. III-2 (B) wurde ein erhöhtes Expressionsniveau zwischen 55 und 60 kDa großes Protein festgestellt. Aufgrund des viel zu geringen Molekulargewichts konnte die Identität dieses Protein als EIN2-Intein-Fusion aber ausgeschlossen werden. Vielmehr musste davon ausgegangen werden, dass es sich ausschließlich um das im Fusionsprotein N-terminal gelegene Intein handelt, dessen Größe in der Produktbeschreibung des Vektors mit 55 kDa angegeben ist. Diese Vermutung wurde im Western Blot durch die Identifizierung der Proteinbande mit dem gegen die chitinbindene Domäne gerichteten Antikörper bestätigt. Das Molekulargewicht der im Western Blot identifizierten Bande entspricht der erwarteten Größe von 55 kD für das Inteinfragment. Trotz zahlreicher Ansätze zur Verbesserung der Expression von EIN2 in *E. coli* konnte das Volllängenprotein unter den getesteten Bedingungen nicht synthetisiert werden.

Auch für den *L. lactis*-Stamm NZ9000 konnten keine Bedingungen identifiziert werden, unter denen EIN2<sup>1-1294</sup> exprimiert wurde (vgl. Abb. III-2, C). Da bislang in *L. lactis* ein Expressionsniveau für eukaryontische Membranproteine von maximal 5 % am Gesamtanteil aller Membranproteine des Bakteriums erreicht wurde [120] war neben der in Abbildung III-2, C gezeigten gelelektrophoretischen Analyse einer Membranvesikelpräparation der Nachweis über einen Western Blot zwingend erforderlich. Auch hier konnte EIN2<sup>1-1294</sup> nicht nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Die wahrscheinlichsten Ursachen für die fehlgeschlagene Expression des EIN2-Proteins in den beiden Prokaryonten *E. coli* und *L. lactis* sind zum einen die erschwerte Expression der zwölf Transmembranhelices und die damit verbundene Integration in die bakteriellen Membranen und zum anderen der *Codon Bias* der beiden prokaryontischen Organismen zum Genom von *A. thaliana*.

Im Gegensatz zu *E. coli* weist *L. lactis* zwar ebenso wie *A. thaliana* einen GC-Gehalt von 36 % im Genom auf, doch werden bestimmte Codons in *L. lactis* seltener genutzt als in *A. thaliana*. Auch zwischen den beiden Prokaryonten *E. coli* und *L. lactis* liegt ein Unterschied in der Codon-Nutzung von 26,5%. In den Hexahistidin-Konstrukten zur Expression in *E. coli* werden die ersten 20 Codons durch die Plasmidsequenz für den Affinitätsanker und die Verbindungssequenzen gebildet. Die dabei verwendeten Codons sind optimal an die Nutzung in *E. coli* angepasst. Wertet man dagegen die DNA-Sequenz von EIN2<sup>1-1294</sup> in Hinblick auf den *Codon Bias* zwischen *A. thaliana* und *E. coli* aus, liegen innerhalb der ersten 20 Aminosäuren neun in *E. coli* selten verwendete Codons.

Das Konstrukt zur Expression von EIN2 als Intein fusionsprotein ist mit dem N-terminal gelegenen Affinitätsanker ähnlich aufgebaut wie wie das mit Hexahistidinanker ausgestattete Konstrukt. Daher ist für die Nutzung der Codons das gleiche Ergebnis zu erwarten. In beiden Fällen sind die Affinitätsankersequenzen optimal an die *Codon Usage* in *E. coli* angepasst. Die sich anschließende Sequenz von EIN2<sup>1-1294</sup> ist mit 45 % selten genutzter Codons innerhalb der ersten 20 Aminosäuren dagegen schlecht für die Expression in *E. coli* geeignet. Die Ergebnisse der Expression des Intein-EIN2-Fusionsprotein (dargestellt in Abb. III-2, B) verdeutlichen, dass die dem Intein nachfolgende Sequenz des aus *A. thaliana* stammenden Gens zum Abbruch der Translation führt. Das in SDS-PAGE identifizierte Protein entspricht mit einer Größe von 55 bis 60 kDa dem erwarteten Molekulargewicht des Inteins. Auch für das Hexahistidin-Konstrukt wurde ein Abbruch der Translation nach dem N-terminalen Affinitätsanker erwartet, jedoch war die Größe des Expressionsprodukts mit 3,5 kDa auf den verwendeten SDS-Gelen nicht zu detektieren.

Für die Expression in *L. lactis* wurde ein Plasmid verwendet, das auf Grundlage des *E. coli* Plasmids konstruiert wurde. Der Bereich zwischen RBS und Gen wurden durch Restriktionsverdau zusätzlich zu der Gensequenz aus dem *E. coli*-Plasmid herausgeschnitten und in den *L. lactis* Vektor kloniert, so dass in diesem Fall ein *Codon Bias* nicht nur zwischen *L. lactis* und *A. thaliana*, sondern auch noch zwischen *L. lactis* und *E. coli*, Einfluß auf die Expression hatte. Die ersten 20 Codons nach Translationsbeginn stammen in diesem Konstrukt aus dem *E. coli*-Plasmid und beinhalten den N-terminalen Hexahistidinanker und die ihn umgebende Sequenz. 50 Prozent der darin verwendeten Codons werden in *L. lactis* selten genutzt. Besonders negativ wirkt sich hier die Häufung von acht hintereinander gelegenen Codons mit seltener Nutzung in *L. lactis* aus. Auch in der sich an diesen Bereich anschließenden Gensequenz für das EIN2-Protein aus *A. thaliana* werden 40 % der in den ersten 20 Aminosäuren verwendeten Codons nur selten in *L. lactis* genutzt. Im Gegensatz zur



Expression in *E. coli* stand für dieses Expressionssystem kein Vektor zur Verfügung, der den *Codon Bias* kompensieren könnte.

### **IV.1.3 Expression der C-terminalen Domäne von EIN2 in *E. coli***

Für Expressionsstudien zur putativen membranextrinsischen Domäne des EIN2-Proteins (EIN2<sup>479-1294</sup>) mit einem Molekulargewicht von 94 kDa wurden die *E. coli*-Stämme BL21(DE3), C41(DE3), C43(DE3), ER2566 und Rosetta-gami eingesetzt. Das Ergebnis der Kultivierung bei 30°C zeigte, dass in allen *E. coli*-Stämmen ein Protein mit einem Molekulargewicht von ~ 100 kDa gebildet wurde, wenn gleichzeitig das Plasmid pRARE exprimiert wurde. Bei Verwendung der Zellen ER2566 war die Proteinausbeute maximal (vgl. Abb. III-4). Dieses Protein konnte in einer Western Blot Analyse gegen den Hexahistidinanker als EIN2-Protein identifiziert werden.

Die erfolgreiche Expression einer Proteindomäne des Zielproteins machte deutlich, dass die unterschiedliche Codonnutzung zwischen dem pflanzlichen und bakteriellen Organismen nicht grundsätzlich für die fehlgeschlagene Expression des Gesamtproteins verantwortlich gemacht werden konnte. Ebenso wie in dem Konstrukt mit Hexahistidinanker für die Expression in *E. coli* waren die ersten 20 Codons nach dem Translationsstart plasmidspezifisch und daher an die Codonnutzung in *E. coli* angepasst. Für die ersten 20 Aminosäuren des Zielgens wurden nur 5 Codons verwendet, die in *E. coli* selten genutzt werden. Daher lag die Vermutung nahe, dass die Verteilung seltener Codons in der hydrophoben Domäne des EIN2-Proteins für den Misserfolg bei der Expression des Vollängen-Proteins verantwortlich sein könnten [119,122].

### **IV.1.4 Reinigung der C-terminalen Domäne von EIN2**

Es wurde ein natives Reinigungsprotokoll entwickelt, bei dem über IMAC-Affinitätschromatographie 1,5 mg reines EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein aus 10 g Bakterienpellet isoliert werden konnte.

Obwohl eine differentielle Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellen zeigte, dass ein bedeutender Anteil (~50 %) am exprimierten EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein als *Inclusion Bodies* angefallen war, wurde eine Reinigungsstrategie für den putativ membranextrinsischen Anteil am rekombinanten Protein entwickelt. Durch Bindung von EIN2<sup>479-1294</sup> an die Affinitätsmatrix konnte das Protein von den restlichen *E. coli*-Proteinen abgetrennt werden und mit Hilfe eines Imidazolgradientens eluiert werden (vgl. Abb. III-5).

Proteine können nur dann funktionell aktiv sein, wenn sie eine native Konformation einnehmen. Diese ist daher eine wichtige Voraussetzung für funktionelle Untersuchungen an Proteinen und stellt ein Kriterium für die Qualität der Expression und der Reinigung eines Proteins dar. Besonders bei der heterologen Expression von Fusionsproteinen können die physiologischen Bedingungen des Wirtsorganismus oder die zusätzlichen Sequenzen von großen Affinitätsankern dazu führen, dass die Ausbildung der normalen Faltungsdomänen für das Einnehmen einer natives Konformation des Proteins gestört wird.

Zu Beginn des Faltungsprozess eines Proteins bilden sich auf Grundlage der Aminosäuresequenz  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter aus [123]. Durch sie werden wichtige Faltungsmotive und Kontaktflächen erzeugt, deren thermodynamisch günstigste Anordnungen der nativen Tertiärstruktur entsprechen. Die CD-Spektroskopie ist eine Methode, mit der die Faltung der Tertiärstruktur eines Proteins indirekt über die Ausprägung von Sekundärstrukturelementen beurteilt wird, die als ein Indiz auf das Vorliegen einer nativen Proteinfaltung gewertet werden.

Die CD-spektroskopische Analyse von gereinigtem EIN2<sup>479-1294</sup> ist in Abb. III-7 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass das gereinigte EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein definierte Sekundärstrukturen besitzt. Dabei weist das gemessene Spektrum deutliche Charakteristika eines  $\alpha$ -helikal dominierten Proteins auf, dass zusätzlich von  $\beta$ -Faltblattstrukturen beeinflusst wird. Das durch die Präparation gereinigte Protein zeigte daher Merkmale für eine native Struktur und ist somit für den Einsatz in funktionellen Untersuchungen geeignet. Die Western Blot Analyse identifizierte das gereinigte Protein als EIN2<sup>479-1294</sup> (Abb. III-6).

Der starke  $\alpha$ -helikale Anteil an der Sekundärstruktur von EIN2<sup>479-1294</sup> wurde durch die zwei dominierenden Minima im Spektrum deutlich und konnte durch die Programme zur Berechnung von Sekundärstrukturanteile mit fast 40%  $\alpha$ -Helixanteil bestätigt werden. Das Minimum bei 221 nm weicht nur geringfügig von dem für rein  $\alpha$ -helikale Proteine erwarteten Minimum von 222 nm ab. Allerdings ist das zweite Minimum bei 205 nm gegenüber der Erwartung für  $\alpha$ -helikaler Peptide leicht zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Dies kann ein Hinweis auf einen ausgeprägten Anteil an *random coil*-Bereichen im Protein sein, da diese im CD-Spektrum ein Minimum bei 190 nm zeigen. Aus dem Spektrum wurde ein Anteil von rund 30 % *random coil* an der Sekundärstruktur von EIN2<sup>479-1294</sup> berechnet. Dies ist für Proteine mit gemischten Sekundärstrukturen ein üblicher Wert, der sich nicht auf aufgefaltete, also denaturierte Bereiche in der Sekundärstruktur bezieht, sondern auf flexible Bereiche oder solche, die zu kurz sind, um definierte Helix-, Faltblatt- oder Schlaufenmotive auszubilden.

Die Betonung des zweiten Minimums bei 205 nm korreliert mit dem errechneten Anteil von 10-13 % an  $\beta$ -Faltblattstrukturen in EIN2<sup>479-1294</sup>.

Die Einteilung in Sekundärstrukturelemente durch die Auswerteprogramme stellt eine starke Vereinfachung des tatsächlichen Sachverhalts dar. Je nach Programm basieren die Auswertelgorithmen auf anderen Proteindatensätzen, so dass sich je nach Auswertungsmethode die Anteile für Sekundärstrukturen unterscheiden können. Zudem tragen Unregelmäßigkeiten innerhalb  $\beta$ -Faltblätter, verschiedene Formen von  $\beta$ -Schleifen oder variierende Längen der Sekundärstrukturelemente zu Abweichungen von dem der Analyse zugrunde liegenden Datensatz bei. Daher kann die Auswertung der Sekundärstrukturanteile nur als Annäherung an die tatsächlichen Anteile gesehen werden. Ohne vorliegende Daten zu homologen Proteinen, konnte die Qualität der CD-spektroskopischen Messungen nur über den Vergleich mit bioinformatischen Sekundärstrukturvorhersagen bestimmt werden. Aus der Aminosäuresequenz von EIN2<sup>479-1294</sup> wurde in Analysen mit drei verschiedenen Auswertelgorithmen des Programmpakets *Network Protein Sequence Analysis* (NPS) ein  $\alpha$ -Helix-Gehalt zwischen 32 % und 38 %, sowie ein Faltblattanteil zwischen 8 % und 14 % ermittelt (SOPMA, GOR IV und HNN, [123]). Mit kleinen Abweichungen entsprachen die aus den Spektren berechneten Sekundärstrukturanteile also den Erwartungen der theoretischen Berechnung.

## **IV.2 Untersuchungen zur Funktion von EIN2**

### **IV.2.1 Die Funktion von EIN2 bleibt auf der Grundlage physiologischer Effekte in der Pflanze unverstanden**

Aufgrund eines fehlenden Expressionsprotokolls für EIN2 wurden bislang hauptsächlich molekulargenetische Ansätze verfolgt, um die Aufgabe dieses Proteins im Ethylensignalweg zu verstehen. Bereits 1990 konnte durch den extrem ethylen-insensitiven Phänotypen von ein2-mutanten *Arabidopsis*-Pflanzen die Beteiligung des Proteins an der Ethylensignalkaskade nachgewiesen werden [8]. Fortführende genetische und molekularbiologische Untersuchungen konnten dem Protein eine Beteiligung an der Pflanzenantwort auf Pathogen- und Schädlingsbefall zuweisen [123], die heute auf die EIN2-vermittelte Induktion des Proteins basische Chitinase und dem *Harein-like PR4-Gen* zurückgeführt werden konnte [124]. Zudem konnte gezeigt werden, dass EIN2 in der Vermittlung der Pflanzenantwort auf abiotischen Stress im Zusammenspiel mit den Signaltransduktionswegen der anderen Phytohormone eine

zentrale Position einnimmt, und so das Pflanzenwachstum und entwicklungsbedingte Vorgänge auf Stresssignale hin anpasst [37]. Die synergistischen und antagonistischen Wirkungen zwischen den verschiedenen Phytohormonwegen von Ethylen und Abscisinsäure lassen erkennen, welches komplexes und reguliertes Netzwerk die Phytohormone in der pflanzlichen Entwicklung bilden. Ein Beispiel für ein solches Netzwerk sind die hemmenden und fördernden Wirkungen von Ethylen und Abscisinsäure bei der Samenkeimung und dem Wurzelwachstum des Keimlings in *A. thaliana*. Ethylen fördert die Samenkeimung, indem es die Sensitivität des Samens gegenüber Abscisinsäure erniedrigt und hat antagonistisch auf den Effekt von Abscisinsäure wirkt. In der Wurzel des Keimlings üben beide Phytohormone dagegen einen synergistischen Effekt auf deren Wachstum aus. Für beide Effekte wird die Beteiligung von EIN2 diskutiert [128,129]. Trotz dieser zentralen Rolle, die EIN2 im Ethylen-signalweg einnimmt, ist es bislang nicht gelungen, dieses Protein zu charakterisieren und diesen dunklen Fleck des Ethylen-signalwegs zu erhellen.

Eine Datenbankanalyse zur Ermittlung homologer Sequenzen, die Informationen zu einer potentiellen Funktion von EIN2 liefern sollte, ergab keine ausgesprochene Homologie zu bekannten Proteinen. Die in dieser Analyse ermittelte Ähnlichkeit der NH<sub>2</sub>-terminalen, hydrophoben Domäne von EIN2 zu den als Metallionentransporter bekannten Nramp-Proteinen führte zwar zur Postulierung einer Metallionentransportaktivität für EIN2, die jedoch bei heterologer Expression in verschiedenen Systemen nicht nachgewiesen werden konnte [37].

Die ausgeprägt dimorphe Struktur von EIN2 spiegelt sich in den physiologischen Auswirkungen wider, die durch verkürzte EIN2-Proteinfragmente beobachtet wurden. Während der löslichen carboxyterminalen Domäne eine Funktion bei der Signalweiterleitung zugeordnet werden konnte, wurde dem ausgesprochen hydrophoben NH<sub>2</sub>-Terminus eine Beteiligung an der Regulation der Signalweiterleitung nachgewiesen [37]. Somit konnte EIN2 ebenso wie den Glukosesensoren SNF3 und RGT2 aus Hefe eine Struktur-Funktions-Beziehung zugewiesen werden, die zu der Hypothese führte, dass EIN2 weniger am Transport von Metallionen als vielmehr als Sensor an der Feststellung der Ionenverfügbarkeit für solche Ionen beteiligt sein könnte. In dieses Bild passt die Identifizierung einer Coiled-Coil-Helix im C-Terminus von EIN2, die einen Hinweis darauf gab, dass diese Domäne ebenso wie die Glukosesensoren an der Weiterleitung eines Signals durch Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sein könnte.

In neueren Veröffentlichungen gibt es unterschiedliche Hypothesen über die Aufgabe des EIN2-Proteins im Ethylen-signalweg. Chen et al [127] postulierten aufgrund der Ähnlichkeit

von EIN2 zu den Nramp-Ionentransportern eine Beteiligung des Proteins an der Anpassung von Ionenkonzentrationen in der Zelle. Eine andere Untersuchung, die die Stabilität des EIN3-Proteins analysierte, kam zu der Auffassung, dass die putative Aufgabe von EIN2 in der Regulation der Ethylenantwort liegen könnte, indem das Protein die Stärke der Ethylenantwort posttranskriptionell durch die Degradation des EIN3 Proteins beeinflusst [130]. Wie diese Regulation mechanistisch erfolgt, konnte bislang nicht gezeigt werden.

#### ***IV.2.1.1 Spielt Kalzium eine Rolle in der EIN2-vermittelte Ethylenantwort?***

In Pflanzen sind Kalziumionen intrazelluläre Botenstoffe, die in einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen vorkommen. Die Beteiligung am Phytohormonweg von Abscisinsäure konnte nachgewiesen werden [131] und wird für den Ethylensignalweg diskutiert. Neben der Regulation der ethylen-vermittelten Pathogenabwehr [62] durch Kalzium belegen pharmakologische Untersuchungen die Beteiligung von Kalzium an der Ethylenantwort. Es konnte gezeigt werden, dass der Einstrom von Kalzium in die Zelle für die Induktion der Ethylensynthese essentiell ist, und durch Kalziumkanalblocker dosisabhängig inhibiert werden kann [61]. Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von Kalzium am Ethylensignalweg gab die Lokalisation der an der Ethylensignaltransduktion beteiligten Proteine ETR1 und CTR1 an der Membran des ER [16,26], das einen der zellulären Kalziumpools darstellt. Daher ist die Beteiligung dieses Ions am Ethylensignalweg eine nahe liegende Annahme. Ob sich  $\text{Ca}^{2+}$  im Ethylensignalweg aber tatsächlich wie ein sekundärer Botenstoff verhält, ist nicht bekannt.

Am gereinigten Protein konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal biochemische Untersuchungen an der putativen membranextrinsischen Dömäne des EIN2-Proteins durchgeführt werden, die zum Verständnis der Signalweiterleitung durch das EIN2-Protein beitragen können.

#### **IV.2.2 Untersuchungen zur Bindung von Kalzium an EIN2<sup>479-1294</sup>**

Um die Beteiligung von Kalziumionen an der Signalweiterleitung durch das EIN2-Proteins zu untersuchen, wurden Bindungsstudien mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an dem carboxyterminalen Bereich des EIN2-Proteins durchgeführt. Die dazu durchgeführten Experimente in III.4.1 (ITC-Experimente) und in III.4.2 (Fluoreszenz-Experimente) konnten die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an EIN2<sup>479-1294</sup> eindeutig nachweisen.

#### IV.2.2.1 Messungen mittels ITC

Die aus der Wärmetönung des ITC-Experimentes abgeleitete Bindungskurve ließ sich durch iterative Kurvenanpassung an ein Bindungsmodell angleichen, dass die Bindung von Kalzium an drei bis vier identische Bindungsstellen im EIN2-Protein berechnete. Den Bindungsstellen wurden identische Affinitäten und thermodynamische Eigenschaften zugeordnet. Die errechnete Reaktionsenthalpie zeichnete die Bindung von Kalzium an EIN2<sup>479-1294</sup> als einen exothermen Prozess aus, der den Ablauf der Reaktion begünstigen sollte. Die durch die Bindung verursachte Verringerung der Entropie wirkte jedoch dieser Begünstigung entgegen und stand im Gegensatz zu der Beobachtung, dass bei der Bindung von bivalenten Metallionen aufgrund der hohen Dehydratisierungsenergie normalerweise Enthalpieänderungen  $> 0$  erwartet wurden [132]. Der Zuwachs an Entropie bei der Bindung eines Metallions an ein Protein ist jedoch immer davon abhängig, wie viele Wasserliganden des Metallions durch die Bindung gegen Proteinliganden ausgetauscht werden können [133]. Je mehr Wasser am Ion verbleibt, desto geringer ist die Zunahme an Entropie. Diese Beobachtung könnte auch die Abnahme an Entropie bei der Bindung von Kalzium an EIN2 erklären. Die als Kalziumbindungsmotive in EIN2<sup>479-1294</sup> identifizierten Sequenzen wurden mit einer Wahrscheinlichkeit von 80-82 % vorhergesagt. Daher unterscheiden sie sich vom Suchmotiv in den für die Bindung essentiellen Stellen +X(+1), +Y(+3), +Z(+5), -X(+9), -Z(+12). Dadurch kann die Bindung des Kalziumions nicht über alle im kanonischen Bindungsmotiv zur Verfügung gestellten Liganden erfolgen und es verbleibt mehr Wasser am Ion. Ebenfalls ungünstig auf die Entropie der Reaktion könnte sich eine Exposition hydrophober Bereiche des Proteins auswirken, die durch die Bindung von Kalzium ausgelöst werden könnte [134].

Die Qualität der im ITC-Experiment bestimmten Bindungsaffinitäten konnte über den dimensionslosen Parameter C ermittelt werden. Der C-Wert ist gleich dem Produkt aus der Bindungskonstante  $K_a$  und der Proteingesamtkonzentration in der Messzelle. Kleine C-Werte können also auf schwache Bindung des Liganden oder auf eine zu geringe Proteinkonzentration zurückgeführt werden und flachen die Bindungskurve stark ab, so dass  $K_a$  nicht mehr eindeutig aus dem Experiment bestimmt werden kann. Allgemein wird ein Bereich zwischen 10 und 100 als ein optimaler Wert C-Wert betrachtet [135]. Der C-Wert der Experimente zur Bindung von Kalzium an EIN2 wurde durch die ermittelte Bindungskonstante und der eingesetzte Proteinkonzentration zu 0,04 berechnet und lag somit 250-fach unterhalb des empfohlenen Wertes.

Eine Erhöhung der Proteinkonzentration hätte also theoretisch die Qualität des Experiments steigern können. Praktisch war dies jedoch nicht durchführbar, da die Ausbeute der EIN2-Proteinpräparation die zur Verfügung stehende Proteinmenge limitierte. Bei einer hohen Bindungskonstante hätte die Qualität der Messung auch dadurch erhöht werden können, dass bei gleich bleibender Proteinkonzentration die Ligandenkonzentration gesenkt würde. Diese Möglichkeit konnte nicht getestet werden, da die Wärmeänderungen dieser Experimente unterhalb der Detektionsgrenze des Geräts lagen.

Durch die ITC-Experimente konnte also tatsächlich die Bindung von Kalzium am EIN2-Protein nachgewiesen werden. Der geringe C-Wert und die daraus resultierenden Unsicherheiten des Ergebnisses machten es aber notwendig, die Bindungsaffinität und die Anzahl der Bindungsstellen für Kalzium in EIN2<sup>479-1294</sup> durch eine weitere unabhängige Methode zu bestätigen. Dazu sollte die Bindung des Metallions an EIN2<sup>479-1294</sup> fluoreszenzspektroskopisch untersucht werden.

### **IV.2.3 Notwendige Voraussetzungen im Protein, um mittels**

#### **Fluoreszenzspektroskopie Bindungsereignisse detektieren zu können**

Der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Bindung von Kalzium an den membranextrinsischen Bereich des EIN2-Proteins wurden Versuche vorangestellt, die die Eignung dieser Methode für Bindungsstudien an EIN2 nachwiesen. Um statische Quenchereignisse aufgrund von Bindungsereignissen interpretieren zu können, wurde zum einen die Zugänglichkeit von exponierten und abgeschirmten Tryptophanen bestimmt und zum anderen musste sichergestellt werden, dass die unter Zusatz von Kalzium beobachteten Quenchereignisse nicht ausschließlich auf dynamische Quencherereignisse zurückzuführen waren.

Um die Zugänglichkeit der Tryptophanreste in EIN2<sup>479-1294</sup> zu untersuchen, wurden Titrationen zu EIN2 mit den Quenchern Acrylamid und Natriumiodid durchgeführt. Im Gegensatz zu Iodid, das durch seine Ladung und Polarität nur mit oberflächennahen, also lösungsmittel-exponierten Fluorophoren in Kontakt treten sollte, konnte Acrylamid aufgrund seiner ungeladenen, apolaren Struktur bis in hydrophobe Bereiche des Proteins eindringen. Durch die Kombination der beiden Quencher konnten die Tryptophane in EIN2<sup>479-1294</sup> in Klassen mit unterschiedlichen Zugänglichkeiten eingeteilt werden.

Das nicht-lineare Verhältnis von Quenchintensität zu Acrylamidkonzentration (Abb III-9, A) gab einen Hinweis darauf, dass nicht alle Tryptophanreste des EIN2<sup>479-1294</sup>-Proteins

lösungsmittelexponiert vorlagen, sondern heterogen in der Sekundärstruktur des Proteins verteilt waren. Die schnellere Stern-Volmer-Konstante  $K_1 = 11,87 \text{ M}^{-1}$  konnte der eher lösungsmittelzugänglichen Tryptophanklasse zugeordnet werden, der 28 % aller gemessener Tryptophane angehörten. Diese Fluorophore waren somit für die Quenchingversuche gut zugänglich. Der im Protein verborgenen, weniger zugänglichen Klasse wurden 72 % aller Tryptophane in EIN2<sup>479-1294</sup> zugeordnet. Für sie wurde im Mittel eine Stern-Volmer-Konstante  $K_2 = 0,91 \text{ M}^{-1}$  berechnet. Die Quenchingergebnisse entsprachen der Erwartung, dass Iodid nur eine Klasse der Tryptophane löschen kann, nämlich solche, die auf der Oberfläche des Proteins exponierte Lage besitzen. Dies wurde durch den linearen Zusammenhang im Stern-Volmer-Diagramm deutlich, aus dem eine dynamische Quenchkonstante  $K_1 = 0,71 \text{ M}^{-1}$  ermittelt wurde (Abb. III-9, B). Unter Annahme, dass alle neun Tryptophane des EIN2<sup>479-1294</sup>-Proteins durch die kombinierte Verwendung der Quencher Acrylamid und Natriumiodid erreicht wurden, konnte zwei bis drei Tryptophanen eine oberflächenexponierte Lage zugeordnet werden. Sechs bis sieben Tryptophane befanden sich dagegen in weniger zugänglichen, lösungsmittelabgeschirmten Positionen des Proteins EIN2<sup>479-1294</sup>.

Die ermittelten dynamischen Quenchkonstanten für Acrylamid liegen in der Größenordnung, wie sie auch in andere Proteine beobachtet wurden. Die für die zugänglichen Tryptophane in EIN2 ermittelte dynamische Quenchkonstante  $K_1 = 11,87 \text{ M}^{-1}$  passt zum einen zu den Werten, die für freie Tryptophane in wässriger Lösung ( $K_q = 13,1 \text{ M}^{-1}$ ) oder mit N-Acetyl-Tryptophanamid (NATA) als Referenz für vollständig exponierte Tryptophane ( $K_q = 17,6 \text{ M}^{-1}$ ) ermittelt worden sind, und zum anderen auch zu den Konstanten, die für die Proteine 3-Phosphoglyzeratkinase aus Hefe oder einer Metalloprotease aus *S. aureus* berechnet wurden ( $K_q = 10,1$  bzw.  $14,1 \text{ M}^{-1}$ ) [136-139]. Auch die Quenchkonstante  $K_2 = 0,91 \text{ M}^{-1}$  für die abgeschirmten Tryptophanreste in EIN2<sup>479-1294</sup> lag im Bereich der Werte, die für die genannten Proteine ( $K_q = 1,3$  bzw.  $0,51 \text{ M}^{-1}$ ) beschrieben waren.

Ungewöhnlich niedrig ist dagegen die mit Iodid für EIN2<sup>479-1294</sup> ermittelte Quenchkonstante  $K_q = 0,71 \text{ M}^{-1}$ . Sowohl für freie Tryptophane in wässrige Lösung als auch für NATA sind bei Iodid-Quench wesentlich höhere Werte für die dynamische Quenchkonstanten beschrieben worden ( $11,6 \text{ M}^{-1}$  bzw.  $6,0 \text{ M}^{-1}$ ) [137,139,140] Diese abweichende Beobachtung in EIN2 könnte durch teilweise verdeckte Tryptophane, eine negativ geladen Proteinoberfläche oder eine polarisierte Umgebung der Tryptophane in EIN2<sup>479-1294</sup> erklärt werden.

Insgesamt wurde aus diesen Ergebnissen deutlich, dass die Fluoreszenzspektroskopie am EIN2<sup>479-1294</sup>-Protein dazu geeignet war, Bindungsereignisse zu detektieren, die sowohl an der



Proteinoberfläche als auch in weiter hydrophob gelegenen Bereichen des Proteins stattfinden können.

Die zweite wichtige Voraussetzung für die Auswertung der fluoreszenzspektroskopischen Bindungsstudien war die Auslösung von statischen Quenchereignisse in EIN2<sup>479-1294</sup> bei der Titration von Kalzium. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe von Kalzium zu EIN2<sup>479-1294</sup> zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität führte, die nicht allein auf dynamische Kollisionslöschung zurückgeführt werden konnte (vgl. III.4.2). Die beste Kurvenanpassung der experimentellen Daten wurde durch eine Gleichung erreicht, die einer Tryptophanklasse ausschließlich dynamische Ereignisse und einer anderen sowohl dynamische als auch statische Ereignisse zuordnete. Somit konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Kalzium an EIN2 zu statischen Quenchereignissen führte, die zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten genutzt werden konnten.

#### **IV.2.4 Kalzium wird an zwei unterschiedlichen Typen von Bindungsstellen gebunden**

Die zur Detektion von Kalziumbindung an EIN2<sup>479-1294</sup> verwendeten Methoden ITC und Fluoreszenzquenching unterscheiden sich in ihrer Leistung insofern, dass durch die spektroskopische Methode die Bindung an unterschiedliche Typen von Bindungsstellen identifiziert werden kann, jedoch die Anzahl dieser Bindungsstellen nicht bestimmbar ist. Im Gegensatz dazu kann durch die Mikrokolorimetrie, unter der Voraussetzung einer genügend hohen Wärmetönung im Experiment, die Anzahl an Bindungsstellen bestimmt werden, die verschiedenen Typen von Bindungsstellen zugeordnet werden können.

Die mikrokolorimetrisch ermittelte Dissoziationskonstante stimmte in ihrer Größenordnung mit der fluoreszenzspektroskopisch bestimmten Dissoziationskonstante für die weniger affine Bindungsstelle überein.

Die Anzahl der identifizierten Typen von Bindungsstellen unterscheidet sich für die beiden angewendeten Methoden. Im Gegensatz zur spektroskopischen Methode wurde in den ITC-Experimenten nur ein einziger Typ von Bindungsstelle statt zwei verschiedener Typen identifiziert. Bindungskurven im ITC-Experiment zeigen normalerweise einen sigmoiden Verlauf. In den zur Kalziumbindung an EIN2<sup>479-1294</sup> durchgeführten Versuchen fehlt der zu Beginn eines Experiments erwartete flache Bereich der sigmoiden Kurve, durch den möglicherweise ein weiterer Typ Bindungsstelle hätte detektiert werden können, und dessen Affinität der hoch-affinen Bindungsstelle des Fluoreszenzexperimentes entspricht. Für einen

sigmoider Verlauf des Experiments konnte die Proteinkonzentration nicht erhöht werden. Auch durch Anpassung der Titrationsbedingungen konnte dieser Bereich der Bindungskurve nicht weiter aufgelöst werden (vgl. III.4.1).

Zur Einschätzung der Stärke der Bindung zwischen EIN2<sup>479-1294</sup> und Kalzium wurden die Dissoziationskonstanten mit Literaturdaten anderer Kalziumbindenden Proteine verglichen. Es zeigte sich, dass die Bindungsaffinitäten Kalziumbindenden Proteine über einen weiten Konzentrationsbereich gestreut sind. Dabei wird die wohl größte Klasse der Kalziumbindenden Proteine durch die *EF-hand*-Superfamilie gebildet, die Bindungsaffinitäten zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-9}$  M für Kalzium aufweisen [76]. Die hier ermittelten  $K_D$ -Werte liegen also im unteren bis mittleren Bereich der Bindungsstärken von *EF-hand*-Proteinen.

### **IV.3 EIN2 besitzt putative *EF-hand*-Motive**

Da die in III.4.2 vorgestellten Experimente ergaben, dass die putativ membranextrinsische Domäne des Proteins EIN2 Kalziumionen mit Affinitäten binden kann, wie sie für die kalziumbindende Proteinsuperfamilie der *EF-hand*-Proteine beschrieben worden sind, wurde die Sequenz von EIN2<sup>479-1294</sup> auf Kalziumbindungsmotive untersucht. Mit dem eingesetzten Suchalgorithmus konnten sieben putative *EF-hand*-Motive in der Sequenz von EIN2<sup>479-1294</sup> identifiziert werden, auf die die Suchmotive mit 80 - 82 % iger Wahrscheinlichkeit zutrafen (vgl. Tab. III.2). Ein vorangegangener, sequenzbasierter Ansatz, in dem eine Literaturanalyse mit einer BLAST Suche nach unterschiedlichen, bekannten *EF-hand*-Sequenzen und mit vorliegenden Daten einer *A. thaliana* Genom-Datenbank kombiniert wurde, hat EIN2 nicht als Lösung ergeben [142].

Die Anzahl der in dieser Arbeit identifizierten *EF-hand*-Motive steht im scheinbaren Widerspruch zu der in III.4.1 und III.4.2 ermittelten Anzahl an Kalziumbindungsstellen. Je nach angewendeter Methode konnten dort zwei (Fluoreszenzspektroskopie) oder drei bis vier Bindungsstellen (ITC) nachgewiesen werden. Bei der Familie der *EF hand*-Proteine handelt es sich jedoch um eine relativ inhomogene Gruppe von Proteinen, die sich sowohl stark in ihrer Affinität für Kalzium ( $10^{-4}$  M für einige S100 ähnliche Proteine [143,144] bis  $10^{-10}$  M für TnC [145]) als auch in der Anzahl ihrer Bindungsstellen (1 für CaV 1.2 [146] – 7 für Calumenin [147]) unterscheiden. Zudem wurde beobachtet, dass nicht alle *EF-hand*-Motive eines Proteins funktionell sind. AtCBL2 aus *A. thaliana* wurden vier *EF-hand*-Motive zugeordnet [148], doch die Bindung von Kalzium konnte nur an zwei Motiven nachgewiesen

werden. Auch in Tescalin wurde nur ein funktionelles *EF-hand*-Motiv identifiziert, obwohl das Protein mit vier Sequenzmotiven ausgestattet ist [149].

Die ungerade Anzahl an Bindungsmotiven in EIN2 steht der Tatsache gegenüber, dass *EF-hand*-Motive häufig in *EF-hand*-Paaren organisiert sind, in denen die Helices des Helix-Loop-Helix-Motivs Kopf an Kopf gegeneinander ausgerichtet sind, so dass ein *Four Helix Bundle* entsteht [76]. In diesem werden die amphipathischen Helices so gepackt, dass sie einen hydrophoben Kern ausbilden können. Obwohl die Paarung der Bindungsmotive sehr konserviert ist, wurden in seltenen Fällen auch Proteine mit einer ungeraden Anzahl an *EF-hand*-Motiven beobachtet. Dabei kann das ungepaarte Motiv entweder funktionelle Aufgaben übernehmen, wie für die CaV1.2-Untereinheit des spannungsgesteuerten Ca<sup>2+</sup>- Kanals beschrieben [146], oder aber wie im Fall der Parvalbumine strukturelle Aufgaben besitzen [150].

Die aus den Fluoreszenzuntersuchungen ermittelten Dissoziationskonstanten des EIN2 Proteins für die Bindung von Kalzium entsprachen mit 10<sup>-4</sup> M bzw. 10<sup>-6</sup> M den Affinitäten, wie sie für Proteine der *EF-hand*-Superfamilie beobachtet wurden. Häufig konnte für *EF-hand*-Motive mit geringerer Affinität eine nicht perfekte Chelatisierung des Kalziumions nachgewiesen werden. Diese konnte zumeist auf einen Aminosäureaustausch an der neunten oder zwölften Loop-Position des *EF-hand*-Motivs zurückgeführt werden. In Oncomodulin beispielsweise konnte der Austausch des Glutamatrests an Position neun gegen eine Aminosäure mit kürzerer Seitenkette mit der geringeren Affinität des Proteins für Kalzium korreliert werden [151]. Die Verkürzung der Seitenkette führt dazu, dass für die Koordination des Kalziums ein Wassermolekül in der Bindungstasche verbleiben muss, welches die Bindung zwischen Protein und Ligand überbrückt. Die so entstehende, niedrigere Lösungsentropie ist im Protein CIB verantwortlich für die fünffach niedrigere Affinität der *EF3-hand* (Asp12) im Gegensatz zu der mit Glutamat besetzten *EF4* Bindungsstelle [152].

Diese Beobachtung könnte eine Erklärung für die um den Faktor 100 auseinander liegenden Dissoziationskonstanten der zwei Kalziumbindungsstellen in EIN2<sup>479-1294</sup> geben. Die besondere Konservierung eines Glutamatrests an Position 12 des Kalziumbindungs-Loops ist nur in drei putativen *EF-hand*-Motiven des Proteins EIN2<sup>479-1294</sup> verwirklicht. Unter der Annahme, dass diese Motive tatsächlich die Bindungsstellen von Kalzium in EIN2 bilden, könnte der Glutamatrest zu einer direkten Chelatisierung von Kalzium führen und die Affinität der Bindungsstelle positiv beeinflussen. In einem anderen putativen Bindungsmotiv ist diese Position durch einen Aspartatrest belegt. Daher würde für dieses Bindungsmotiv eine geringere Affinität für Kalzium erwartet werden.

In weiterführenden Experimenten muss durch gezieltes Ausschalten putativer *EF-hand*-Motive der Nachweis erbracht werden, dass die Bindung von Kalzium in EIN2 durch dieses Bindungsmotiv erfolgt. Ohne diesen Nachweis bleibt die Beteiligung der identifizierten Sequenzen an der Bindung ungewiss, da der Suchalgorithmus den Sequenzabschnitten von EIN2 nur eine ~ 80% ige Wahrscheinlichkeit als *EF-hand*- Motiv zuordnete. Weiter stehen Versuche aus, in denen die experimentell ermittelten 2 bis 4 Bindungsstellen den sieben putativen theoretischen Binudungsstellen zugeordnet werden sowie eine Analyse der putativen Bindungsloops, durch die die unterschiedlichen Affinitäten der Bindungsstellen erklärt werden können.

#### **IV.4 Die Bindung von Kalzium verursacht Konformationsänderungen in EIN2<sup>479-1294</sup>.**

Proteinkonformationsänderungen stellen neben Phosphorylierungsreaktionen ein geeignetes Mittel in Signaltransduktionswegen dar, mit dem Informationen intrazellulär übermittelt werden können. Durch die Veränderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur kann die Aktivität und / oder die Funktion eines Proteins so moduliert werden, dass die Bindung an ein Effektormolekül ermöglicht wird oder eine signalinduzierte Antwort generiert werden kann.

Da die Beteiligung von Kalzium am Ethylensignalweg gezeigt wurde, sollte untersucht werden, ob die Bindung von Kalzium an das EIN2-Protein konformationelle Änderungen im Protein bewirken und somit zur Weiterleitung des Ethylensignals beitragen könnte.

Mittels CD-spektroskopischer Analyse konnte bei der Titration von Kalziumionen zum Protein EIN2 Konformationsänderungen nachgewiesen werden (vgl. III.5). Die signifikante Abnahme der molaren Elliptizität bei 222 nm bei einem molaren Ligand:Protein-Verhältnis von 2-3 gab einen Hinweis darauf, dass die beobachteten Konformationsänderungen in EIN2<sup>479-1294</sup> durch die Bindung von zwei bis drei Kalziumionen pro EIN2-Molekül induziert werden konnten. Dieses Ergebnis stand in guter Übereinstimmung zu der im ITC- und Fluoreszenzexperiment bestimmten Anzahl an Kalziumbindungsstellen.

Die Abnahme der molaren Elliptizität bei 222 nm machte deutlich, dass die Konformationsänderungen vor allem auf lokale Änderungen in Helixsekundärstrukturelementen zurückzuführen waren. Eine direkte Beteiligung dieser Helixbereiche an der Bindung von Kalzium ist sehr wahrscheinlich und ist ein starkes Argument dafür, dass die zuvor identifizierten *EF-hand*-Motive tatsächlich an der Bindung von Kalzium beteiligt sind. Konformationsänderungen sind auch für sensorische *EF-hand*-Proteine wie Calmodulin

beschrieben, bei denen die Bindung von Kalzium Konformationsänderungen unmittelbar am Bindungsmotiv induziert. Die antiparallele Anordnung der Helices eines *EF-hand*-Paares der geschlossenen, kalziumfreien Konformation geht dabei in eine orthogonale Anordnung in der offenen, kalziumgebundenen Konformation über. Dabei wird die Freilegung großer hydrophober Oberflächen beobachtet, die als Kontaktfläche Interaktionen mit verschiedensten Zielmolekülen ermöglichen [153].

Die beobachtete Abnahme der molaren Elliptizität des EIN2 Proteins bei 222nm könnte auf eine lokale Aufwindung einer am *EF-hand* Motiv beteiligten  $\alpha$ -Helix oder einer in unmittelbarer Umgebung zur Bindungsstelle gelegenen  $\alpha$ -Helix hinweisen. Für das *EF-hand*-Protein Calbindin D<sub>9K</sub> konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung einer normalen  $\alpha$ -helikalen Anordnung durch die Bindung von Kalzium gestört wird, so dass ein Mix aus 3<sub>10</sub>- und normaler  $\alpha$ -Helix entsteht [154].

## **IV.5 EIN2 bindet Magnesium- und Manganionen**

Nachdem die Bindung von Kalzium an EIN2<sup>479-1294</sup> bestätigt und putative *EF-hand*-Motive identifiziert werden konnten, sollte untersucht werden, ob durch die Bindung von Magnesium an EIN2 weitere Parallelen zu den *EF-hand*-Proteinen gezogen werden können. Zudem sollten mit den Untersuchungen zur Bindung von Mangan der Bogen zu den Metallionentransportern der Nramp-Familie gespannt werden, für die eine hohe Transportselektivität für Mangan nachgewiesen werden konnte. Da bislang jedoch kein Metallionentransport durch das Gesamt-Protein EIN2 gezeigt werden konnte, wurde für EIN2 eher eine durch die carboxyterminale Domäne vermittelte Sensor- als eine Transportfunktion postuliert. Diese putative Sensorfunktion sollte durch Bindungsexperimente mit zweiwertigen Kationen bestätigt werden.

Die dazu durchgeführten Experimente zeigen, dass die membran-extrinsische Domäne von EIN2 neben Kalzium auch Magnesium- und Manganionen spezifisch binden kann (vgl. III.7). In den fluoreszenzspektroskopischen Quenchuntersuchungen konnten ebenso wie bei der Bindung von Kalzium je zwei Typen von Bindungsstellen für Mangan und Magnesium ermittelt werden, die sich in ihren Affinitäten für die Metallionen unterschieden.

Unter der Annahme, dass alle drei Ionen an den zwei gleichen Bindungsstellen im Protein gebunden werden, können die ermittelten Dissoziationskonstanten für die unterschiedlichen Metallionen miteinander verglichen werden. Die Gegenüberstellung mit den für Kalzium ermittelten Bindungsaffinitäten zeigte, dass in der hoch affinen Bindungsstelle kaum

zwischen Kalzium und Magnesium unterschieden wird, die nieder affine Bindungsstelle jedoch deutliche Unterschiede in der Affinität zu den verschiedenen Ionen aufweist.

Da sich Kalzium, Magnesium und Mangan chemisch sehr ähneln, können die Ionen über die gleichen Bindungsmotive in Proteinen koordiniert werden. Für Magnesium ist bekannt, dass es entweder ohne oder unter Beteiligung des zwölften Liganden des Bindungsmotivs in *EF-hand*-Proteinen gebunden werden kann. Erfolgt die Bindung ausschließlich über den N-terminalen Bereich des Bindungsloops, übt dies nur geringfügige Effekte auf die Gesamtkonformation des Proteins aus und es kommt im Gegensatz zur Bindung von Kalzium, bei der der zwölfte Ligand maßgeblich an den kalziuminduzierten Konformationsänderungen beteiligt ist, zu keiner Signalweiterleitung [155]. Wird für die Bindung von Magnesium zusätzlich der zwölfte Ligand des Bindungsloops wie im Fall von Parvalbumin [156] oder sTnC [157] verwendet, werden diese Bindungsstellen als  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  spezifische Bindungsstellen betrachtet, deren Affinitäten für Magnesium höher als in den  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifischen Bindungsstellen liegen.

Die Bindung von Magnesium in *EF-hand*-Proteinen erfüllt verschiedenste Funktionen. Zum einen wurde der Bindung von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen in der C-terminalen Domäne des Proteins TnC eine strukturelle Aufgabe nachgewiesen [158]. Durch die Bindung von Magnesium geht das *molten globule*-Zufallsknäuel des Apo-Proteins in eine geordnete Struktur über. Die Affinität für die Bindung von Magnesium ist in diesen Proteinen ausreichend hoch, um  $\text{Mg}^{2+}$  unter physiologischen Bedingungen konstitutiv binden zu können. Somit sorgt  $\text{Mg}^{2+}$  dafür, dass das Protein bei jeglicher Kalziumkonzentration in einer geordneten Struktur vorliegt, und Kalzium bei einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration sofort binden kann, ohne dass das Protein zuerst in eine native Konformation überführt werden muss [158]. Magnesiumionen übernehmen auch bei der Modulation der Kalziumaffinität der Bindungsstelle eine wichtige Aufgabe in *EF-hand*-Proteinen. Durch die Besetzung der Bindungsstellen mit Magnesium in der ruhenden Zelle bestimmt die Dissoziationsrate, mit der Magnesium durch Kalzium aus der Bindungsstelle verdrängt werden kann, die Bindungsrate für Kalzium in der signalisierenden Zelle. Dies kann bei einer geringen Dissoziationsrate für Magnesium zu einer Verlangsamung der Kalziumantwort führen und wurde beispielsweise in sTnC beobachtet [159,160]. Zudem konnten in einigen  $\text{Mg}^{2+}$ -bindenden *EF-hand*-Proteinen völlig andere, zu der Bindung von Kalzium unterschiedliche Funktionen nachgewiesen werden, wie die sequenzspezifische Bindung der  $\text{Mg}^{2+}$ -gebundene Form des Proteins DREAM an DNA-Zielmoleküle. Die mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beladenen Form des Proteins zerstört diese Interaktion [161].

## IV.6 Die Bedeutung der Bindung von zweiwertigen Kationen an EIN2 unter physiologischen Bedingungen

Die nachgewiesene Bindung von Kalzium sowie die Sequenzanalyse auf *EF-hand*-Bindungsmotive gaben einen starken Hinweis darauf, dass es sich bei dem Protein EIN2 um ein *EF-hand*-Protein mit Kalziumsensorfunktion handeln könnte. Die Möglichkeit, dass die *EF-hand*-Motive in EIN2 ausschließlich Kalziumpufferaktivität besitzen, konnte durch die ermittelten Affinitäten der Bindungsstellen ausgeschlossen werden, die mindestens  $10^2$  fach zu niedrig lagen, um den Kalziumspiegel in der ruhenden Zelle konstant zu halten. Als Sensorprotein würde die Affinität der stärkeren Bindungsstelle jedoch ausreichen, um den Kalziumeinstrom in eine signalisierende Zelle ( $[Ca^{2+}]_{cyt}=10^{-5}$ - $10^{-6}$  M) zu detektieren. In einigen Beispielen fällt der Kalziumeinstrom jedoch geringer aus. Beim ABA-induzierten Kalziumeinstrom in pflanzliche Schließzellen oder bei der durch ein Auxinsignal induzierten Stomataschließung werden nur Kalziumkonzentrationsspitzen von  $5 \times 10^{-7}$  M erzeugt, so dass nur Kalziumsensorproteine mit einer höheren Affinität diese Signale detektieren können. [162,163].

Ebenso wurde wie für viele andere sensorische *EF-hand*-Proteine eine Bindung von Magnesium durch das EIN2 Protein nachgewiesen. Da  $Mg^{2+}$ -Ionen unter physiologischen Bedingungen in einer konstanten Konzentration von  $2 \times 10^{-3}$  bis  $5 \times 10^{-4}$  M in der Zelle vorliegen und die beschriebenen Affinitäten der *EF-hand*-Proteine für  $Mg^{2+}$  zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  M liegen, sind in der ruhenden Zelle die  $Ca^{2+}$ -Bindungsstellen zumeist mit  $Mg^{2+}$ -Ionen abgesättigt. Im Gegensatz zu EIN2 reicht die  $10^2$  bis  $10^3$  fach höhere Affinität dieser Proteine gegenüber Kalzium jedoch aus, um bei einem signalvermittelten Kalziumeinstrom in die Zelle Kalzium gegen Magnesium auszutauschen. Die für EIN2 ermittelten  $K_d$ -Werte der Magnesiumbindung sind nicht außergewöhnlich hoch, sondern spiegeln gut die im Millimolarbereich liegenden Affinitäten für Magnesium anderer *EF-hand*-Proteine wider [164]. Doch der Unterschied zwischen den Affinitäten zwischen Kalzium und Magnesium im Protein EIN2 ist nicht groß genug, um die in der ruhenden Zelle gebundenen Magnesiumionen aus den Bindungsstellen zu verdrängen. Obwohl an der zweiten, nieder-affinen Bindungsstelle in EIN2 *in vitro* Kalziumbindung nachgewiesen wurde, wird dort unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich nur Magnesium binden können, und dort eine strukturelle Aufgabe im Protein übernehmen.

Auch die Bindung von Mangan wird unter physiologischen Bedingungen nur strukturelle Aufgaben in EIN2 übernehmen können, da die *in vitro* ermittelte Affinität für Mangan die

Verfügbarkeit dieses Ion weit überschreiten. Mangan wirkt jedoch in vielen Proteinen als Cofaktor und auch im *EF-hand*-Protein SOS2 aus *A. thaliana* werden Manganionen als wichtiger Kofaktor für die Interaktion mit Calcineurin-ähnlichen Proteinen gebunden [165].

## **IV.7 EIN2 kann über seine membranextrinsische Domäne mit Proteinen des Ethylensignalwegs interagieren**

Die Weiterleitung von Signalen in Signalkaskaden erfordert häufig Protein-Protein-Interaktionen. Dies führt dazu, dass Rezeptoren von Signaltransduktionswegen häufig Proteinkomplexe mit signalweiterleitenden Proteinen ausbilden. Für den Ethylenrezeptor ETR1 konnte neben der Interaktion im Hefe-Zweihybrid-System und neben in-vitro-Bindungsexperimenten eine Komplexbildung mit CTR1 beobachtet werden [27,28]. In einer Dichtegradientenanalyse konnte die Assoziation von CTR1 mit dem ETR1-Protein an der ER-Membran durch die Bildung eines Multienzymkomplexes nachgewiesen werden [15,26]. Die ungeklärte Größe dieses Komplexes macht die Beteiligung weiterer Proteine des Ethylensignalwegs wahrscheinlich. Insbesondere eine mögliche Metallionenbindung des Nramp-ähnlichen EIN2-Proteins und die Lokalisation des Multiproteinkomplexes an der Membran des ER als zellulären Kalziumspeicher machten EIN2 zu einem möglichen Kandidaten [16].

Das Protein EIN2 konnte über seine membran-extrinsische Domäne im C-Terminus Wechselwirkungen mit dem Ethylenrezeptor ETR1 eingehen. Diese Schlussfolgerungen legten die in Abbildung III-17 dargestellten fluoreszenzspektroskopischen Experimente nahe. Durch Fluoreszenzlöschversuche konnte nachgewiesen werden, dass es bei der Titration von ETR1<sub>W<sub>total</sub></sub>-Protein zu EIN2<sup>479-1294</sup> in Anwesenheit von CaCl<sub>2</sub> zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität kam. Es konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzlöschung durch die Bindung an eine der zwei identifizierten Tryptophanklassen erfolgte. Die dabei ermittelte Dissoziationskonstante für EIN2<sup>479-1294</sup> für die Bindung von ETR1<sub>W<sub>total</sub></sub> (vgl. Abb. III-18) weist auf eine schwache bis mäßige Affinität bei der Bindung des Rezeptorproteins hin, wie sie häufig bei transient auftretenden Protein-Protein-Wechselwirkungen beobachtet werden kann [141]. Eine Kalziumabhängigkeit dieser Bindung konnte durch die Untersuchungen nicht bestimmt werden. Das notwendige Kontrollexperiment, das Aussagen über die Bindung von ETR1 an EIN2<sup>479-1294</sup> ohne Zusatz von CaCl<sub>2</sub> treffen sollte, führte aufgrund der geringeren Ionenstärke im Versuchsansatz zum Ausfällen des ETR1-Proteins.



## IV.8 Kann EIN2 die Rolle eines Kalziumsensors im Ethylen-signalweg übernehmen?

Unter den hier eingesetzten Methoden zur Bestimmung der Affinitäten für Kalzium, Magnesium und Mangan erscheint das Protein EIN2 als kein klassisches Kalzium-sensorprotein, obwohl es mit den ligand-induzierten Konformationsänderungen eine wichtige Eigenschaft dieser Proteine zeigt. Auch die Bedeutung von Kalzium im Signaltransduktionsweg des Ethylen weist auf eine solche Aufgabe hin. Gegen eine klassische Funktion als Kalziumsensor bei der Signalvermittlung durch einen Kalziumeinstrom in die Zelle spricht aber der geringe Unterschied in der Affinität zu den drei verschiedenen Kationen Kalzium, Magnesium und Mangan. Um die Rolle als Sensorprotein erfüllen zu können, muss ein anderer, bislang unbekannter Signalübertragungsmechanismus für das EIN2 Protein existieren.

Die von Alonso et al. [37] festgestellte, vom N-Terminus unabhängige Signalweiterleitung durch die C-terminale Domäne des EIN2-Proteins sowie die in dieser Arbeit beschriebenen Konformationsänderungen nach Ligandenbindung bestärken eine Rolle des Proteins EIN2 als Kalziumsensor. Auch wenn die nur geringfügig niedrigere Affinität des Proteins EIN2 für Magnesium im Vergleich zu Kalzium noch Fragen aufwirft, wie das Protein mit *EF-hand*-ähnlicher Struktur Kalziumeinstrom in die Zelle wahrnehmen kann, gibt es erstaunliche Parallelen zu den Sensorproteinen SNF3 und RGT2, die an der Glukosewahrnehmung in Hefe beteiligt sind. Diese beiden Proteine können ebenfalls losgelöst von ihrer membrandurchspannenden, N-terminalen Domäne Signale über die Verfügbarkeit von Glukose weiterleiten. Neuesten Untersuchungen zur Folge wird die Ethylenantwort in *A. thaliana* ebenso wie die Glukoseantwort in Hefe über den Phosphorylierungszustand von Proteinen gesteuert, die an der Regulation der Transkription antwortspezifischer Gene beteiligt sind. Im Glukosesignalweg wird die Transkription der HXT-Glukosetransportergene über den Phosphorylierungszustand der Proteine MTH1 und STD1 kontrolliert, deren phosphorylierte Form in Anwesenheit von Glukose über den 26S-Proteasom-Weg abgebaut werden. Durch ihr Fehlen wird der Repressors RGT1 phosphoryliert, so dass dieser abgelöst wird und die Transkription der Transportergene erfolgen kann [166]. Auch im Ethylensignalweg entscheidet der Phosphorylierungszustand des Transkriptionsfaktors EIN3 über die Stabilisierung oder die Ubiquitin-vermittelte Degradation des EIN3-Proteins durch das 26S-Proteasom [29]. Ob es sich bei EIN2 tatsächlich um einen Kalziumsensor handelt, der direkt

an der Stabilisierung des EIN3 Transkriptionsfaktors beteiligt ist, konnte in der vorliegenden Arbeit noch nicht bestimmt werden

## **IV.9 Das Verständnis der Aufgabe von EIN2 im Ethylen-signalweg steht erst am Anfang**

Neben der Sekundärstrukturanalyse wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung des Proteins EIN2 vorgenommen. Die durchgeführten Experimente konnten erstmals Hinweise darauf geben, welche Rolle EIN2 bei der Ethylenantwort spielt. Zwar konnten keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Signalübertragungsmechanismus des EIN2 Proteins gezogen werden, doch die zentrale Funktion der Kalziumbindung an das Protein konnte durch die kalziumvermittelten Konformationsänderung gezeigt werden. Dieser Nachweis bietet die Möglichkeit, weitere Untersuchungen am EIN2 Proteins durchzuführen, die zum Verständnis der Funktion der Kalziumbindung beitragen können. Für ein detailliertes Verständnis ist es entscheidend, die Anzahl der Bindungsstellen für Kalzium am Protein genau zu bestimmen und die Bindung an den putativen Bindungsmotiven zu lokalisieren. Durch Austausch von Aminosäuren in den putativen *EF-hand*-Motiven oder durch verkürzte Proteine, in denen die putativen Bindungsmotive teilweise fehlen, können sowohl in *in-vitro*-Experimenten als auch durch das Einbringen dieser Mutanten in *A. thaliana*-Pflanzen mit *ein2 loss-of-function*-Hintergrund die Funktionalität dieser Bindungsmotive bei der Antwort auf Ethylen und Jasmonat getestet werden.

Für das Verständnis der Funktion des EIN2 Proteins ist ebenso entscheidend, die direkten Interaktionspartner des EIN2 Proteins zu identifizieren. Obwohl die genetische Analyse des Signaltransduktionswegs das Protein EIN2 zwischen CTR1 und dem Transkriptionsfaktor EIN3 einordnet, konnte bislang weder der direkte Signalgeber für das EIN2-Protein noch ein in der Signalkaskade abwärts gelegener direkter Interaktionspartner identifiziert werden. In einem *in vitro*-Ansatz könnte die Bindung von potentiellen Interaktionspartnern an ein an Ni-IDA-immobilisiertes, rekombinant gereinigtes EIN2-Protein durch SDS-Gelanalyse nachgewiesen werden und der Interaktionspartner anschließend massenspektroskopisch identifiziert werden. Die hier gezeigte Bindung zwischen dem Ethylenrezeptor ETR1 und EIN2 gab bereits erste Hinweise darauf, dass EIN2 in einem Multiproteinkomplex vorliegen könnte. Ob es sich dabei um eine kalziumabhängige Interaktion zwischen dem Rezeptorprotein und EIN2 handelte, muss in weiteren Untersuchungen mit angepassten Pufferbedingungen für das ETR1 Protein geklärt werden.

## V. Zusammenfassung

Das Phytohormon Ethylen ist in der Pflanze an der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse der Pflanzenentwicklung wie an der Kontrolle von Fruchtreife, Blattfall und anderen Seneszenzprozessen beteiligt und spielt daher agrarökonomisch eine wichtige Rolle

Molekulargenetische Studien in *Arabidopsis thaliana* haben zu der Entwicklung eines Modells für die Signaltransduktion von Ethylen geführt, in dem zwar die an der Signalwahrnehmung und Weiterleitung beteiligten Proteine identifiziert werden konnten, doch die molekularen Mechanismen der einzelnen Schritte der Signaltransduktion noch weitestgehend ungeklärt blieben. Die Untersuchung des zugrunde liegende Mechanismus erfordert zusätzlich zu den indirekten, genetische Methoden die direkte Analyse an isolierten Proteine der Signalkaskade, über die Aussagen zur Struktur und Funktion der Proteine des Ethylensignalwegs getroffen werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Reinigungsprotokoll entwickelt, mit dem der putativ membran-extrinsische Bereich des EIN2-Proteins, der ca. 63 % des Gesamtproteins ausmacht, in ausreichender Menge für funktionelle Untersuchungen isoliert werden konnte. Eine erste strukturelle Charakterisierung des EIN2-Fragments wurde durch die Untersuchung der Sekundärstruktur mittels Zirkular Dichroismus (CD) Spektroskopie durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, wichtige Hinweise auf die Funktion des EIN2 Proteins zu erhalten. In funktionellen Untersuchungen konnte sowohl mikrokalorimetrisch als auch fluoreszenzspektroskopisch die Bindung zweiwertiger Kationen an mindestens zwei verschiedenen Typen von Bindungsstellen nachgewiesen werden und somit ein Zusammenhang mit der postulierten Sensorfunktion des Proteins für Metallionen hergestellt werden. Die mit der Bindung von Kalzium einhergehenden Konformationsänderungen in der membran-extrinsischen Domäne von EIN2 wurden CD-spektroskopisch analysiert und konnten  $\alpha$ -helicalen Bereichen des Proteins zugeordnet werden.

Durch Sequenzanalyse konnten in der membran-extrinsischen Domäne von EIN2 sieben putative *EF-hand*-Motive als mögliche Bindungsstellen für Kalzium identifiziert werden.

## Abstract

The gaseous hormone ethylene regulates many aspects of growth and development in plants such as fruit ripening, leaf abscission and other processes in senescence. Therefore ethylene has a particular economic importance.

Genetic screens and the isolation of mutants in the ethylene-response of Arabidopsis plants have led to the establishment of a model for the signal transduction pathway of ethylene. Considerable progress has been made in the identification of the proteins responsible for signal perception and signal transduction, but most of the molecular mechanisms for signal transduction are almost unknown.

In order to identify the biochemical activity and the signalling mode for proteins of the ethylene pathway indirect genetic methods are not sufficient. In addition it is necessary to analyze structure and function at isolated and purified proteins.

Expression and purification of the carboxyterminal domain of EIN2 (aa 479-1294), which contains about 63% of the full length protein, was established in this PhD work allowing the isolation of adequate amounts of protein for functional analysis of EIN2.

A first structural characterization of the recombinant EIN2 domain was achieved by circular dichroism spectroscopy.

Molecular characterization of the recombinant protein was done by fluorescence spectroscopy and isothermal titration calorimetry. In these experiments we were able to identify two different types of binding sites for divalent cations. Calcium-induced local changes in the secondary structure of the membrane-extrinsic part of EIN2 were studied by CD spectroscopy. The observed shift in ellipticity at 222 nm reflects the conformational changes in  $\alpha$ -helical parts of the protein.

Analysis of the primary structure of EIN2 identified seven putative *EF-hand* calcium-binding motifs in the in the carboxyl-terminal domain of EIN2.

## VI. Literatur

- [1] **Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME Jr. (1992)**  
Ethylene in Plant Biology  
Academic Press, San Diego; 2<sup>nd</sup> Edition.
- [2] **De Grauwe L, Vandebussche F, Tietz O, Palme K, Van Straeten D (2005)**  
Auxin, ethylene and brassinosteroids: tripartite control of growth in *Arabidopsis* hypocotyls.  
*Plant Cell Physiol.* **46**(6); 827-836.
- [3] **Beaudin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J (2000)**  
Interactions between Abscisic Acid and Ethylene signalling cascades.  
*The Plant Cell* **12**; 1103-1115.
- [4] **Penninckx AMA, Thomma BPHJ, Buchala A, Broekaert W (1998)**  
Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways is Required for Induction of a plant Defensin Gene in *Arabidopsis*.  
*The Plant Cell* **10**; 2103-2111.
- [5] **Goeschl JD, Rappaport DL, Pratt HK (1966)**  
Ethylene as a factor regulating the growth of pea epicotyls subjected to physical stress.  
*Pl. Phys.* **4**; 877-884.
- [6] **O'Donnell PJ, Schmelz E, Block A, Miersch O, Wasternack C, Jones JB, Klee HJ (2003)**  
Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response.  
*Plant Physiol.* **133**(3); 1181-1189.
- [7] **Neljubov D (1901)**  
Über die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer Pflanzen.  
*Pflanzen Beih. Bot. Zentralbl.* **10**; 128-139.
- [8] **Guzman P, Ecker JR (1990)**  
Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants.  
*Plant Cell* **2**(6); 513-523.
- [9] **Roman G, Lubarsky B, Kieber JJ, Rothenberg M, Ecker JR (1995)**  
Genetic Analysis of Ethylene Signal Transduction in *Arabidopsis thaliana*: Five Novel Mutant Loci Integrated into a Stress Response Pathway.  
*Genetics* **139**; 1393-1409.
- [10] **Johnson PR, Ecker JR (1998)**  
The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective.  
*Annu. Rev. Genet.* **32**; 227-254.
- [11] **Bishopp A, Mähönen AP, Helariutta Y (2006)**  
Signs of change: hormone receptors that regulate plant development.  
*Development* **133**; 1857-1869.
- [12] **Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H (1998)**  
Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*  
*Science* **241**; 1086-1089.
- [13] **Hua J, Chang C, Sun Q, Meyerowitz EM (1995)**  
Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene.  
*Science* **269**(5231); 1712-1714.
- [14] **Sakai H, Hua J, Chen QC, Chang C, Medrano LJ, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1998)**  
ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*.  
*Proc Nat Acad Sci USA* **95**(10); 5812-5817.

- [15] **Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen QG, Bleecker AB, Ecker JR, Meyerowitz EM (1998)**  
EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis.  
Plant Cell **10**(8); 1321-1332.
- [16] **Chen YF, Randell MD, Findell JF, Schaller GE (2002)**  
Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum in Arabidopsis.  
J Biol. Chem. **277** (22); 19861-19866.
- [17] **Schaller GE & Bleecker AB (1995)**  
Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene.  
Science **270**; 1809-1811.
- [18] **Hall AE, Findell JL, Schaller GE, Sisler EC, Bleecker AB (2000)**  
Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis.  
Plant Physiol. **123**(4); 1449-1458.
- [19] **O'Malley RC, Rodriguez FI, Esch JJ, Binder BM, O'Donnell P, Klee HJ, Bleecker AB. (2005)**  
Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato.  
Plant J. **41**(5); 651-9.
- [20] **Schaller GE, Ladd AN, Lanahan MB, Spanbauer JM, Bleecker AB (1995)**  
The ethylene response mediator ETR1 from Arabidopsis forms a disulfide-linked dimer.  
J Biol Chem. **270**(21); 12526-30.
- [21] **Qu X, Hall BP, Gao Z, Schaller GE (2007)**  
A strong constitutive ethylene-response phenotype conferred on *Arabidopsis* plants containing null mutations in the ethylene receptors ETR1 and ERS1.  
BMC Plant Biol. **15**; 7:3.
- [22] **Gamble RL, Qu X, and Schaller GE (2002)**  
Mutational Analysis of the Ethylene Receptor ETR1. Role of the Histidine Kinase Domain in Dominant Ethylene Insensitivity.  
Plant Physiol. **128**, 1428–1438.
- [23] **Wang W, Hall AE, O'Malley R, Bleecker AB (2003)**  
Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission.  
Proc. Nat. Acad. Sci **100**(1); 352-357.
- [24] **Qu X & Schaller GE (2004)**  
Requirement of the histidine kinase domain for signal transduction by the ethylene receptor ETR1.  
Plant Physiol. **139**; 2961-2970.
- [25] **Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993)**  
CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases.  
Cell **72** (3); 427-441.
- [26] **Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE (2003)**  
Localization of the Raf-like Kinase CTR1 to the Endoplasmic Reticulum of *Arabidopsis* through Participation in Ethylene Receptor Signaling Complexes.  
J Biol. Chem. **278**(36); 34725-24732
- [27] **Clark KL; Larsen PB, Wang X, Chang C (1998)**  
Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **95**(9); 5401-5406.
- [28] **Huang Y, Li H, Hutchison CE, Laskey J, Kieber JJ. (2003)**  
Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis.  
Plant J. **33**(2); 221-33.

- [29] **Yoo SD, Cho YH, Tenal G, Xiong Y and Sheen J (2008)**  
Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> signalling.  
*Nature* **451**; 789-796.
- [30] **Chang C, Kwok SF, Bleeker AB, Meyerowitz EM (1993)**  
Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to Two-component regulators.  
*Science* **262**(5133); 539-544.
- [31] **Bleeker AB (1999)**  
Ethylene perception and signaling: an evolutionary perspective.  
*Trends plant Sci* **4**(7); 269-274.
- [32] **Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000)**  
Two-component signaling systems in plant signal transduction.  
*Trends Plant Sci* **5**(2); 67-64.
- [33] **Lohrmann J & Harter K (2002)**  
Plant two-component signaling systems and the role of response regulators.  
*Plant Physiol.* **129**(2); 500-515.
- [34] **Hwang I, Chen HC, Sheen J (2002)**  
Two-component signal transduction pathways in Arabidopsis.  
*Plant Physiol.* **129**(2); 500-515.
- [35] **Grefen C & Harter K (2004)**  
Plant two-component systems: principles, function, complexity and cross talk.  
*Planta* **219**; 733-742.
- [36] **Hall AE and Bleeker AB (2003)**  
Analysis of the combinatorial loss-of-function mutants in the Arabidopsis ethylene receptors reveals that the ers1 etr1 double mutant has severe developmental defects that are EIN2 dependent.  
*Plant Cell* **15**; 2032-2041.
- [37] **Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999)**  
EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis.  
*Science* **284**; 2148-2152.
- [38] **Jun SH, Han MJ, Lee S, Sam Seo Y, Kim WT, An G (2004)**  
OsEIN2 is a putative component in ethylene signalling in rice.  
*Plant Cell Physiol.* **45**(3); 281-289.
- [39] **Shibuya K, Barry KG, Ciardi JA, Loucas HM, Underwood BA, Nourizadeh S, Ecker JR, Klee HJ, Clark DG (2004).**  
The central role of PhEIN2 in ethylene responses throughout plant development in petunia.  
*Plant Physiol.* **136**; 2900-2912.
- [40] **Cellier M, Privet G, Belouchi A, Kwan T, Rodrigues V, Chias W, Gros P (1995)**  
Nramp defines a family of membrane proteins.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**; 10089-10093.
- [41] **Govoni G , Gros P (1998)**  
Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections.  
*Inflamm Res* **47**; 277-284.
- [42] **Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N (1996)**  
A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**; 5105-5110.

**[43] Belouchi A, Kwan T, Gros P (1997)**

Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions.  
Plant Mol Biol. **33**(6), 1085-1092.

**[44] Orgad S, Nelson H, Segal D, Nelson N (1998)**

Metal ions suppress the abnormal taste behaviour of the *Drosophila* mutant *malvolio*.  
J. Exp. Biol. **201**; 115-120.

**[45] Agranoff DD & Krishna S (1998)**

Metal ion homeostasis and intracellular parasitism.  
Molecular Microbiol **28**(3); 403-412.

**[46] Chen XZ, Peng JB, Cohen A, Nelson H, Nelson N (1999)**

Yeast SMF1 mediates H<sup>+</sup>-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents.  
J. Biol. Chem. **274**(49); 35089-35094.

**[47] Goswami T, Bhattacharjee A, Babal P, Searle S, Moore E, Li M, Blackwell JM (2001)**

Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H<sup>+</sup>/bivalent cation antiporter.  
Biochem J. **354**; 511-519.

**[48] Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997)**

Cloning and characterization of mammalian proton-coupled metal-ion transporter.  
Nature **388**; 482-487.

**[49] Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder J (2000)**

Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **97**; 4991-4996.

**[50] Makui H, Roig E, Cole ST, Helmann JD, Gros P, Cellier MF (2000).**

Identification of the Escherichia coli K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter  
Mol Microbiol. **35**(5);1065-78.

**[51] Picard V, Govoni G, Jabado N, Gros P. (2000).**

Nramp 2 (DCT1/DMT1) expressed at the plasma membrane transports iron and other divalent cations into a calcein-accessible cytoplasmic pool.  
J Biol Chem. **275**(46);35738-45.

**[52] Liu XF, Supek F, Nelson N, and Culotta VC (1997)**

Negative Control of Heavy Metal Uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* *BSD2* Gene.  
J Biol Chem. **272**; 11763–11769.

**[53] Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker JR, Briat JF (2000).**

Involvement of Nramp1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport.  
Biochem J. **347**; 749-755.

**[54] Özcan S, Dover J and Johnston M (1998)**

Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
EMBO Journal **17** (9); 2566–2573.

**[55] Schmidt MC, Mc Cartney RR, Zhang X, Tillmann TS, Solimeo H, Wöfl S, Almonte C, ins SC (1999)**

Std1 and Mth1 Proteins Interact with the Glucose Sensors To Control Glucose-Regulated Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*.  
Molecular Cell Biol **19** (7); 4561–4571.

**[56] Kruckeberg AL, Walsh MC, Van Dam K (1998)**

How do yeast cells sense glucose?  
BioEssays **20**; 972-976.



[57] **Coons DM, Vagnoli P, Bisson LF (1997).**

The C-terminal domain of Snf3p is sufficient to complement the growth defect of *snf3* null mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: SNF3 functions in glucose recognition. *Yeast* **13**(1); 9-20.

[58] **Vagnoli P, Coons DM, Bisson LF (1998)**

The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **160**; 31-36.

[59] **Hirayama T, Alonso JM (2000).**

Ethylene captures a metal! Metal ions are involved in ethylene perception and signal transduction. *Plant Cell Physiol.* **41**(5); 548-55.

[60] **Chen YF, Etheridge N, Schaller GE (2005)**

Ethylene Signal Transduction. *Annals of Botany* **95**; 901-915.

[61] **Kwak SH & Lee SH (1997)**

The requirements for Ca<sup>2+</sup>, protein phosphorylation, and dephosphorylation for ethylene signal transduction in *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol* **38**; 1142-1149.

[62] **Raz V & Fluhr R (1992)**

Calcium requirement for ethylene-dependent responses. *Plant Cell* **4**; 1123-1130.

[63] **Marschner H (1995)**

Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego, 2<sup>nd</sup> Edition.

[64] **Bush DS (1995)**

Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. *Ann Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* **27**; 953-967.

[65] **White, P.J. (2000)**

Calcium channels in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**; 171-189.

[66] **Hirschi, K.D., Korenkov, V.D., Wilganowski, N.L., and Wagner, G.J. (2000)**

Expression of Arabidopsis CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* **124**; 125-133.

[67] **Sze, H., Liang, F., Hwang, I., Curran, A.C., and Harper, J.F. (2000)**

Diversity and regulation of plant Ca<sup>2+</sup> pumps: Insights from expression in yeast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**; 433-462.

[68] **Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999)**

Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**; 691-706.

[69] **Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A (2006)**

Calcium in plant defense-signalling pathways. *New Phytologist* **171**; 249-269.

[70] **McAinsh MR, Hetherington AM (1998)**

Encoding specificity in Ca<sup>2+</sup> signalling systems. *Trends in Plant Science* **3**; 32-36.

[71] **McAinsh MR, Brownlee C, Hetherington AM (1997)**

Calcium ions as secondary messengers in guard cell signal transduction. *Physiologia Plantarum* **100**; 16-29.

- [72] **McAinsh MR, Brownlee C, Hetherington AM (1992)**  
Visualizing changes in cytosolic-free  $\text{Ca}^{2+}$  during the response of stomatal guard cells to abscisic acid.  
*Plant Cell* **4**; 1113-1122.
- [73] **Scruse-Field SAMG & Knight RM (2003)**  
Calcium: just a chemical switch?  
*Curr Opin Plant Biol* **6**; 500-506.
- [74] **Grabarek Z (2006)**  
Structural Basis for Diversity of the EF-hand Calcium-binding Proteins.  
*J Mol Biol* **359**; 509–525.
- [75] **Kretsinger RH, Nockolds CE (1973)**  
Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description.  
*J Biol Chem* **248**; 3313–3326.
- [76] **Falke JJ, Drake, S. K., Hazard, A. L. and Peersen, O. B. (1994)**  
Molecular tuning of ion binding to calcium signalling proteins.  
*Q Rev Biophys* **27**; 219–290.
- [77] **Grifford JL, Walsh MP, Vogel HJ (2007)**  
Structures and metal-ion-binding properties of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding helix-loop-helix EF-hand motifs.  
*Biochem J* **405**; 199-221.
- [78] **Lewit-Bentley A & Rety S (2000)**  
EF-hand calcium-binding proteins.  
*Curr Opin Struct Biol* **10**; 637-643.
- [79] **Capozzi F, Casadei F, Luchinat C (2006)**  
EF-hand protein dynamics and evolution of calcium signal transduction: an NMR view.  
*J Biol Inorg Chem* **11**; 949-962.
- [80] **Houdusse, A., Cohen C (1996).**  
Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 angstrom resolution: implications for regulation.  
*Structure* **4**; 21–32.
- [81] **Szebenyi DME & Moffat K (1986)**  
The refined structure of vitamin D-dependent calcium-binding protein from bovine intestine. Molecular detail, ion binding, and implications for the structure of other calcium-binding proteins.  
*J Biol Chem* **261**; 8761–8777.
- [82] **Blanchard H, Grochulski P, Li Y, Arthur, JS, Davies, PL, Elce JS. & Cygler M (1997).**  
Structure of a calpain  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain reveals a novel EF-hand and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced conformational changes.  
*Nature Struct. Biol.* **4**; 532–538.
- [83] **Lin GD, Chattopadhyay D, Maki, M, Wang, KK., Carson M, Jin, L et al. (1997).**  
Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding.  
*Nature Struct. Biol.* **4**; 539–547.
- [84] **Hohenester E, Maurer P, Hohenadl C, Timpl R, Jansonius JN & Engel J (1996).**  
Structure of a novel extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -binding module in Bm-40.  
*Nature Struct. Biol.* **3**; 67–73.
- [85] **Linse, S., Johansson, C., Brodin, P., Grundstrom, T., Drakenberg, T., and Forsen, S. (1991)**  
Electrostatic contributions to the binding of  $\text{Ca}^{2+}$  in calbindin  $\text{D}_{9k}$ .  
*Biochemistry*, **30**;154-162
- [86] **Vorum, H., Liu, X., Madsen, P., Rasmussen, H. H., and Honore, B. (1998)**  
Molecular cloning of a cDNA encoding human calumenin, expression in *Escherichia coli* and analysis of its  $\text{Ca}^{2+}$ -binding activity.  
*Biochim.Biophys.Acta*, **1386**; 121-131.

- [87] **Gutierrez-Ford C, Levay K, Gomes AV, Perera, EM Som T, Kim YM, Benovic JL, Berkovitz GD, Slepak VZ (2003)**  
 Characterization of Tescalcin, a Novel EF-Hand Protein with a Single Ca<sup>2+</sup>-Binding Site: Metal-Binding Properties, Localization in Tissues and Cells, and Effect on Calcineurin.  
*Biochemistry* **42**; 14553-14565.
- [88] **Chong S, Montello GE, Zhang A, Cantor EJ, Liao W, Xu MQ, Benner J(1998)**  
 Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step.  
*Nucleic Acids Res.* **26**(22):5109-15.
- [89] **Miroux B, Walker JE (1996)**  
 Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels.  
*J Mol Biol* **260**; 289-298.
- [90] **Kuipers OP, de Ruyter PGG, Kleerebezem M, de Vos WM (1998)**  
 Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria.  
*J Biotechnol* **64**;15–21.
- [91] **Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989)**  
 Molecular cloning – a laboratory manual.  
 Cold Spring Harbor laboratory press.
- [92] **Hanahan D, Jessee J, Bllom FR (1991)**  
 Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria.  
*Methods Enzymol* **204**; 63-113.
- [93] **Saiki RK, Gwelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988)**  
 Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.  
*Science* **239**; 487-491
- [94] **Bradford MM (1976)**  
 A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
*Anal Biochemistry* **72**; 248-254.
- [95] **Laemmli UK (1970)**  
 Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.  
*Nature* **227**; 680-685.
- [96] **Heukeshoven J, Dernick R (1988)**  
 Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels.  
*Electrophoresis.* **9**(1); 28-32.
- [97] **Woody RW. (1995)**  
 Circular Dichroism.  
*Methods Enzymol.* **246**; 34-71
- [98] **Johnson WC Jr. (1990)**  
 Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide.  
*Proteins* **7**(3); 205-214.
- [99] **Sreerama N., Venyaminov SY., Woody RW. (1999)**  
 Estimation of the number of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy.  
*Protein Science* **8**; 370 – 380.
- [100] **Sreerama N and Woody RW (1993)**  
 A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism.  
*Analyt Bioch* **209**; 32-44.

- [101] **Provencher SW and Glöckner J (1981)**  
 Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism.  
*Biochem* **20**; 33-37.
- [102] **O'Brien R, Ladbury JE, Chowdhry BZ (2001)**  
 Isothermal titration calorimetry of biomolecules.  
 In: *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry*, eds. Harding SE, Chowdhry BZ  
 Oxford University Press, 263-286.
- [103] **Praefcke GJK & Herrmann C (2005)**  
 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen.  
*BIOspektrum* **11(1)**, 44-47.
- [104] **Libich DS, Hill CM, Bates IR, Hallett FR, Armstrong S, Siemiarczuk A, Harauz G (2003).**  
 Interaction of the 18.5-kD isoform of myelin basic protein with Ca<sup>2+</sup>-calmodulin: effects of deimination  
 assessed by intrinsic Trp fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering, and circular dichroism.  
*Protein Sci.* **12(7)**; 1507-1521.
- [105] **Voet van Vormizeele J & Groth G (2008)**  
 Ethylene controls Autophosphorylation of the Histidine Kinase Domain in Ethylene Receptor ETR1.  
*Mol Plant* **1(2)**; 380-387.
- [106] **Grafit Data Analysis and Graphics Programm Version 3.01**  
 Erithacus Software Ltd.
- [107] **Zhou D, Yang R (2006)**  
 Global analysis of gene transcription regulation in prokaryotes.  
*Cell Mol Life Sci.* **63(19-20)**; 2260-90.
- [108] **Blanchet C, Combet C, Geourjon C, Deléage G (2000)**  
 MPSA: integrated system for multiple protein sequence analysis with client/server capabilities.  
*Bioinformatics.* **16(3)**:286-7.
- [109] **Bairoch A, Bucher P, Hofmann K. (1997)**  
 The PROSITE database, its status in 1997.  
*Nucleic Acids Res.* **25(1)**:217-21.
- [110] **Grisshammer R & Tate CG (1995)**  
 Overexpression of integral membrane proteins for structural studies.  
*Q Rev Biophys* **28**; 315-422.
- [111] **Schein HC (1990)**  
 Solubility as a function of protein structure and solvent components.  
*Biotechnology (N Y)* **8(4)**; 308-317.
- [112] **Rogl H, Kosemund K, Kühlbrandt W, Collison I (1998)**  
 Refolding of *E. coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography.  
*FEBS Letters* **432(1)**; 21-26.
- [113] **Kiefer H, Krieger J, Olzewski JD, Von Heijne G, Prestwich GD, Breer H (1996)**  
 Expression of an olfactory receptor in *E. coli*: purification, reconstitution, and ligand binding.  
*Biochemistry* **35(50)**; 16077-16084.
- [114] **Möhlmann T, Tjaden J, Schwoppe C, Winkler HH, Kampfenkel K, Neuhaus HE (1998).**  
 Occurrence of two plastidic ATP/ADP transporters in *Arabidopsis thaliana*.-Molecular characterisation and comparative structural analysis of similar ATP/ADP translocators from plastids and *Rickettsia prowazekii*.  
*Eur J Biochem.* **252(3)**; 353-359.

- [115] **Tjaden J, Schwoppe C, Mohlmann T, Quick PW, Neuhaus HE (1998).**  
Expression of a plastidic ATP/ADP transporter gene in *Escherichia coli* leads to a functional adenine nucleotide transport system in the bacterial cytoplasmic membrane.  
J Biol Chem. **273**(16); 9630-9636.
- [116] **Mikkelsen MD, Hansen CH, Wittstock U, Halkier BA (2000).**  
Cytochrome P450 CYP79B2 from Arabidopsis catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid.  
J Biol Chem. **275**(43); 33712-33717.
- [117] **Kurland C & Galland J (1996)**  
Errors of heterologous protein expression.  
Curr Opin Biotechnol **7**(5); 489-493.
- [118] **Makrides SC (1996)**  
Strategies for achieving high-level expression of genes in *E. coli*.  
Microbiol Rev **60**(39); 512-538.
- [119] **Nakamura Y, Gojobori T, Ikanuma T (2000)**  
Codon usage tabulated for international DNA sequence database: status for the year 2000.  
Nucl Acids Res **28**; 292.
- [120] **Kunji ER, Slotboom DJ, Poolman B (2003)**  
*Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins.  
Biochim Biophys Acta **1610**; 97-108
- [121] **Terpe K (2003)**  
Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.  
Appl Microbiol Biotechnol **60**; 523-533.
- [122] **Wu X, Jörnvall H, Berndt KD, Ortman E (2004)**  
Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *E. coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance.  
Biochem Biophys Res Comm **313**(3); 89-96.
- [123] **Dobson CM (2003)**  
Abstract Protein folding and misfolding.  
Nature **426**(6068) 884-890.
- [124] **Combet C., Blanchet C., Geourjon C. and Deléage G. (2000)**  
NPS@: Network Protein Sequence Analysis.  
TIBS **25** (3); 147-150.
- [125] **Bent, A. J., Innes, R.W., Ecker, J. R. & Staskawicz, B. J. (1992)**  
Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens.  
Molec Microbe Interact. **5**, 372-378.
- [126] **Thomma BPHJ, Eggermont K., Tierens K. F.M.-J, Broekaert WF (1999)**  
Requirement of Functional Ethylene-Insensitive 2 Gene for Efficient Resistance of Arabidopsis to Infection by *Botrytis cinerea*.  
Plant Physiology **121**; 1093-1101.
- [127] **Chen YF, Etheridge N, Schaller GE (2005)**  
Ethylene signal transduction.  
Annals of Botany **95**; 901-915.
- [128] **Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J (2000)**  
Interactions between Abscisic Acid and Ethylene Signaling Cascades.  
Plant Cell, **12**; 1103-1115.

- [129] **Wang Y, Liu C, Li K, Sun F, Hu H, Li X, Zhao Y, Han C, Zhang W, Duan Y, Liu M, Li X (2007)**  
 Arabidopsis EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway.  
 Plant Mol Biol **64**(6); 633-644.
- [130] **Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P (2003)**  
 EIN3-Dependent Regulation of Plant Ethylene Hormone Signaling by Two *Arabidopsis* F Box Proteins: EBF1 and EBF2.  
 Cell **115**; 679–689.
- [131] **Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ (2001)**  
 Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants.  
 Nature **410**(6826);327-30.
- [132] **Henzl MT, Larson JD, Agah S (2003)**  
 Estimation of parvalbuminCa<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> binding constants by global least-squares analysis of isothermal titration calorimetry data.  
 Anal Biochem **319**; 216-233.
- [133] **Linse, S. & Forsen, S. (1995).**  
 Determinants that govern high-affinity calcium binding.  
 In Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research (Means, A. R., ed.), vol. 30, Raven Press, Ltd, New York.
- [134] **Foguel D, Suarez MC, Barbosa C, Rodrigues JJ, Sorenson MM, Smillie LB, Silva JL (1996)**  
 Mimicry of the calcium-induced conformational state of troponin C by low temperature under pressure.  
 Proc Nat Acad Sci USA **93**; 10642-10646.
- [135] **Sigurskjold BW (1999)**  
 Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry.  
 Anal Biochem **277**; 260-266.
- [136] **Eftink MR, Ghiron CA (1976)**  
 Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies.  
 Biochemistry **15**(3); 672-80.
- [137] **Lehrer SS (1971)**  
 Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion.  
 Biochemistry **10**(17); 3254-63.
- [138] **Stryjewski W, Wasylewski Z (1986)**  
 The resolution of heterogeneous fluorescence of multityryptophan-containing proteins studied by a fluorescence quenching method  
 Eur J Biochem **158**; 547-553.
- [139] **Wasylewski Z, Koloczek H, Wasniowska A (1988)**  
 Fluorescence-quenching-resolved spectroscopy of proteins.  
 Eur J Biochem **172**; 719-724.
- [140] **Divita, G., Di Pietro, A., Deleage, G., Roux, B. & Gautheron, D. C. (1991)**  
 Differential nucleotide binding to catalytic and noncatalytic sites and related conformational changes involving alpha/beta-subunit interactions as monitored by sensitive intrinsic fluorescence in *Schizosaccharomyces pombe* mitochondrial F1.  
 Biochemistry **30**; 3256-3262.
- [141] **Mintseris J & Weng Z (2005)**  
 Structure, function and evolution of transient and obligate protein-protein-interactions.  
 Proc Nat Acad Sci USA **102**; 10930-10935.
- [142] **Day IS, Reddy VS, Shad Ali G, Reddy AS (2002).**  
 Analysis of EF-hand-containing proteins in Arabidopsis.  
 Genome Biol.**3**(10); research0056.1–0056.24.

- [143] **Leung IK, Mani RS, Kay CM (1987)**  
Fluorescence studies on the Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> binding properties of the alpha-subunit of bovine brain S100-a protein.  
FEBS Lett **214**; 35-40.
- [144] **Franz C, Drurussel I, Cox JA, Schafer BW, Heinzmann CW (1998)**  
Binding of Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> to human nuclear S100A2 and mutant proteins.  
J Biol Chem **273**; 18826-18834.
- [145] **Wang CK, Cheung HC (1985)**  
Energetics of the binding of calcium and troponin I to troponin C from rabbit skeletal muscle.  
Biophys **48**; 727-739.
- [146] **Brunet S, Scheuer T, Klevit R, Catterall WA (2005)**  
Modulation of CaV1.2 channels by Mg<sup>2+</sup> acting at an EF-hand motif in the COOH-terminal domain.  
J Gen Physiol **126**; 311-323.
- [147] **Vorum H, Liu X, Madsen P, Rasmussen HH, Honore B (1998)**  
Molecular cloning of a cDNA encoding human calumenin, expression in *Escherichia coli* and analysis of its Ca<sup>2+</sup>-binding activity.  
Biochim Biophys Acta **1386**; 121-131.
- [148] **Nagae M, Nozowa A, Koizumi LT, Sano N, Hashimoto H, Sato M, Shimizu T (2003)**  
The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*.  
J Biol Chem **278**; 42240-42246.
- [149] **Gutierrez-Ford C, Levay K, Gomes AV, Perera EM, Som T, Kim YMBenovic JL, Berkovitz GD, Slepak VZ (2003)**  
Characterization of tescalin, a novel EF-hand protein with a single Ca<sup>2+</sup>-binding site: metal-binding properties, localization in tissues and cells, and effect on calcineurin.  
Biochemistry **42**; 14553-14565.
- [150] **Babini E, Felli IC, Lelli M, Luchinat C, Pierattelli R (2005)**  
Backbone and side-chains <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR assignment of human beta-parvalbumin.  
J Biomol NMR. **33**(2); 137.
- [151] **Drake SK, Falke JJ (1996)**  
Kinetic tuning of the EF-hand calcium binding motif. The gateway residues independently adjusts (i) barrier height and (ii) equilibrium.  
Biochemistry **35**; 1753-1760.
- [152] **Yamniuk AP, Nguyen LT, Hoang TT, Vogel HJ (2004)**  
Metal binding properties and conformational states of calcium- and integrin-binding protein.  
Biochemistry **43**; 2558-2568.
- [153] **Capozzi F, Casadei F, Luchinat C (2006)**  
EF-hand protein dynamics and evolution of calcium signal transduction: an NMR view.  
J Biol Inorg Chem **11**; 949-962.
- [154] **Kördel J, Pearlman DA, Chazin WJ (1997).**  
Protein solution structure calculations in solution: solvated molecular dynamics refinement of calbindin<sub>D9k</sub>.  
J Biomol NMR. **10**(3):231-43.
- [155] **Andersson, M., Malmendal, A., Linse, S., Ivarsson, I., Forsen, S. and Svensson, L. A. (1997)**  
Structural basis for the negative allostery between Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-binding in the intracellular Ca<sup>2+</sup>-receptor calbindin<sub>D9k</sub>.  
Protein Sci. **6**; 1139-1147.
- [156] **Declercq JP, Tinant B, Parelle J, Rarnbannd J (1991)**  
Ionix interactions with parvalbumins. Crystal structure determination of pike 4.10 parvalbumin in four different ionic environments.  
J Mol Biol **220**; 1017-1039.

[157] **Allouche D, Perello J, Sanejouand YH (1999)**

Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> exchange in parvalbumin and other EF-hand proteins. A theoretical study.  
J Mol Biol **285**; 857-873.

[158] **Zot HG & Potter JD (1982)**

A structural role for the Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. Preparation and properties of troponin C depleted myofibrils.  
J Biol Chem. **257**(13);7678-83.

[159] **Johnson JD, Charlton SC, Potter JD (1979)**

A fluorescence stopped flow analysis of Ca<sup>2+</sup> exchange with troponin C.  
Biochemistry **254**; 3497-3502.

[160] **Trigo-Gonzalez G, Racher K, Burtnick L, Borgford T (1992)**

A comparative spectroscopic of tryptophane probes engineered into high- and low-affinity domains of recombinant chicken troponin C.  
Biochemistry **31**; 7009-7015.

[161] **Osawa M, Tonk KI, Lilliehook C, Wasco W, Buxbaum JD, Cheng HY, Penninger JM, Ikura M, Ames JB (2001)**

Calcium-regulated DNA binding and oligomerization of the neuronal calcium-sensing protein, calsenilin/DREAM/KChIP3.  
J Biol Chem **276**; 41005-41013.

[162] **McAinsh MR, Brownlee C, Hetherington AM (1992)**

Visualizing Changes in Cytosolic-Free Ca<sup>2+</sup> during the Response of Stomatal Guard Cells to Abscisic Acid.  
Plant Cell.**4**(9); 1113-1122.

[163] **Dolmetsch RE, Lewis RS (1998)**

Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression.  
Nature **382**; 933-936.

[164] **Ohki S, Ikura M, Zhang M (1997)**

Identification of Mg<sup>2+</sup>-binding sites and the role of Mg<sup>2+</sup> on target recognition by calmodulin.  
Biochemistry **36**(14); 4309-16.

[165] **Gong D, Guo Y, Jagendorf AT, Zhu KJ (2002)**

Biochemical Characterization of the Arabidopsis Protein Kinase SOS2 That Functions in Salt Tolerance<sup>1</sup>  
Plant Physiol. **130**(1); 256–264.

[166] **Moriya H and Johnston M (2004)**

Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I  
Proc Nat Acad Sci USA **101**(6); 1572–1577.





### VII.1.2 EIN2<sup>479-1294</sup> Protein aus *A. thaliana*

NALSYPSVQEEEEIERTETRRNEDESIVRLESRVKQDLDTTSVTSSVYDLPENILMTDQEI  
 RSSPPEERELDVKYSTSQVSSLKEDSDVKEQSVLQSTVVNEVSDKDLIVETKMAKIEPMS  
 PVEKIVSMENNSKFIEKDVEGVSWETEEATKAAPTSNFTVGS DGPPSFRSLSGEGGSGTG  
 SLSRLQGLGRAARRHLSAILDEFWGHLYDFHGQLVAEARAKKLDQLFGTDQKSASSMKAD  
 SFGKDISSGYCMSPTAKGMSQMTSSLYDSLKQQRTPGSIDS LYGLQRGSSPSPLVNRMQ  
 MLGAYGNTTNNNNAYELSEERRYSSLRAPSSSEGWEHQQPATVHGYQMKSYVDNLAKERLE  
 ALQSRGEIPTSRSMALGTLSTYQQALALALKQKSQNGLTPGPAPGFENFAGSRSISRQSER  
 SYYGVPSSGNTDTVGA AVANEKKYSSMPDISGLSMSARNMHL PNNKSGYWDPSSGGGGYG  
 ASYGRLSNESSLYSNLGSRVGVPSTYDDISQSRGGYRDAYS LPQSATTGTGSLWSRQPFE  
 QFGVAERNNAVGEELRNRSNPINIDNNASSNVDAEAKLLQSF RHCILKLIKLEGSEWLFG  
 QSDGVDEELIDRVAAREKFIYEAEAREINQVGHMGEPLISSVPNCGDGCVWRADLIVSFG  
 VWC IHRVLDLSLMESRPELWGKYTYVLNRLQGVIDPAFSKLRTPMTPCFCLQIPASHQRA  
 SPTSANGMLPPAAKPAKGKCTTAVTLLDLIKDVEMAI SCRKGRTGTAAGDVAFPKGKENL  
 ASVLKRYKRRLSNKPVGMNQDGPGRKKNVTAYGSLG

### VII.1.3 Vergleich der Sequenzlängen und Molekulargewichte des Vollängenproteins und der C-terminalen Domäne von EIN2

	Sequenzlänge (in Aminosäuren)	Molekulargewicht (kDa)
EIN2 <sup>1-1294</sup>	1294	141,0
EIN2 <sup>1-1294</sup> als Konstrukt mit Histidinankern	1325	144,5
EIN2 <sup>1-1294</sup> als Intein-Fusions-Konstrukt	1820	200,0
EIN2 <sup>479-1294</sup>	815	89,1
EIN2 <sup>479-1294</sup> als Konstrukt mit Histidinankern	846	92,6

## VII.2 Codon Bias

### VII.2.1 Codon Usage zwischen *A. thaliana* und *E. coli*

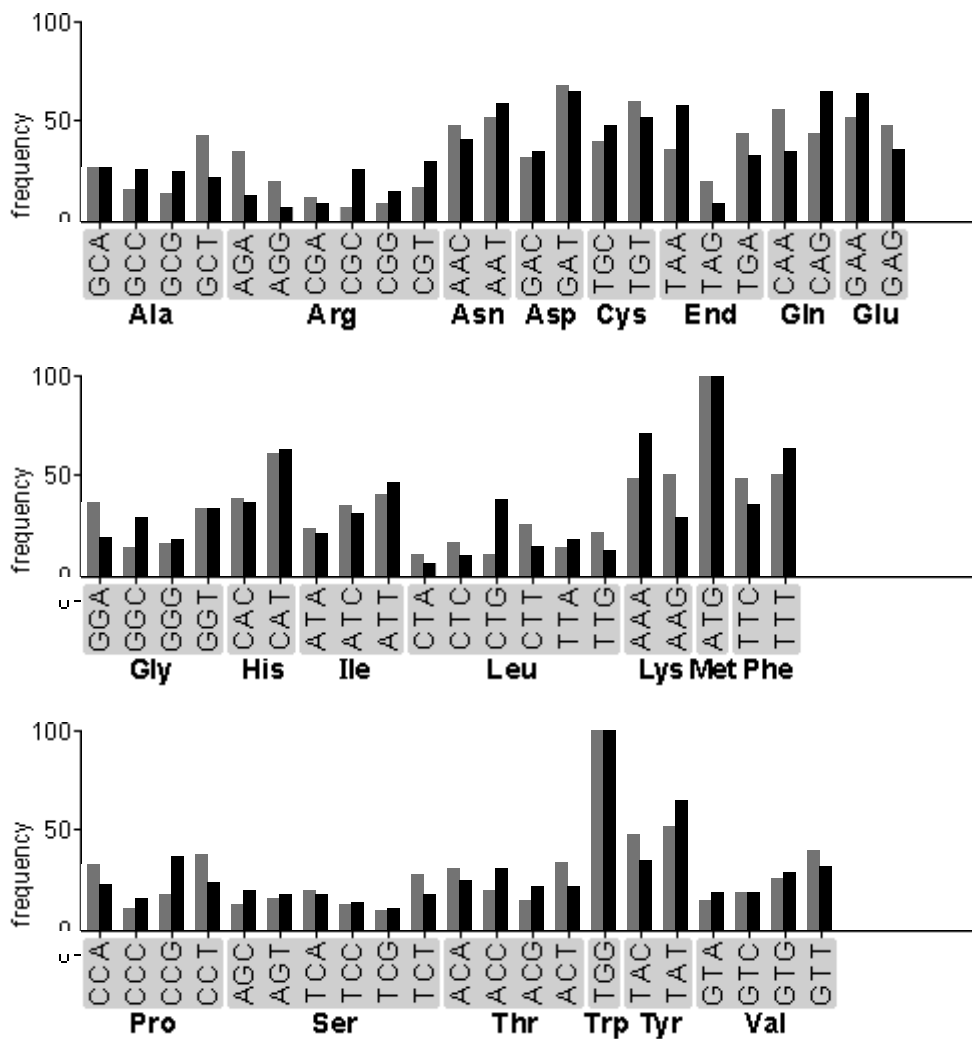
**Codontable 1 (grey):**

*Arabidopsis\_thaliana*

**Codontable 2 (black):**

*Escherichia\_coli*

**Mean difference: 9.33 %**



VII.2.2 Codon Usage zwischen *L. lactis* und *E. coli*

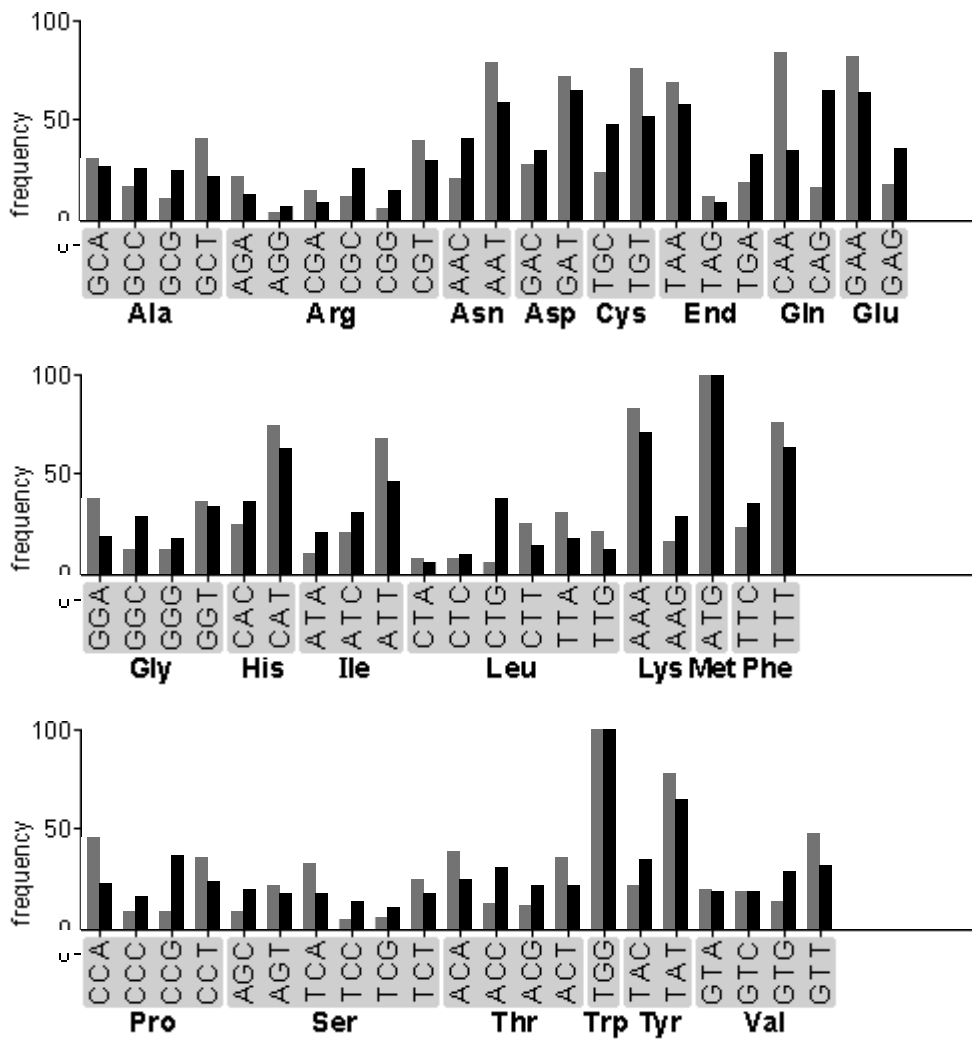
**Codontable 1 (grey):**

*Lactococcus\_lactis*

**Codontable 2 (black):**

*Escherichia\_coli*

**Mean difference: 12.83 %**



VII.2.3 Codon Usage zwischen *L. lactis* und *A. thaliana*

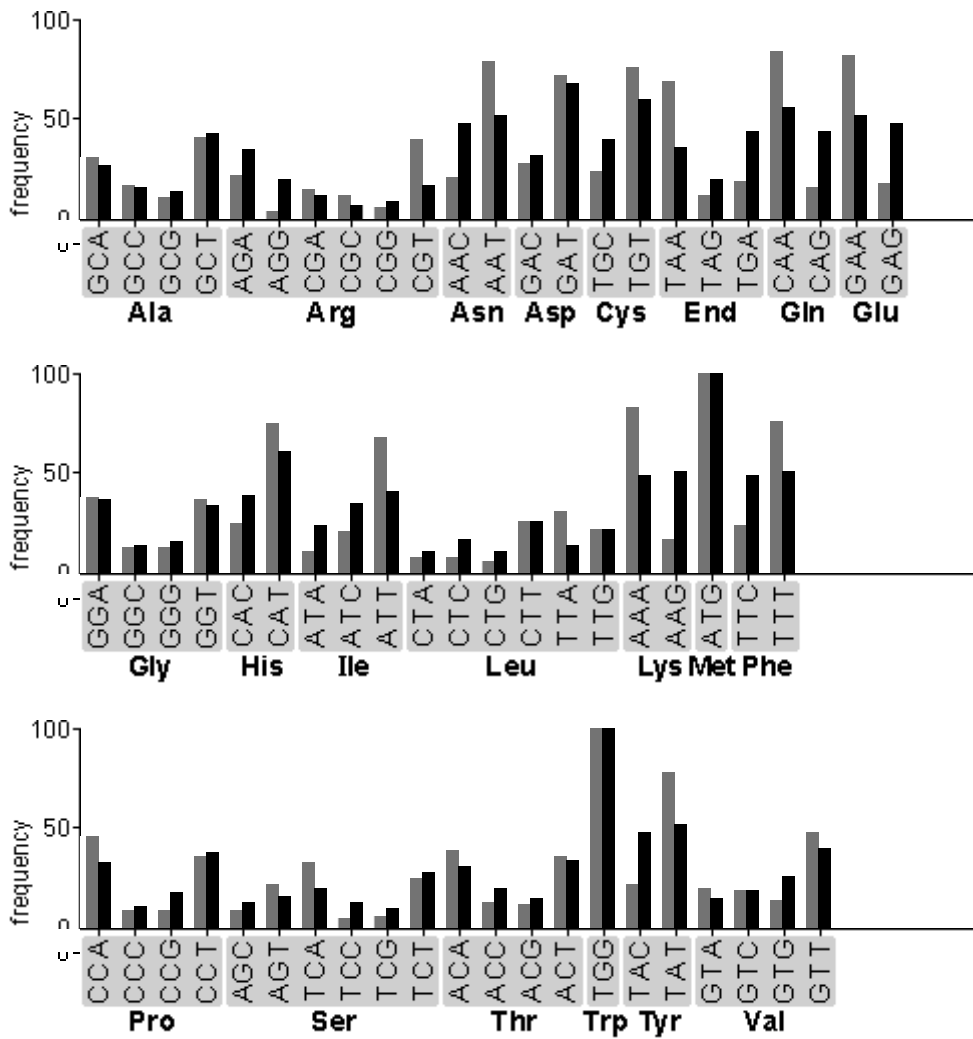
**Codontable 1 (grey):**

*Lactococcus\_lactis*

**Codontable 2 (black):**

*Arabidopsis\_thaliana*

**Mean difference: 11.75 %**



### VII.3 Abkürzungsverzeichnis

A. thaliana	Arabidopsis thaliana
AHP	arabidopsis histidine containing phosphoprotein
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ARR	arabidopsis response regulator
BSA	bovines Serumalbumin
CD	circular dichroism
CEND	COOH end of EIN2
C-terminal	carboxyterminal
CTR	constitutive triple response
DNA	desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
E3s	Ubiquitin-Protein Ligasen
E. coli	Escherichia coli
EIN	ethylene insensitive
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERS	ethylene response sensor
ETR	ethylene resistant
IDA	Imidodiessigsäure
IMAC	Immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
$K_D$	Dissoziationskonstante
$k_q$	bimolekulare Quenckonstante
L. lactis	Lactococcus lactis
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
NRAMP	Natural resistance-associated macrophage protein
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Psi	pound per square inch
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	Tetramethylethyldiamin
$\tau$	Fluoreszenzlebensdauer

## VIII. Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Georg Groth für seine engagierte Unterstützung meiner Arbeit und für die zahlreichen intensiven und anspruchsvollen Diskussionen, sowie für sein Verständnis, dass die Abgabe dieser Arbeit später erfolgt ist als es geplant war.

Herrn Professor Dr. Rüdiger Simon danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Ebenso gilt mein Dank den Arbeitsgruppen von Herrn Professor L. Schmitt, Herrn Professor D. Riesner und Herrn Professor M. Grieshaber für die technische Unterstützung beim *L. lactis* Expressionssystem, bei der CD-Spektroskopie und der Isothermen Titrationkalorimetrie. Ein besonderes Dankeschön an Nadine van Os, die mich bei der Auswertung der ITC-Daten unterstützt hat.

Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie der Pflanzen für die nette und kollegiale Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und die vielen zahlreichen Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt dabei meiner alten Laborfamilie Nicole, Jan, Erik sowie Maria, Thomas und Antje, die mich als kölschen Jeck herzlich in Düsseldorf aufgenommen haben. Ich werde mich immer gerne an unsere gemeinsame Zeit erinnern.

Anke Thiesen, Nicole und Jan Voet van Vormizeele, Elisa Buchen, Thomas Claßen und Benny Scharein danke ich für die Durchsicht der Arbeit und ihre kritischen Anmerkungen zum Manuskript.

Ganz besonders danke ich Wolfgang und meiner Familie für ihre ständige Unterstützung und Ermutigung. Ich kann nicht in Worte fassen, wie viel mir eure Unterstützung bedeutet hat und danke euch herzlich für euer Verständnis während meiner Promotionszeit.